

Aus dem Bereich Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Studien zur Rolle von Trimethylamin-N-oxid in Lipid- und Glukosestoffwechsel

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Astrid Ines Knell
geb. am 26.10.1990 in Berlin

Tag der Promotionsprüfung: 12.02.2020

Dekan: Prof. Dr. M. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Rima Obeid
Prof Dr. Frank Lammert

Zusammenfassung

Hintergrund: Trimethylamin-N-oxid (TMAO) rückte aufgrund beobachteter Assoziationen mit kardiovaskulären Erkrankungen, Atherosklerose und Diabetes in letzter Zeit vermehrt in den Fokus explorativer Studien. TMAO besitzt proatherosklerotisches Potential, greift in den Cholesterolfstoffwechsel ein und liegt bei Diabetikern im Vergleich zur gesunden Bevölkerung in höheren Plasmakonzentrationen vor. Schlüsselenzym der TMAO-Synthese in der menschlichen Leber ist die Flavin-Monooxygenase 3, ein Enzym, das auch am Xenobiotika-Metabolismus beteiligt ist.

Gegenstand und Methoden: Diese Arbeit stellt drei Studien vor, in denen unterschiedliche Teilaspekte des TMAO- und Cholin-Stoffwechsels untersucht wurden. Eine Studie beschäftigte sich mit der Reaktion akuter Fett- und Glukosebelastung im TMAO- und C1-Stoffwechsel bei 18 Probanden. In einer zweiten Studie wurde anhand von 331 Blutplasmaproben analysiert, ob zwischen den Konzentrationen an proatherogenem TMAO und antiatherogenem HDL eine Korrelation besteht. Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss des Xenobiotikums Abirateronazetat auf die Metabolitkonzentrationen des TMAO- und Cholin-Stoffwechsels im Plasma bei 34 Patienten mit progressiv Chemotherapie-naivem Kastrations-resistentem Prostatakarzinom.

Ergebnisse: Nach akuter Fett- und Glukosebelastung zeigten sich Konzentrationsänderungen mehrerer Metabolite des Cholin- und TMAO-Stoffwechsels im Plasma. Während nach Fettbelastung die Cholin-Konzentrationen abnahmen, stiegen sie nach Glukosebelastung an. Vier Stunden nach der Fettbelastung fanden sich zudem signifikante Änderungen in abfallenden Betain- und Glukosekonzentrationen sowie ansteigenden Triglyceridkonzentrationen. Durch die Glukosebelastung konnte ein Abfall der C1-Donoren Dimethylglycin und S-Adenosylmethionin sowie von TMAO und Taurin verzeichnet werden. Im Quintilvergleich waren TMAO- und HDL-Plasmaspiegel nicht signifikant assoziiert. Nach Applikation von Abirateronazetat stieg die TMAO-Konzentration nur in Therapiegruppe A. In der prozentualen Konzentrationsänderung fanden sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen zwischen den Therapiegruppen keine Unterschiede.

Zusammenfassung: Nach akuter Fett- und Glukosebelastung wurden mehrere Parameter entdeckt, die als Marker für Fett- und Glukosestoffwechsel fungieren könnten. Eine Assoziation von antiatherogenen HDL- und proatherogenen TMAO-Plasmakonzentrationen konnte nicht nachgewiesen werden. Zwischen der Applikation von Abirateronazetat und den Konzentrationen an TMAO war kein eindeutiger Zusammenhang erkennbar.

Abstract

Background: In recent time, trimethylamine-N-oxide (TMAO) has been focussed increasingly by exploratory studies caused by observations that associated it to cardiovascular diseases, atherosclerosis and diabetes mellitus. TMAO has pro-atherosclerotic potential, has been linked to cholesterol metabolism and its plasma concentrations are increased in diabetics compared to the healthy population. The key enzyme of TMAO synthesis in human liver is the flavin-monooxygenase 3, an enzyme that is also involved in the metabolism of xenobiotics.

Objectives and methods: This thesis presents three studies that analysed several aspects of TMAO and choline metabolism. One study examined the reaction of acute fat and glucose challenge in TMAO and C1 metabolism with 18 participants. Based on 331 blood plasma samples a second study analysed whether a correlation exists between pro-atherogenic TMAO and anti-atherogenic HDL. A third study investigated the influence of the xenobiotic abiraterone acetate to the plasma concentrations of metabolites in TMAO and choline metabolism with 34 patients with progressive chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer.

Results: Acute fat and glucose challenge changed plasma concentrations of several metabolites in TMAO and choline metabolism. While choline concentrations decreased after fat challenge, they increased after glucose challenge. Furthermore, four hours after fat challenge significant changes have been noticed in decreased betaine and glucose concentrations and increased triglyceride concentrations. Glucose challenge caused a decrease in C1 donors Dimethylglycine and S-adenosylmethionine as well as TMAO and taurine. A quintile comparison showed no significant association between TMAO and HDL plasma concentrations. After application of abiraterone acetate the TMAO concentration increased only in therapy group A. There were no differences in the percental concentration change between the therapy groups in consideration of the different baseline concentrations.

Conclusions: After acute fat and glucose challenge several metabolites were identified that could function as a marker in fat and glucose metabolism. An association between anti-atherogenic HDL and pro-atherogenic TMAO plasma concentrations could not be proved. A definite association could not be observed between the application of abiraterone acetate and the TMAO concentrations.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Trimethylamin-N-oxid (TMAO)	1
1.1.1 Physikalische und chemische Eigenschaften	1
1.1.2 Physiologische Bedeutung und Funktion	2
1.1.2.1 Als Osmolyt	2
1.1.2.2 Als chemisches Chaperon	3
1.1.2.3 Als Elektronenakzeptor	3
1.1.3 TMAO-Stoffwechsel beim Menschen	3
1.1.3.1 Exogener Stoffwechsel	4
1.1.3.2 Endogener Stoffwechsel	5
1.1.3.3 Ausscheidung	10
1.1.4 Exkurs: Bedeutung des intestinalen Mikrobioms	11
1.1.5 Einflussfaktoren auf TMAO-Konzentrationen in Blut und Urin . .	13
1.1.5.1 Ernährung und intestinales Mikrobiom	13
1.1.5.2 FMO3-Genetik und -Aktivität	15
1.1.5.3 Nierenfunktion	16
1.1.5.4 Inflammationsprozesse	16
1.1.5.5 Therapiekonzepte zur Senkung der TMAO-Spiegel durch Xenobiotika (Medikamente und Umweltstoffe) . .	16
1.1.6 Funktionen der FMO3 in Xenobiotika-Metabolismus und mensch- lichem Stoffwechsel	18
1.1.7 Assoziationen von Pathologien mit TMAO	19
1.1.7.1 Assoziationen mit kardiovaskulären Erkrankungen: Cholesterol- und Gallensäurenstoffwechsel	19
1.1.7.2 Assoziationen mit Diabetes mellitus: Insulinresistenz, Glukosetoleranz und Fettbelastung	21
1.1.7.3 Assoziationen mit weiteren Erkrankungen: Nierener- krankungen und Tumore	22
1.2 Cholin-Stoffwechsel	23
1.2.1 Cholin: Plasmakonzentrationen und Einflussfaktoren	23
1.2.2 Cholin als Methyl donor im C1-Stoffwechsel	24

1.2.3	Cholin in Cholesterol- und Gallensäurenstoffwechsel	24
1.3	Zielsetzung	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie)	28
2.1.1	Fragestellung	28
2.1.2	Studiendesign	28
2.1.3	Studienablauf und Messungen	29
2.1.4	Präanalytik	30
2.1.5	Messungen mittels UPLC-Tandem MS (Messprinzip)	31
2.1.6	Probenvorbereitung zur UPLC-Tandem MS Messung	33
2.1.7	Rechner-basierte Auswertung der MS-Daten	35
2.1.8	Statistische Analyse	36
2.2	Studie zur Abhängigkeit von TMAO und HDL	36
2.2.1	Fragestellung	36
2.2.2	Studiendesign, Probenauswahl und Messung	37
2.2.3	Statistische Analyse	39
2.3	Studie zur Wirkung von Xenobiotika (Abirateronazetat) auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel	40
2.3.1	Studiendesign	40
2.3.2	Studienablauf und Messungen	41
2.3.3	Statistische Analyse	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie)	43
3.1.1	Kolmogorov-Smirnov-Test	44
3.1.2	Vergleich Parameterkonzentrationen innerhalb eines Tests	44
3.1.3	Vergleich der Parameterkonzentrationen vor Testdurchführung	45
3.1.4	Relative Konzentrationsänderung	45
3.1.5	Vergleich der Parameterkonzentration nach Testdurchführung	47
3.1.6	Prüfung auf bivariate Korrelation	47
3.1.7	Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede	48
3.2	Studie zur Abhängigkeit von TMAO und HDL	49
3.2.1	Kolmogorov-Smirnov-Test	50
3.2.2	Deskriptive Statistik und Geschlechtervergleich	50
3.2.3	Abhängigkeiten zwischen TMAO- und HDL-Konzentrationen (Stratifizierungsanalyse)	52

3.3	Studie zur Wirkung von Xenobiotika (Abirateronazetat) auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel	55
3.3.1	Kolmogorov-Smirnov-Test	55
3.3.2	Mittelwertvergleich der Therapiegruppen A und B zu den gemessenen Zeitpunkten (1, 2 und 3)	55
3.3.3	Abhängiger t-Test: Parameteränderung im Studienverlauf	57
3.3.4	Untersuchung auf Unterschiede in den Konzentrationsänderungen von TMAO zwischen Therapiegruppe A und B	57
3.4	Validität der erhobenen Messwerte	59
4	Diskussion und abschließende Beurteilung	60
4.1	Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie)	60
4.2	Studie zur Abhängigkeit von TMAO und HDL	63
4.3	Studie zur Wirkung von Xenobiotika (Abirateronazetat) auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel	65
4.4	Limitationen der Studien	67
4.5	Zusammenfassung	68
	Literatur	69
	E Fragebogen	88
	A Chemikalien und Standards	89
	B Materialien und Ausstattung	91
	C Software	93
	D Referenzbereiche der Routinelaborparameter	94
	F Danksagung	96

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	TMAO-Konfiguration: tetraedrale Struktur.	1
Abb. 2	Überblick über den TMAO-Stoffwechsel. Exogen wird TMAO direkt aus der Nahrung aufgenommen, im endogenen Weg werden die Ausgangsstoffe wie z.B. Cholin und Carnitin von Darmbakterien zu Trimethylamin (TMA) transformiert. Bild aus Cho CE, Caudill MA (2017) Trimethylamine-N-oxide: Friend, foe, or simply caught in the cross-fire? Trends in Endocrinology & Metabolism 28(2):121-130, Copyright 2016, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [32].	4
Abb. 3	Überblick über den exogenen TMAO-Stoffwechsel. Bild aus Taesuan S, Cho CE, Malysheva OV, Bender E, King JH et al. (2017) The metabolic fate of isotopically labeled trimethylamine-N-oxide (TMAO) in humans. Journal of Nutritional Biochemistry 45:77-82, Copyright 2017, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [158].	5
Abb. 4	Überblick über die endogenen TMAO-Stoffwechselwege und deren Verknüpfung. TMA ist obligatorisches Zwischenprodukt der TMAO-Synthese. Bild nach Fennema et al. [52].	6
Abb. 5	Überblick über die Verstoffwechslung enteralen Phosphatidylcholins und Cholins: Verwendung im TMAO-, C1- (Betain) und Lipidstoffwechsel. Bild aus Chen et al. [28], lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/	7
Abb. 6	TMAO-Synthese aus L-Carnitin: Durch Mikrobionten des Darms wird L-Carnitin direkt oder über die Zwischenstufe γ -Butyrobetain zu TMA transformiert. Eine endogene Synthese aus Lysin über γ -Butyrobetain existiert ebenfalls. Bild aus Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z et al. (2014) γ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. Cell Metabolism 20(5):799-812, Copyright 2014, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [79].	8
Abb. 7	Transportsystem der Niere zur TMAO-Ausscheidung. BCRP: Breast Cancer Resistance Protein, MDR1: Multidrug-Resistance-Protein 1, MRP2/4: Multidrug Resistance-Related Protein 2/4, OCT2: Organic Cation Transporter 2. Bild nach Teft et al. [166].	11
Abb. 8	Therapeutische Strategien zur Senkung der Konzentrationen an TMAO.	17

Abb. 9	Übersicht über die wechselseitigen Beziehungen zwischen Einflussfaktoren des TMAO-Stoffwechsels (hier: Ernährung, Mikrobiom), TMAO-Konzentrationen im Körper und assoziierten metabolischen sowie pathologischen Veränderungen. Bild aus Aron-Wisnewsky und Clément [4]. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Nephrology: The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. Aron-Wisnewsky J, Clément K, Copyright ©2015, Springer Nature (2016).	20
Abb. 10	Über die gezeigten Derivate ist Cholin in verschiedene Stoffwechselwege eingebunden.	23
Abb. 11	Cholin wird zu Betain, Phosphatidylcholin oder TMA verstoffwechselt. Über Phosphatidylcholin erhält es Anschluss an den Fettstoffwechsel und Cholesteroltransport via VLDL, über Betain ist es an den C1-Stoffwechsel und über mehrere Schritte auch an den Taurin- und damit Gallensäurenstoffwechsel angebunden. AdoMet: S-Adenosylmethionin (=SAM); AdoHcy: S-Adenosylhomocystein (=SAH); BHMT: Betain-Homocystein S-Methyltransferase; CHDH: Cholindehydrogenase; C β S: Cystathionin- β -Synthase; C γ L: Cystathionin- γ -Lyase; DMG: Dimethylglycin; MAT: Methionin-Adenosyltransferase; MS: Methionin-Synthase; SHMT: Serin-Hydroxymethyltransferase; THF: Tetrahydrofolat; MTHFR: 5,10-Methylen-THF-Reduktase; PEMT: Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase; X: Methylakzeptor. Bild aus Poloni et al. [125] (modifiziert), lizenziert unter Creative Commons Attribution license: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/	25
Abb. 12	Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie): Ablauf und Durchführung der Studie sind im Fließschema dargestellt. ¹ DDG-Kriterien zeigt Abbildung 13.	29
Abb. 13	Diabetes-Diagnostik: Schema nach Kerner und Brückel (2012) im Auftrag der DDG [74].	31
Abb. 14	Aufbau und Funktionsweise des Quattro Premier TM XE - Tandem Quadrupol-Massenspektrometers. Die Ionisierung erfolgt per Elektrosprayionisation (ESI), bei der durch Anlegen einer Hochspannung an einem Analyt-tragenden metallischen Kapillarende ein Ladungsüberschuss mit Aerosolbildung entsteht, oder per Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), bei der eine Aerosolbildung durch einen Stickstoffstrom und die Analyt-Ionisierung durch anliegende Spannung via Lösungs-	

	mittel erzeugt wird. Bild aus Waters [181]. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Waters GmbH.	32
Abb. 15	Die Abbildung zeigt die Massenspektrometer bei Messung im MRM-Modus (Multiple reaction monitoring), durch dessen Verwendung eine längere Verweildauer der Ionen und somit eine höhere Sensitivität erreicht wird. Es erfolgt eine Selektion der Ionen (MS1) und ihrer Fragmente (MS2). Bild aus Waters [181]. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Waters GmbH.	33
Abb. 16	Interventionstherapie bei kastrierten männlichen Patienten mit metastasiertem CRPC (chemotherapy-resistant prostate cancer). Der Behandlungsunterschied zwischen den Gruppen (A und B) besteht im Fortführen bzw. Abbrechen der vorhergehenden LHRH-Hormonapplikation. . .	41
Abb. 17	Baselinevergleich: vor oFTT/vor oGTT	46
Abb. 18	A-C Boxplot der Parameterkonzentrationen im Vergleich nach oFTT/oGTT (Signifikanzniveau: $p < 0,05$). Angegeben sind die Mediane (M) und p-Werte (zweiseitig). Die Auswertung für SAH/SAM basiert auf einer Fallzahl von 13 Probanden, für die restlichen Parameter beim oGTT auf einer Fallzahl von 17 Probanden (Ausnahme: Glukose mit 18 Probanden) und für den oFTT mit 18 Probanden.	47
Abb. 19	Gezeigt ist die Probenverteilung über den HDL-Bereich unter Berücksichtigung des Geschlechts (N=333).	50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Physiologische Funktionen von Cholin-Derivaten im menschlichen Stoffwechsel [121, 200].	6
Tab. 2	Zusammenstellung von Bakterienphyla und -arten mit Fähigkeit zur TMA-Synthese aus verschiedenen Ausgangsstoffen. Tabelle nach Fenema et al. [52].	12
Tab. 3	Die wichtigsten Nahrungsquellen mit den höchsten Konzentrationen an TMAO bzw. Ausgangsstoffen der endogenen TMAO-Synthese.	13
Tab. 4	Medikamente und Umweltstoffe, die die Konzentrationen von TMAO im Blutplasma und Urin beeinflussen können, sowie ihre Angriffspunkte im TMAO-Stoffwechsel.	18
Tab. 5	Über verschiedene Mechanismen können Einflussfaktoren die Cholin-Konzentrationen im Blutplasma beeinflussen. Die Einflüsse sind zusammenfassend dargestellt. Referenz: [68].	23
Tab. 6	Zusammensetzung der zum oralen Fetttoleranztest (oFTT) verwendeten Landliebe Schlagsahne nach Herstellerangabe.	30
Tab. 7	Kriterien mit Parameter/Blutmarker, die zur Beurteilung des Probenausschlusses dienten. Die Festlegung erfolgte nach internem Konsens, um Störeffekte auf den TMAO-Stoffwechsel zu minimieren.	38
Tab. 8	Deskriptive Statistik der Probandencharakteristika als Mittelwerte mit Standardabweichung aus der Routinediagnostik zu Studienbeginn (N=18).	43
Tab. 9	Messparameter mit signifikanten Konzentrationsänderungen durch den oFTT bzw. oGTT. Verglichen werden die Konzentrationen zu den Zeitpunkten vor und nach Durchführung innerhalb eines Tests.	45
Tab. 10	Prüfung auf signifikante Parameteränderungen vergleichend zwischen zwei unabhängigen Tests (oFTT und oGTT).	46
Tab. 11	Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach dem Spearman Rho-Test für signifikant korrelierende Δ -Marker nach oFTT und oGTT. Der Vergleich der Parameterdifferenzen erfolgte innerhalb eines Tests (oFTT oder oGTT).	48
Tab. 12	Ergebnisse des ANOVA-Tests zur Untersuchung auf Unterschiede in den persönlichen Maßzahlen und Δ Konzentrationen der MS-Daten nach oFTT und oGTT zwischen Männern und Frauen.	49
Tab. 13	Übersicht über verschiedene Marker unter Berücksichtigung des Geschlechts. Gezeigt sind zudem die Ergebnisse des Gruppenvergleichs zwischen Männern und Frauen.	51

Tab. 14	Aufteilung nach HDL-Quintilen getrennt nach Männern und Frauen sowie das Ergebnis des Quintilvergleichs.	53
Tab. 15	Aufteilung nach TMAO-Quintile getrennt nach Männern und Frauen sowie das Ergebnis des Quintilvergleichs.	54
Tab. 16	Deskriptive Statistik der Gesamtstichprobenzahl (Fallzahl: N=34), Therapie A (N=18) und B (N=16).	56
Tab. 17	Testung der logarithmierten Messwerte auf signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf der Studie.	58
Tab. 18	Vergleich der Konzentrationsänderung von TMAO im exakten X^2 -Test zwischen Therapiegruppe A und B sowie Adjustierung auf die Baseline im ANOVA-Test.	59

Abkürzungsverzeichnis

ABC ATP-binding cassette

AI Atherogener Index

ANOVA Analysis of variance

AP Alkalische Phosphatase

APCI Atmospheric-pressure chemical ionization

BCRP Breast Cancer Resistance Protein

BEH Bridged ethyl hybrid

BHMT Betaine-homocysteine methyltransferase

BMI Body-Mass-Index

CDT Carbohydrat-defizientes Transferrin

CRP C-reaktives Protein

CV Coefficient of variation

CYP Cytochrom P450

DH Dehydrogenase

DHEA Dehydroepiandrosteron

DMA Dimethylamin

DMB 3,3-Dimethyl-1-Butanol

DMG Dimethylglycin

DMSOR Dimethylsulfoxid-Reduktase

ESI Elektrosprayionisation

FAD Flavin-Adenin-Dinukleotid

FMO1-5 Flavin-abhängige Monooxygenase Isoform 1-5

FXR Farnesoid X Rezeptor

γ **BB** γ -Butyrobetain

GFR Glomeruläre Filtrationsrate

GNMT Glycin N-Methyltransferase

GOT Glutamat-Oxalazetat-Transaminase

GPCR G-protein-coupled receptor

GPT Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Hb Hämoglobin
Hkt Hämatokrit
HPLC High performance liquid chromatography
IL Interleukin
IS Interale Standard
LOD Limit of detection
MACE Major adverse cardiovascular event
MCP Monocyte Chemoattractant Protein
mCRPC metastatic chemotherapy-resistant prostate cancer
MCV Mean corpuscular volume
MDR1 Multidrug-Resistance-Protein 1
MMA Monomethylamin
MRM Multiple reaction monitoring
MRP2/4 Multidrug Resistance-Related Protein 2/4
MS Massenspektrometrie
NADPH Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NYHA New York Heart Association
OCT2 Organic Cation Transporter 2
oFTT oraler Fetttoleranztest
oGTT oraler Glucosetoleranztest
PBA Phenylboronic acid
PC Phosphatidylcholin
PEMT Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase
pro-BNP pro-Brain Natriuretic Peptide
SAH S-Adenosylhomocystein
SAM S-Adenosylmethionin
SD Standardabweichung
SPE Solid-phase extraction
TAG Triacylglycerid

THF Tetrahydrofolat
TMA Trimethylamin
TMAO Trimethylamin-N-oxid
TNF Tumornekrosefaktor
TOR Trimethylamin-N-oxid-Reduktase
ULN Upper limit of normal
UPLC Ultraperformance liquid chromatography
VLDL Very-low-density Lipoprotein

1 Einleitung

Cholin und dessen Metabolit Trimethylamin-N-oxid (TMAO) sind mit diversen Erkrankungen assoziiert. Besonderes Interesse derzeitiger Forschung erwecken Ergebnisse, die Assoziationen mit kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus beschreiben. Eine Fehlernährung mit hyperkalorischer Kost reich an Fett und Zucker erklärt die Pathogenese nicht ausreichend.

Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und bei Diabetikern zeigten sich erhöhte TMAO-Konzentrationen im Blut. Diese unterstehen multifaktoriellen Einflüssen durch Ernährung, intestinales Mikrobiom, Funktionalität von Synthesenzymen, Xenobiotika und renale Exkretion. Die Pathomechanismen sind jedoch weitestgehend unbekannt und die Frage, ob TMAO als Verursacher der Pathologien zu betrachten ist und/oder als diagnostischer Marker für Stoffwechselstörungen eingesetzt werden kann, ist noch unbeantwortet.

Diese Arbeit beschäftigt sich thematisch vor allem mit den Zusammenhängen von Metaboliten des Cholin- und TMAO-Stoffwechsels im Glukose- und Lipidmetabolismus. Zudem wird die Wirkung des Xenobiotikums Abirateronazetat auf den TMAO- und Cholin-Stoffwechsel untersucht.

1.1 Trimethylamin-N-oxid (TMAO)

1.1.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

TMAO ist ein farbloser Stoff aus der Klasse der Aminoxide mit der Summenformel $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ [172]. Seine atomare Masse beträgt 75,1 kDa [174]. TMAO liegt meist in Form eines Dihydrats vor und wird beim Menschen größtenteils mithilfe von Darmbakterien aus den Vorläufermolekülen Cholin, L-Carnitin und Betain synthetisiert [172]. Im Raum nimmt es die Form eines Tetraeders ein (siehe Abbildung 1), der drei hydrophobe Methylgruppen und ein freies polares Sauerstoffatom mit Akzeptorfunktion für bis zu drei Wasserstoffbrückenbindungen am Stickstoffatom trägt. Mit einem pK_s -Wert von $4,66 \pm 0,10$ liegt es bei einem physiologischen pH-Wert als nahezu neutrales Zwitterion vor [96, 195].

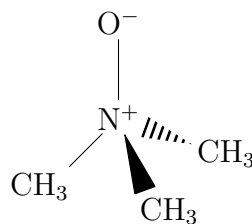


Abbildung 1: TMAO-Konfiguration: tetraedrale Struktur.

Es ist in Wasser gut löslich (Löslichkeit in Wasser: 454 mg/ml). In Körperflüssigkeiten ist

TMAO im Blut, Speichel und Urin gelöst, im Gewebe liegt es im Zytoplasma von Leber, Niere, Epidermis [185] und Skelettmuskel [158] vor.

1.1.2 Physiologische Bedeutung und Funktion

1.1.2.1 Als Osmolyt

Organische Osmolyte erhalten die osmotische Zellhomöostase aufrecht. Zu ihnen zählen Vertreter aus der Gruppe der Kohlenhydrate, Aminosäuren (unter anderem Glycin, Taurin), Methylsulfonen, -aminen (TMAO, Betain) und Harnstoff [191]. Durch seine chemischen Eigenschaften als Osmolyt wirkt TMAO denaturierenden Effekten, wie durch osmotischen Stress von Harnstoff, durch Elektrolyte [189], Druck [190] und tiefe Temperaturen [152] verursacht, entgegen. Wie TMAO sind auch Betain und Taurin Osmolyte, die Protein-stabilisierende Eigenschaften besitzen und der destabilisierenden Wirkung von Harnstoff entgegenwirken. Yancey et al. ordneten die Osmolyte nach ihrer stabilisierenden Potenz: TMAO > Betain > Taurin [188].

Insbesondere bei Tiefseefischen, die großen hydrostatischen und osmotischen Drücken im Salzwasser ausgesetzt sind, erlangt TMAO als Osmolyt Relevanz in der Proteinstabilisierung [72]. Mit zunehmender Habitattiefe nimmt die Menge an protektivem TMAO zu, bis vermutlich in einer Tiefe von 8.000 - 8.500 m ein isoosmotischer Zustand erreicht ist und Tiefseefische in weiterer Tiefe nicht mehr überlebensfähig sind [72]. Gemessene Konzentrationen an TMAO erreichten Werte bis zu 386 ± 18 mmol/kg im Muskelgewebe bzw. Osmolaritäten bis zu 991 ± 22 mOsmol/kg [192]. Zudem dient TMAO als Gefrierschutz bei tiefen Temperaturen [161].

Beim Menschen spielt TMAO in seiner Funktion als Osmolyt vor allem in der Niere und im Darm eine Rolle [172]. Im Nierenmark liegen hohe osmotische Drücke vor (erhöht um das drei- bis fünffache gegenüber dem Blutplasma), um durch Generierung eines osmotischen Gradienten mithilfe von Natrium und Harnstoff den Harn stark aufzukonzentrieren [172]. Um die Nierenzellen vor dem osmotischen Stress zu schützen, hält die menschliche Niere das osmotische Gleichgewicht durch organische Osmolyte kleiner Molekülgröße aufrecht. Insbesondere Taurin, Myo-Inositol, Betain und TMAO werden zu diesem Zweck im Nierengewebe angereichert [95].

Osmotischem Stress nach Nahrungsaufnahme im Darm, bei Diabetes, Störungen des Wasser-/Elektrolythaushalts und hydrostatischen Effekten durch Blutdruckänderungen kann ebenfalls durch TMAO begegnet werden [172].

Die antagonisierende Wirkung von TMAO gegenüber Harnstoff wurde vielfach untersucht. Typischerweise liegen TMAO und Harnstoff im Verhältnis 1:2 vor [23, 189]. TMAO erhöht durch die Antagonisierung die Protein- und Nukleinsäurestabilität (wie der RNA)

im Organismus [59, 172]. Der zugrunde liegende Mechanismus der stabilisierenden Wirkung wird kontrovers diskutiert und ist bisher nicht abschließend geklärt [23, 172, 174].

1.1.2.2 Als chemisches Chaperon

Als chemisches Chaperon akkumuliert TMAO im endoplasmatischen Retikulum und unterstützt ungefaltete Proteine bei der Faltung in ihre nativ-funktionelle Form [12, 15]. Die Eigenschaft eines chemischen Chaperons erhält TMAO nach Tang et al. vermutlich durch seine geringe Molekülgröße und seinen amphiphatischen Charakter [161].

Im Zusammenhang mit Proteininteraktionen wurden zahlreiche Wirkungen entdeckt, darunter: Heraufsetzen der Schmelz- und Übergangstemperatur sowie der freien Energie zur Entfaltung, Förderung der Proteinassoziation und Mikrotubuli-Polymerisation [145]. Bei Enzymen verhindert TMAO ein Absinken der katalytischen Aktivität (Bewahrung der Enzymaktivität) [13] und ermöglicht die Reaktivierung denaturierter Enzyme [189].

1.1.2.3 Als Elektronenakzeptor

Vielen Enterobakterien dient TMAO unter anaeroben Bedingungen als terminaler Elektronenakzeptor in der oxidativen Phosphorylierung (Energiegewinnung) [10]. Es entstehen Methylamine (Tri-, Di-, Monomethylamin), wodurch die Konzentrationen an TMAO gemindert werden [174]. In Luft- und Nitrat-haltiger Umgebung wird der Elektronentransport auf TMAO dagegen gehemmt [10].

Viele Bakterienarten wie z.B. Enterobakterien können TMAO unter anaeroben Bedingungen als Energiequelle nutzen und ihr Wachstum kann durch TMAO gefördert werden (in vitro) [10, 64]. Auf das Bakterium *Staphylococcus aureus*, das mitunter als humanes Pathogen ein Auslöser vieler Erkrankungen (z.B. Osteomyelitis, Endokarditis, Sepsis) ist, wurde hingegen durch Suzuki et al. auch eine wachstumshemmende Wirkung von TMAO beobachtet [156, 172].

1.1.3 TMAO-Stoffwechsel beim Menschen

Der TMAO-Stoffwechsel kann in einen exogenen Weg (direkter Aufnahme von TMAO aus der Nahrung) und einen endogenen Weg (Synthese aus Vorläufermolekülen) unterteilt werden. Abbildung 2 gibt einen Überblick über den TMAO-Stoffwechsel. Cholin und Carnitin sind als Ausgangsprodukte der endogenen Synthese gezeitigt, zusätzlich spielt auch Betain eine Rolle.

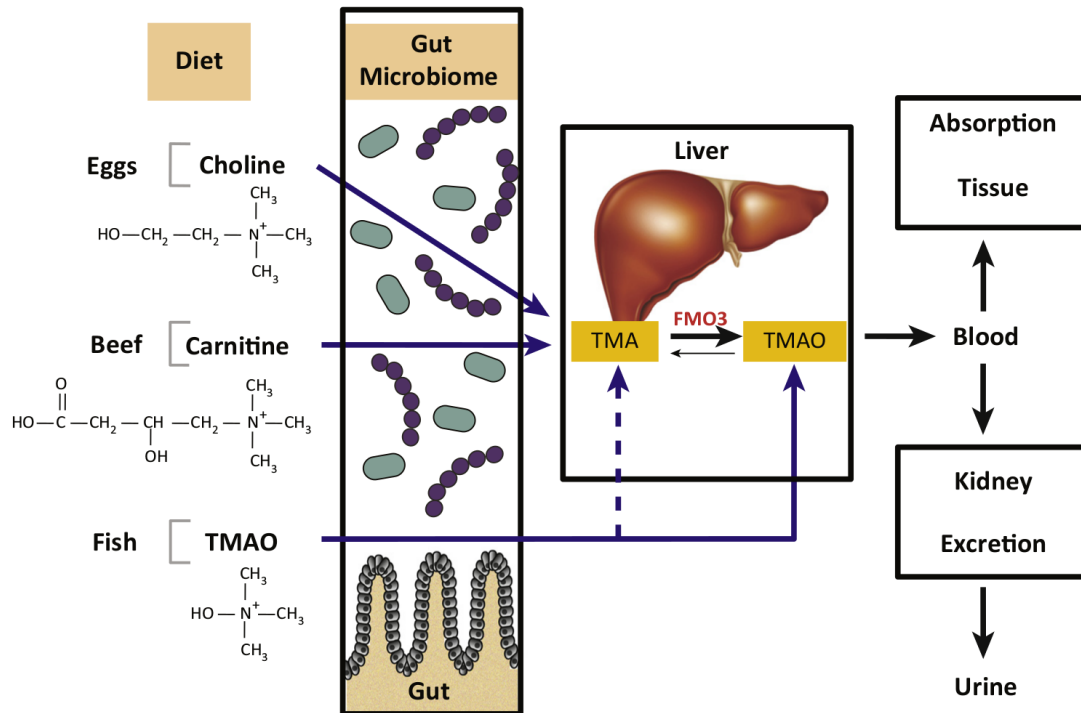


Abbildung 2: Überblick über den TMAO-Stoffwechsel. Exogen wird TMAO direkt aus der Nahrung aufgenommen, im endogenen Weg werden die Ausgangsstoffe wie z.B. Cholin und Carnitin von Darmbakterien zu Trimethylamin (TMA) transformiert. Bild aus Cho CE, Caudill MA (2017) Trimethylamine-N-oxide: Friend, foe, or simply caught in the cross-fire? Trends in Endocrinology & Metabolism 28(2):121-130, Copyright 2016, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [32].

1.1.3.1 Exogener Stoffwechsel

Taesuwan et al. zeigten mithilfe von Isotopenmarkierung, dass TMAO über den Darm direkt, rasch und nahezu vollständig (zu etwa 96 %) aus der Nahrung resorbiert wird. Die Umsatzrate ($0,19 \text{ h}^{-1}$) bezogen auf den Gesamtpool an TMAO ist mit einer durchschnittlichen Umsatzzeit von 5,3 Stunden relativ hoch. Nur ein kleiner Teil wird zu d9-Trimethylamin (d9-TMA) und d9-Dimethylamin (d9-DMA) umgewandelt und mit dem Stuhl ausgeschieden oder in der Leber zur endogenen Synthese verwendet, siehe Abbildung 3.

Bereits 15 Minuten nach oralem d9-TMAO-Konsum war ein Plasmaanstieg zu detektieren. Sein Maximum (Anstieg um 66 - 76 %) erreichte TMAO nach einer Stunde. Die Konzentrationen blieben bis zu 6 Stunden erhöht, zeigten interindividuell allerdings große Schwankungsbreiten [158].

TMAO gelangt über das Blut zur Leber und wird zu weiteren Methylaminen reduziert. Alternativ akkumuliert es im Skelettmuskel als d9-TMAO (Anteil: 36 % des d9-TMAO nach 6 Stunden) und d9-TMA (Anteil: 3,3 % des d9-TMAO nach 6 Stunden) oder wird überwiegend unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung über den Urin ist mit 96 % der aufgenommenen Dosis nach 24 Stunden nahezu vollständig erfolgt.

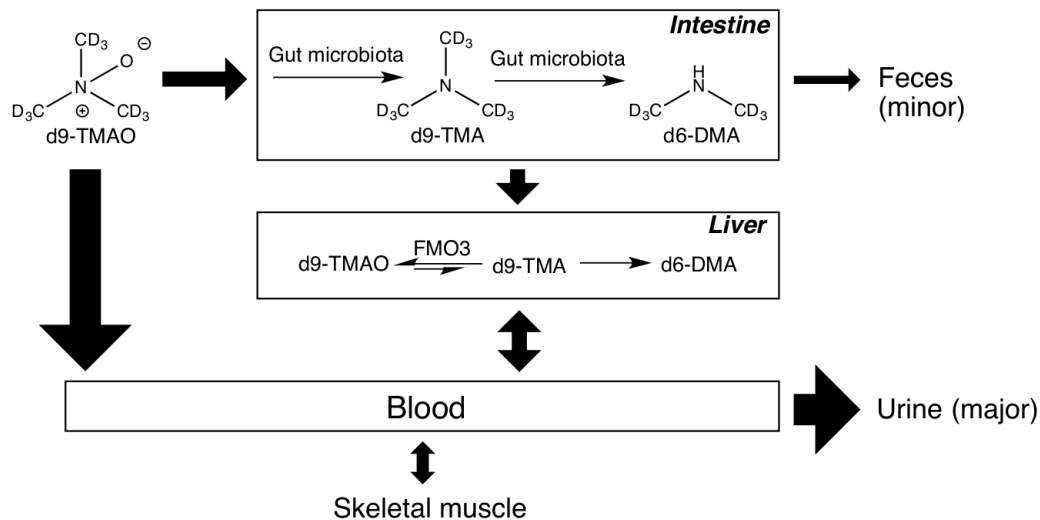


Abbildung 3: Überblick über den exogenen TMAO-Stoffwechsel. Bild aus Taesuwan S, Cho CE, Malysheva OV, Bender E, King JH et al. (2017) The metabolic fate of isotopically labeled trimethylamine-N-oxide (TMAO) in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry* 45:77-82, Copyright 2017, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [158].

Ein kleiner Teil des mit der Nahrung aufgenommenen TMAO wird von Darmbakterien zu TMA und weiteren Methylaminen reduziert. Diese Reaktion wird durch die bakterielle TMAO-Reduktase (TOR) und Dimethylsulfoxid-Reduktase (DMSOR) katalysiert [10, 100, 144]. TMA kann entweder enteral resorbiert werden, wie TMAO, und als obligates Zwischenprodukt dem endogenen Weg zugeführt oder mit dem Stuhl ausgeschieden werden [158].

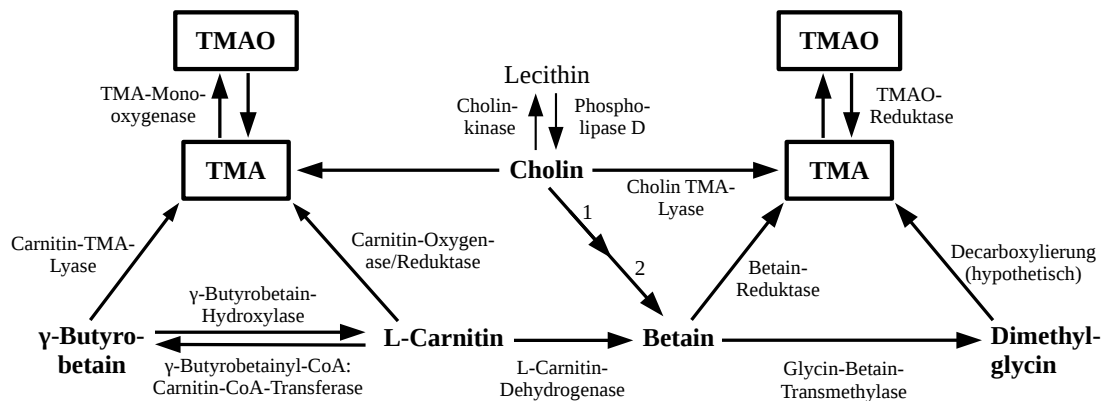
Umgekehrt kann bei mikrobiellen Inflammationsreaktionen, bei denen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies wie Peroxynitrit, Superoxid, Hydrogenperoxid und Hypochlorit entstehen, TMA zu TMAO oxidiert und im Darm aufgenommen werden [184].

1.1.3.2 Endogener Stoffwechsel

Im endogenen Stoffwechsel erfolgt die Synthese von TMAO ausgehend von TMA-enthaltenden Stoffen, die mit der Nahrung zugeführt werden: Cholin (bzw. Phosphatidylcholin) [160, 175], L-Carnitin [78] und Betain [177].

Im Folgenden werden die genannten Ausgangsstoffe hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer physiologischen Bedeutung und Verstoffwechslung zu TMAO kurz beschrieben. Zwischenprodukt der endogenen Synthese ist immer TMA, das enzymatisch zu TMAO oxidiert wird. Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die im Folgenden beschriebenen endogenen Stoffwechselwege.

Cholin stellt im Vergleich zu L-Carnitin und Betain den wichtigsten Ausgangsstoff der TMA-Synthese dar [71]. Cholin ist ein essentieller Nährstoff, der endogen synthetisiert wird, zur Deckung des Bedarfs allerdings exogen zugeführt werden muss [199]. In der Nahrung kommt Cholin auch in Form von Phospho-, Glycerophospho-, Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin vor [201]. Hohe Konzentrationen an Cholin enthalten Rinder-



1. Cholindehydrogenase
2. Betainaldehyd-Dehydrogenase

Abbildung 4: Überblick über die endogenen TMAO-Stoffwechselwege und deren Verknüpfung. TMA ist obligatorisches Zwischenprodukt der TMAO-Synthese. Bild nach Fennema et al. [52].

und Hühnerleber, Eier, Weizenkeime, Schinken, getrocknete Sojabohnen und Schweinefleisch [201].

Die physiologischen Funktionen von Cholin-Derivaten bei Stoffwechselprozessen zeigt Tabelle 1. Als Methylgruppendonator aus der Nahrung stellt Cholin die wichtigste Quelle dar und ist in viele metabolische Vorgänge wie auch Detoxifikationen involviert [150]. Neurologisch ist es unter anderem bei Feten an der Entwicklung des Gehirns und Gedächtnisses beteiligt [202].

Ein Mangel manifestiert sich mitunter in einer Leberdysfunktion (Fettleber) [199], Muskelschäden [54], einem veränderten C1-Stoffwechsel [202], neurologischen Ausfallerscheinungen [161], Krebs und einer Risikoerhöhung zur Entwicklung von Herzkrankungen [202]. Zur Vermeidung von Komplikationen durch Cholindefizienz oder -überschuss empfiehlt das *Food and Nutrition Board* des *U.S. Institute of Medicine* (1998) eine adäquate tägliche Aufnahme von 550 mg Cholin für Männer und 425 mg für nichtstillende Frauen über 18 Jahre [68].

Tabelle 1: Physiologische Funktionen von Cholin-Derivaten im menschlichen Stoffwechsel [121, 200].

Cholinderivat	Funktion
Phospholipide	Erhalt der strukturellen Integrität von Zellmembranen, intrazelluläre Signaltransduktion, Lipoproteinstoffwechsel (u.a. hepatischer VLDL-Export)
Acetylcholin	cholinerge Neurotransmission
Betain	Methylgruppendonator (Reduktion von Homocystein zu Methionin, siehe Seite 25 Abbildung 11), renaler Osmolyt

Fleisch und Milchprodukten durch passiven und aktiven Transport von Enterozyten absorbiert [130]. Bei Ernährung mit niedrigem L-Carnitingehalt (<1 g, wie z.B. bei Vegetariern) werden bis zu 75 %, mit hohem (>6 g, bei Omnivoren) zwischen 5 und 10 % im Dünndarm absorbiert, der Rest wird durch Bakterien zu γ -Butyrobetain (γ BB) und TMA abgebaut [55, 129, 151]. Zu kleinen Teilen wird L-Carnitin aus Lysin und Methionin endogen produziert. Seine Hauptfunktion besteht im Transport langkettiger Fettsäuren aus dem Zytosol in die Mitochondrien zur β -Oxidation (Energiestoffwechsel) [52, 78, 99]. Durch diätetische Applikation markierten L-[Methyl- 3 H]-Carnitins zeigten Rebouche et al., dass bis zu 39 % zu [3 H]-TMAO metabolisiert mit dem Urin ausgeschieden werden [129].

ENDOGENER SYNTHESWEG VON L-CARNITIN ZU TMA

Durch direkte Spaltung einer C-N-Bindung im L-Carnitinmolekül oder über eine Reaktion mit dem Zwischenprodukt γ BB erfolgt die TMA-Synthese aus L-Carnitin [79], siehe Abbildung 6. Die Bildung von γ BB aus L-Carnitin erfolgt weiter proximal im Darm (distales Jejunum/Ileum) als die Bildung von TMA (Caecum/proximaler Dickdarm). Bei gesättigtem Transport von L-Carnitin im Dünndarm wird das restliche L-Carnitin in weiter distal gelegenen Darmabschnitten bakteriell umgewandelt [79, 78].

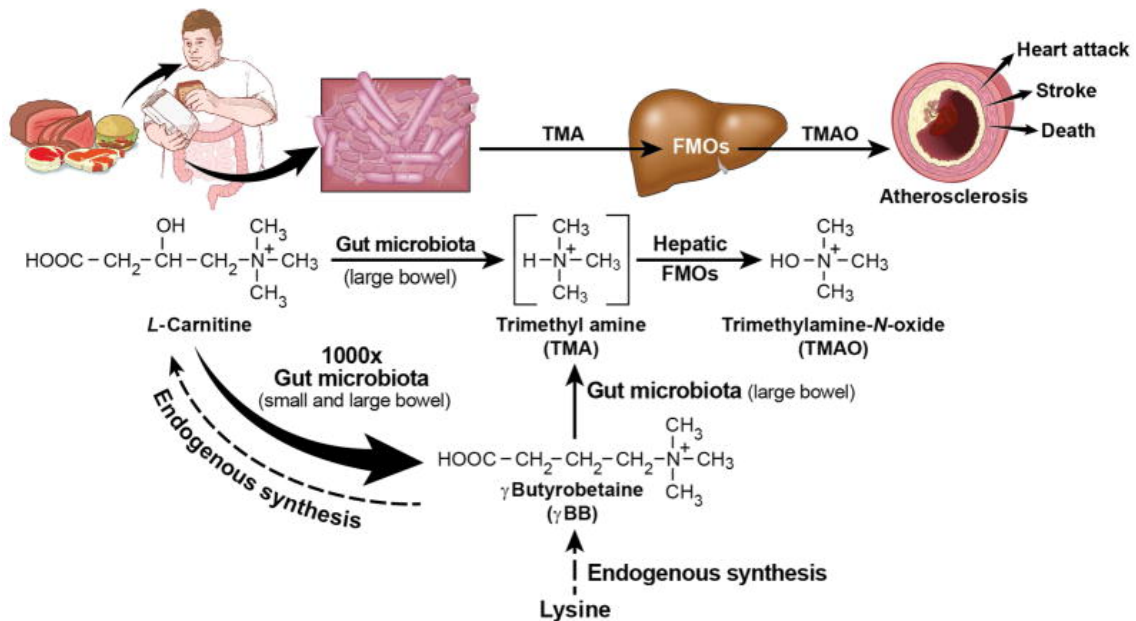


Abbildung 6: TMAO-Synthese aus L-Carnitin: Durch Mikrobionten des Darms wird L-Carnitin direkt oder über die Zwischenstufe γ -Butyrobetain zu TMA transformiert. Eine endogene Synthese aus Lysin über γ -Butyrobetain existiert ebenfalls. Bild aus Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z et al. (2014) γ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. Cell Metabolism 20(5):799-812, Copyright 2014, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [79].

Beide Stoffwechselwege werden durch bakterielle Enzyme katalysiert. Für die direkte Spaltung zu TMA entdeckten Zhu et al. eine Oxygenase/Reduktase vom Rieske-Typ (CntAB), die in den bakteriellen Phyla der Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria und Firmicutes vorkommt [207].

Die Umsetzung von L-Carnitin über γ BB zu TMA erfolgt mit etwa 1000-fach höherer Umsatzrate als die TMA-Bildung durch direkte Spaltung des L-Carnitinmoleküls, wie Koeth et al. bei Mäusen nachwiesen [79]. Im Vergleich zur direkten Spaltung des L-Carnitinmoleküls beginnt die Reaktion über γ BB bereits im vergleichsweise bakteriell wenig besiedelten Dünndarm, siehe Abbildung 6. Über die beteiligten bakteriellen Enzyme und biochemischen Mechanismen ist bisher wenig bekannt. Der erste Schritt vom L-Carnitin zum γ BB wird durch die γ -Butyrobetain Hydroxylase katalysiert [99]. γ BB reagiert anschließend durch die Carnitin-TMA-Lyase zu TMA weiter. Die Carnitin-TMA-Lyase arbeitet unspezifisch und setzt neben γ BB weitere Trimethylaminderivate wie Carnitin, Cholin und Betain direkt zu TMA um [79].

Betain (N,N,N-Trimethylglycin) ist ein neutral reagierendes quartäres Ammoniumion und liegt als stark polares Zwitterion vor [91]. Es fungiert vor allem als Osmolyt und Methyl donor [38]. Betain ist in vielen Nahrungsmitteln enthalten und kann aus Cholin und L-Carnitin synthetisiert werden [52].

Reich an Betain sind Meerestiere (vor allem Muscheln), Getreideprodukte und Gemüse wie Mangold, Rote Bete und Spinat [45]. Nach Aufnahme im Dünndarm [38] wird Betain im Blut gelöst transportiert (ca. 20 - 70 μ M) [42] und akkumuliert im Gewebe. In Leber und Niere erreicht es die höchsten Konzentrationen (1,6 - 9,5 bzw. 2,0 - 5,4 mM) [146].

Die Betain-Synthese via Darmbakterien erfolgt durch die Oxidation von Cholin bzw. L-Carnitin durch Dehydrogenasen (DH) [3, 52, 99]:



Darmbakterien können Betain zu TMA umsetzen, wie in wenigen Studien gezeigt wurde [52, 177]. Zudem wiesen Wang et al. eine gesteigerte TMAO-Produktion durch orale Betainaufnahme nach, die von Darmbakterien abhängig ist [177]. Fennema et al. verweisen auf zwei mögliche Wege zur TMA-Produktion [52]:

1. Fermentierende Oxidoreduktion (Stickland-Reaktion) mit den Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin zu TMA und Azetat, katalysiert durch die Betain-Reduktase [111].
2. Durch die Glycin-Betain-Transmethylase erfolgt eine Demethylierung zu Dimethylglycin (DMG) und eine anschließende Decarboxylierung zu TMA.

TMA-Stoffwechsel: Reaktion zu TMAO

TMA liegt bei Temperaturen über 2,9°C als aminartig riechendes Gas vor [67]. Da es sowohl in Wasser unter Hydrolyse [67] als auch in Fett löslich ist, kann es sich ubiquitär im Körper verteilen [107].

Das von Mikrobionten gebildete TMA wird von Enterozyten absorbiert und in den Blutstrom abgegeben [32]. TMA wird beim Gesunden fast ausschließlich zu TMAO umgesetzt, nur wenige Prozent werden alternativ demethyliert oder unverändert ausgeschieden [2, 52, 107, 205]. Durchschnittlich werden bei westlicher Ernährung täglich etwa 50 mg TMA gebildet, von denen über 90 % als TMAO mit dem Urin eliminiert werden und 1 - 2 mg unverändert als TMA [105]. Die gemessenen TMA- und TMAO-Konzentrationen im Urin übersteigen bisweilen die Plasmakonzentrationen, was auf renal-tubuläre Sekretionsprozesse schließen lässt [149, 163].

Die Reaktion von TMA zu TMAO erfolgt mithilfe der Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Cofaktor. Beim Menschen kommen fünf Isoformen (FMO1-5) vor, von denen alle mit Ausnahme der FMO5 die Oxygenierung von TMA zu TMAO katalysieren [86]. Die FMO3 arbeitet mit der höchsten Spezifität und Effektivität [86]. Die höchsten Konzentrationen werden in der Leber erreicht [122], wo die größte und relevanteste TMAO-Produktion stattfindet [86].

Wird die Produktion von geruchsneutralem TMAO durch eine strukturelle Veränderung der FMO3 vermindert oder unterbunden, kommt es zur Trimethylaminurie (auch: Fish-Odor-Syndrom) [47]. Die Betroffenen weisen durch die TMA-Ausscheidung mit dem Urin, dem Schweiß und der Ausatemluft sowie durch andere Sekretionsquellen einen fischartigen Geruch auf [107]. Der Anteil heterogener Träger in der britischen Bevölkerung wird auf 1 % geschätzt [105].

1.1.3.3 Ausscheidung

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3.1 beschrieben erfolgt die Ausscheidung von TMAO über den Urin. Al-Waiz et al. wiesen nach oraler Applikation von C14 markierten TMA und TMAO eine urinale Ausscheidung zu über 95 % binnen 24 Stunden als TMAO nach [1]. Über den Stuhl wird hingegen kein TMAO ausgeschieden [158].

Teft et al. untersuchten das renale Transportsystem zur Ausscheidung von TMAO [166]. Demnach erfolgt die Aufnahme von TMAO aus dem Blut in die Nierenzellen hauptsächlich über den organischen Kationentransporter 2 (OCT2), der Efflux in den Urin über multiple Transporter der ABC-Familie (ATP-binding cassette) wie durch das Breast Cancer

Resistance Protein (BCRP) und Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR1), siehe Abbildung 7. Genetische Varianten der Transporter beeinflussen mit Ausnahme des BCRP die zirkulierenden TMAO-Spiegel im Blut nicht [166]. Im Gegensatz zu Teft et al. stehen die Schlüsse von Dambrova et al., die OCT2 nicht in Verbindung mit dem TMAO-Transport sahen [40]. Der Ausscheidungsvorgang in der Niere ist derzeit noch nicht abschließend geklärt.

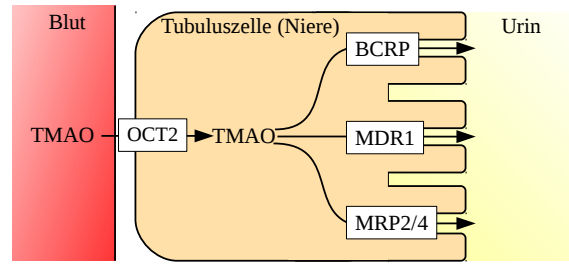


Abbildung 7: Transportsystem der Niere zur TMAO-Ausscheidung. BCRP: Breast Cancer Resistance Protein, MDR1: Multidrug-Resistance-Protein 1, MRP2/4: Multidrug Resistance-Related Protein 2/4, OCT2: Organic Cation Transporter 2. Bild nach Teft et al. [166].

1.1.4 Exkurs: Bedeutung des intestinalen Mikrobioms

MIKROBIELLE ARTENDIVERSITÄT

Für die endogene TMAO-Synthese sind intestinale Mikrobionten unabdingbar. Die Zahl der einen einzigen menschlichen Körper kolonisierenden intestinalen Mikroorganismen wird derzeit auf bis zu 100 Billionen [182] mit einem Zellanteil von bis zu 90 % des menschlichen Körpers geschätzt [48]. Bei der Mehrzahl der im Darm detektierten mikrobiellen Gene handelt es sich um bakterielle. Die Anzahl der bakteriellen Spezies im Darm beläuft sich auf etwa 1000 - 1150 in der Gesamtheit der menschlichen Population und auf etwa 160 bei einem Individuum [126]. Viele Bakterienarten sind weit verbreitet, die interindividuelle Häufigkeit variiert allerdings stark [126]. Man geht davon aus, dass ein festes bakterielles Grundensemble an Spezies und Genen (in der englischsprachigen Literatur als *core gut microbiota* und *core microbiome* bezeichnet) für die physiologische Darmfunktion verantwortlich ist. Zudem existiert jedoch eine individuelle Artendiversität [126, 171].

An der TMAO-Synthese über TMA aus den in Abschnitt 1.1.3 beschriebenen Ausgangsstoffen sind verschiedene Bakterienarten beteiligt. Die folgende Tabelle 2 nach Fennema et al. zeigt die Bakterienarten, die nachweislich an der TMA-Produktion mitwirken [52]. An der Entwicklung von Pathologien sind nach Ussar et al. das Vorkommen bestimmter bakterieller Taxa entscheidend [173]. Ebenso korreliert die Artendiversität mit der Funktionalität des menschlichen Stoffwechsels. Großer Artenreichtum wird mit einem gesunden Organismus [89], ein Verlust an Arten mit der Entstehung von Krankheiten in Zusammenhang gebracht (u.a. Obesitas [171], Diabetes mellitus Typ 2 [87] und chronisch entzündliche Darmerkrankungen [117]). Durch die Nahrungsmittelwahl und dem damit einhergehenden Angebot an ausgewählten Nährstoffen im Darm kommt es unter den Mikroorganismen zur natürlichen Selektion [61]. Auf ein verändertes Nährstoffangebot reagiert die Darmflora innerhalb weniger Tage [61]. Es ist eine Korrelation zwischen

Tabelle 2: Zusammenstellung von Bakterienphyla und -arten mit Fähigkeit zur TMA-Synthese aus verschiedenen Ausgangsstoffen. Tabelle nach Fennema et al. [52].

Ausgangsstoff	Phylum	Genus/Spezies
TMAO	Actinobacteria	Micrococcus, Mobiluncus
	Firmicutes	Bacillus, Clostridium, Staphylococcus, Sarcina, Streptococcus
Cholin	Proteobacteria	Alcaligenes, Campylobacter, Citrobacter, Escherichia, Proteus, Pseudomonas
	Actinobacteria	Mobiluncus, Olsenella
	Bacteroidetes	Bacteroides
	Firmicutes	Anaerococcus, Clostridium, Desulfotobacterium, Enterococcus, Streptococcus
Carnitin	Proteobacteria	Desulfovibrio, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Yokenella
	Proteobacteria	Acinetobacter, Citrobacter, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas
Betain	Firmicutes	Clostridium, Eubacterium, Sporomusa

abwechslungsreicher Ernährung und mikrobieller Diversität zu verzeichnen; es gilt: je größer der Artenreichtum ist, desto resistenter ist auch das Ökosystem gegenüber Störungen [61].

WIRKUNGEN DES MIKROBIELLEN CO-METABOLISMUS AUF MENSCHLICHE STOFFWECHSELPROZESSE

Die Wirkung der Mikroorganismen auf biochemisch-metabolische Prozesse des menschlichen Körpers wird direkt durch bakterielle Strukturen wie z.B. durch das endogene Lipopolysaccharid [24, 168] und durch Stoffwechselprodukte des mikrobiellen Co-Metabolismus im Darmlumen hervorgerufen. Die mikrobiellen Metabolite wirken an Rezeptoren des Darmepithels z.B. via G-protein-coupled receptors (GPCRs) [90] und lösen intrazelluläre Kaskaden aus, können aber auch über die Darmschleimhaut in den Körper aufgenommen und dort weiter verstoffwechselt werden (siehe z.B. TMA als Vorstufe des TMAO Abschnitt 1.1). Durch den Blutstrom nehmen sie neben dem Verdauungstrakt Einfluss auf weitere Gewebe und Organe wie Leber, Hirn, Fett- und Muskelgewebe [168]. Mikroorganismen werden mit verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Entscheidend ist ein Wechselspiel zwischen Mikroorganismen, Umweltfaktoren und der genetischen Ausstattung des menschlichen Organismus (siehe z.B. [173]). Beobachtet wurde eine Beeinflussung der Effizienz der Kalorienaufnahme aus der Nahrung und eine Assoziation mit der Entstehung von Adipositas [170] sowie eine Beeinflussung des Insulinstoffwechsels [173].

Tabelle 3: Die wichtigsten Nahrungsquellen mit den höchsten Konzentrationen an TMAO bzw. Ausgangsstoffen der endogenen TMAO-Synthese.

Stoff	Nahrungsmittel	Referenz
Betain	Weizenprodukte, Quinoa, Rote Bete, Spinat	[202]
Cholin (inkl. Derivate)*	Leber, Eier, Weizenkeime	[202]
L-Carnitin	rotes Fleisch	[120]
Phosphatidylcholin	Rinderleber, Eier, Hühnerleber	[201]
TMAO	Fische, Krustentiere	[106]

* Cholinderivate: Phospho-, Glycerophospho-, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin

1.1.5 Einflussfaktoren auf TMAO-Konzentrationen in Blut und Urin

Die durchschnittliche Konzentration von TMAO im Blutplasma beträgt beim Gesunden etwa $3,5 \mu\text{M}$; höhere Werte liegen bei Menschen mit kardiovaskulären Erkrankungen (Median: $5,0 \mu\text{M}$) [160], Diabetes ($4,4 \mu\text{M}$) [165] und Niereninsuffizienz (bis zu $40 \mu\text{M}$) vor [172]. Die intrazellulären Konzentrationen bzw. Konzentrationen in anderen Geweben sind beim Menschen bisher wenig erforscht [172].

Intraindividuelle Konzentrationsschwankungen von TMAO im Nüchternblut sind bei stabilen Ernährungsgewohnheiten nicht stark ausgeprägt, jedoch stärker als bei Betain, Cholin und Dimethylglycin (DMG) [84, 115]. Mitunter wurde eine zirkadiane Rhythmik der Urinkonzentrationen von TMAO beobachtet [58]. Nachweislich beeinflussen diverse Faktoren wie Ernährung, Mikrobiom des Darmes, FMO3-Genetik und -Aktivität sowie Medikamente die TMAO-Konzentrationen in Blut und Urin. Sie sind in komplexen Mechanismen miteinander verknüpft. Physiologisch liegen bei großem Body-Mass-Index (BMI), im Alter [41] und während der Schwangerschaft im maternalen Blut (auch: Cholin \uparrow , DMG \uparrow , Betain \downarrow) [148] höhere TMAO-Spiegel vor. Einflüsse des Geschlechts werden kontrovers diskutiert: Während in einigen Studien bei Männern höhere Plasmakonzentrationen gemessen wurden als bei Frauen [116, 134], zeigte sich in anderen Studien kein geschlechtsabhängiger Unterschied [41, 176].

1.1.5.1 Ernährung und intestinales Mikrobiom

Nahrungsmittel enthalten unterschiedliche Konzentrationen an TMAO und seinen Vorläufermolekülen. Die wichtigsten Nahrungsquellen für TMAO und die Ausgangsstoffe zu seiner endogenen Synthese zeigt Tabelle 3. Je nach Nahrungsmittel und aufgenommener Menge variieren die Konzentrationen zugeführter TMAO- und TMA-haltiger Stoffe in Blut und Urin [32].

Hohe Konzentrationen an TMAO finden sich insbesondere in Tiefseefischen und Krustentieren [33, 52, 158]. Nach Fischkonsum steigen die TMAO-Konzentrationen postprandial in Blut und Urin ca. fünfzigmal stärker an als nach Ei- oder Rindfleischkonsum (hoher

Cholin- bzw. Carnitin-Gehalt) [33]. Krüger et al. detektierten im Gegensatz zu Fischkonsum nach Fleischaufnahme einen halb so hohen TMAO-Anstieg im Plasma, jedoch keinen Anstieg im Urin [83].

Die Wirkung Cholin-haltiger Nahrung (Eiverzehr) auf die TMAO-Konzentration in Blut und Urin ist individuell unterschiedlich. Ein entscheidender Faktor scheint dabei die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms zu sein [32, 103]. Bei Probanden mit hoher TMAO-Antwort auf Ei- und Fleischaufnahme im Vergleich zu Probanden mit niedriger TMAO-Antwort fanden sich mehr Bakterien aus dem Phylum der Firmicutes als der Bacteroidetes [33].

Cholin und L-Carnitin kommen vor allem in tierischer Nahrung vor. Durch die Ernährungsform (omnivor, vegetarisch, vegan) erfolgt langfristig eine mikrobielle Selektion [209], sodass Omnivoren dadurch im Vergleich zu Vegetariern und Veganern eine höhere Kapazität zur TMAO-Generation besitzen [19]. Die Baseline-Konzentrationen im Plasma sind bei Omnivoren höher und steigen nach L-Carnitinkonsum stärker an als bei Vegetariern/Veganern [78].

Einige Nahrungsmittel senken die FMO3-Aktivität und verändern den Metabolismus von TMAO. Dazu zählen Grapefruitsaft und Indol-haltiges Gemüse (Brokkoli, Rosenkohl, Weißkohl, Blumenkohl, Grünkohl und Pak Choi) [158]. Akuter hoher Fettkonsum steigert postprandial die Plasmakonzentrationen an TMAO bis zu vier Stunden anhaltend, während die Nüchternblutwerte stabil bleiben [19]. Nach längerer hochkalorischer und fettreicher Ernährung über vier Wochen wurden gegenüber den Ausgangskonzentrationen ebenfalls erhöhte TMAO-Plasmawerte gemessen, während sich die L-Carnitin-, Cholin- und Betain-Konzentrationen nicht änderten [18]. Da diese Erhöhung jedoch durch eine insgesamt erhöhte Cholin- und Carnitin-Aufnahme in fettreicher Nahrung zustande gekommen sein kann, ist das Ergebnis dieser Studie mit Vorsicht zu betrachten und bedarf weiterer Abklärung [19].

Untersuchungen zum Einfluss von ballaststoffreicher Kost auf den TMAO-Spiegel fallen widersprüchlich aus. Es wurden sowohl reduzierte als auch gestiegene TMAO-Werte beobachtet [16, 206]. Proteinarme Ernährung führte bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu sinkenden TMAO-Plasmakonzentrationen und könnte womöglich bei Nierengesunden ähnliche Wirkung zeigen [98]. Proteinreiche Ernährung hingegen bewirkte einen Anstieg der TMAO-Exkretion im Urin [128].

1.1.5.2 FMO3-Genetik und -Aktivität

Es existieren mehr als 300 Polymorphismen der FMO3 [203], die in der Weltbevölkerung nach ethnischer Herkunft unterschiedlich verteilt sind. Die vorliegende Genvariante beeinflusst die katalytische Aktivität. [81, 123]. Im Extremfall führt eine Loss-of-Function-Mutation des FMO3-Gens zum vollständigen Erliegen der TMAO-Produktionsfähigkeit mit Anhäufung von TMA in Atem, Schweiß und Urin, bekannt unter dem Krankheitsbild Trimethylaminurie (Synonym: Fish-Odor-Syndrom) [86, 123].

Die Expression der FMO3 beginnt post natum (teilweise bereits in niedrigen Leveln während der Embryonalperiode) und steigt bis zum Erreichen des Erwachsenenalters (18 Jahre) [80]. Interindividuelle Schwankungen um das 2- bis 20-fache wurden beobachtet, denen vermutlich genetische Einflussfaktoren zugrunde liegen [80, 118, 123].

Abhängig von den Expressionsleveln variieren die Plasmakonzentrationen an TMAO: Bei Mäusen bewirkte eine Überexpression ein Ansteigen, während Silencing zum Abfall führte [14, 141]. Die Expressionsmenge bestimmt die katalytische Kapazität. Durch Aufnahme großer Mengen an TMA kann die Kapazität ausgeschöpft sein (beobachtet auch bei Patienten mit hoher therapeutischer Cholin-Aufnahme bei Chorea Huntington) [105]. Der maximale katalytische TMA-Umsatz zu TMAO ist erreicht und das übrige TMA wird unverändert mit dem Urin ausgeschieden (sekundäre Trimethylaminurie) [105].

In Bezug auf die Expressionslevel der FMO3 ist eine Regulation durch Geschlechtshormone und/oder das Geschlecht kontrovers diskutiert worden [14, 80]. Hinweise auf Aktivitätsveränderungen durch Geschlecht und Geschlechtshormone (vor allem Testosteron als Suppressor) lieferten Beobachtungen bei Nagetieren (Mäuse/Ratten) [14, 50, 51]. Beim Menschen zeigten sich bei Frauen während der Menstruation ein Ansteigen der TMA- und ein reziproker Abfall der TMAO-Konzentrationen im Urin (bei Patientinnen mit Trimethylaminurie) [204] sowie eine Abnahme der FMO3-Aktivität um 30 - 40 % (auch bei gesunden Frauen) [142]. Ayesha et al. notierten zudem, dass hohe Testosteronkonzentrationen bei Männern die TMAO-Level durch reduzierte FMO3-Kapazität senken [7, 52, 107]. Diese Ergebnisse lassen geschlechtshormonelle Einflüsse auf die FMO3-Regulation vermuten.

Dazu passend wiesen Bennett et al. bei Männern eine geringere hepatische Expression der FMO3 nach als bei Frauen [14]. Bei Koukouritaki et al. stellten sich hingegen bei jungen Erwachsenen (11 - 18 Jahre) im Pubertätsalter keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Expression dar [80]. Insgesamt wurden bisher nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von Geschlechts- und Hormonabhängigkeiten auf die FMO3-Aktivität beim Menschen durchgeführt und bedürfen der weiteren Klärung.

Weiterhin wurden modulierende Effekte auf Expression und Aktivität der FMO3 durch

Nahrungsmittel (siehe Abschnitt 1.1.5.1), Medikamente [143], Gallensäuren (Induktion via nukleärem Farnesoid X Rezeptor (FXR)) [14], Insulin [102] und weitere Umweltstoffe [167] beobachtet.

1.1.5.3 Nierenfunktion

Die TMAO-Konzentrationen sind mit dem Grad der renalen Funktion assoziiert. Die glomeruläre Filtrationsrate bestimmt neben den TMAO- auch die Betain- und Cholin-konzentrationen und ist mit den TMAO- und Cholinwerten invers, mit Betain positiv korreliert [104]. Hämodialysepatienten besitzen höhere TMAO-Serumkonzentrationen als Patienten mit normaler Nierenfunktion [73]. Durch Dialyse werden diese Konzentrationen gesenkt [9]. Nach einer Nierentransplantation normalisieren sich die Spiegel wieder [104].

Serkova et al. beschrieben, dass das Nierenmark TMAO synthetisiert und bei Nierenschäden in das Plasma abgibt [139]. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob das Ansteigen des TMAO-Plasmaspiegels auf einer verminderten Elimination durch herabgesetzte Nierenleistung oder auf einer vermehrten Produktion bei chronischen Nierenerkrankungen beruht [174].

1.1.5.4 Inflammationsprozesse

In einigen Studien wurden Zusammenhänge von Inflammationsmarkern wie CRP mit den TMAO-Spiegeln diskutiert [73, 164, 169]. Die Studien fußten allerdings auf Daten von Teilnehmern mit Herz- oder Nierenerkrankungen. In zwei Studien an gesunden Probanden zeigten sich keine Assoziationen von TMAO-Plasmaspiegeln mit CRP oder Interleukin-6 (IL-6), aber mit dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und zwei löslichen TNF-Rezeptoren [103, 133]. Die Studie von Miller et al. umfasste jedoch eine sehr geringe Fallzahl [103].

Weitere Hinweise für eine inflammatorische Wirkung von TMAO fanden sich bei Mäusen [26], in fetalen humanen Kolonzellen [196] sowie in Endothelzellen der Karotiden [17] und der humanen Umbilikalvenen [154].

1.1.5.5 Therapiekonzepte zur Senkung der TMAO-Spiegel durch Xenobiotika (Medikamente und Umweltstoffe)

Xenobiotika sind körperfremde chemische Stoffe, die von einem Organismus aufgenommen, metabolisiert und eliminiert werden können. Sie besitzen in ihm keine physiologische Funktion, können jedoch Stoffwechselforgänge beeinflussen. Häufig sind Xenobiotika androgenen Ursprungs. Zu ihnen zählen neben Umweltstoffen z.B. aus der Nahrung auch Medikamente und Kunststoffe.

Da diverse Assoziationen von TMAO-Konzentrationen mit Krankheiten beobachtet wur-

den (siehe Abschnitt 1.1.7), diskutiert man Strategien zur therapeutischen Senkung der TMAO-Spiegel mit potentiell positivem Nutzen auf die Gesundheit [174, 203]. Diverse Xenobiotika mit unterschiedlichen Angriffspunkten in der TMAO-Synthese wirken modulierend auf den Stoffwechsel und stellen potentielle Therapeutika dar, siehe Abbildung 8. Eine Übersicht über modulierende Xenobiotika gibt Tabelle 4.

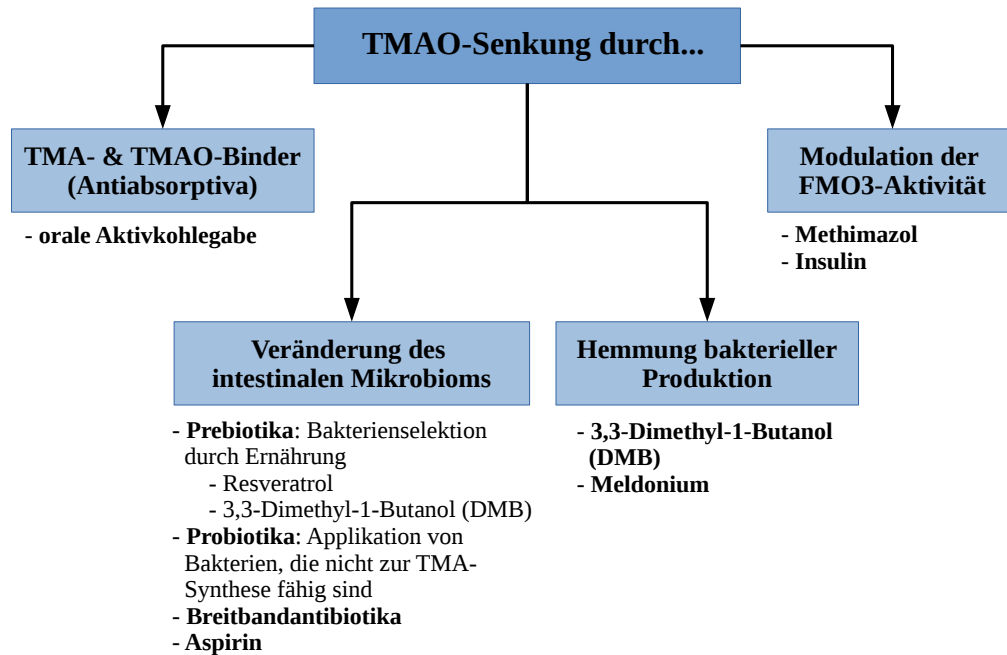


Abbildung 8: Therapeutische Strategien zur Senkung der Konzentrationen an TMAO.

Viele Strategien setzen an der Beeinflussung des Mikrobioms an. Selektionsdruck auf das Mikrobiom durch die Ernährung (prebiotisch) und durch Verabreichung von Bakterien ohne Fähigkeit zur TMA-Synthese (probiotisch) wurden untersucht. Prebiotische Effekte werden z.B. durch ballaststoffreiche Nahrung erzielt [21]. Auch Resveratrol und 3,3-Dimethyl-1-Butanol (DMB) besitzen prebiotische Eigenschaften. Resveratrol, das in Trauben und Beeren enthalten ist, steigert die Bacteroidetes- und senkt die Firmicuteszahl [27]. DBM kommt in Balsamicoessig, Rotwein, einigen Oliven- und Traubenkernölen vor. Es reduziert die Zahl TMA-produzierender Mikrobionten und hemmt einige bakterielle TMA-Lyasen [178]. Einflüsse der Ernährung auf die TMAO-Produktion und das Mikrobiom wurden bereits in Abschnitt 1.1.5.1 dargestellt.

Probiotikagabe verfolgt den Ansatz, durch Aufnahme von Bakterien vorteilhafte Wirkungen auf das intestinale Mikrobiom zu erzielen [21]. Als Prinzipien liegen dem Remodeling des Mikrobioms [162] bakterieller Mutualismus und horizontaler Gentransfer zugrunde [21]. Die Schwierigkeit besteht darin, eine relevante Änderung im relativ konstant bleibenden *core microbiome* herbeizuführen [162]. Boutagy et al. beobachteten entsprechend keine signifikante Änderung der TMA-produzierenden Mikrobionten nach

Tabelle 4: Medikamente und Umweltstoffe, die die Konzentrationen von TMAO im Blutplasma und Urin beeinflussen können, sowie ihre Angriffspunkte im TMAO-Stoffwechsel.

Medikament/Stoff	Wirkort im TMAO-Stoffwechsel	Referenz
Antihypertensiva	Mechanismus nicht bekannt, [TMAO]* ↑ (β-Blocker, Calciumantagonist)	[116]
Aspirin	Hypothese: Änderung des Mikrobioms Cholin-induzierte TMAO-Anstiege ↓	[208]
Breitbandanti- biotika	Abtötung/Inhibierung intestinaler Mikrobionten (transiente Suppression mit zeitlich individueller Restitutio ad integrum)	[78, 160]
3,3-Dimethyl-1- Butanol (DMB)	Inhibierung bakterieller TMA-Lyasen, [TMA]* ↓, Remodeling des Mikrobioms	[178]
Diuretika	Mechanismus nicht bekannt, [TMAO]* ↑	[116]
Meldonium	reduzierte TMA-Produktion durch Mikrobionten [TMAO]* ↓	[40, 85]
Insulin	FMO3-Suppression, [TMAO]* ↓	[102]
Metformin	Datenlage ist kontrovers, Mechanismus nicht bekannt, [TMAO]* ↑	[66, 116]
Methimazol	kompetitive Inhibierung der FMO3	[143]
Resveratrol	Remodeling des Mikrobioms: Minderung TMA-produzierender Bakterienarten	[27]
Statine	Mechanismus nicht bekannt, [TMAO]* ↑	[116]

*Konzentrationsänderungen beziehen sich auf die Plasmaspiegel.

Probiotikagabe. Durch fettreiche Ernährung stieg die Konzentration an TMAO unbeeinflusst durch Probiotika an [18]. Dennoch, nach Probiotikagabe ließen sich Änderungen im Cholesterin- und Gallensäurenmetabolismus mit antiatherogener Wirkung feststellen [21, 43].

Um die enterale Aufnahme von TMA und TMAO zu minimieren, schlugen Zeisel und Warrier Aktivkohle als Adsorbens mit potentiell TMAO-senkender Wirkung vor [203]. Yamazaki et al. berichteten bereits über abfallende TMA- und ansteigende TMAO-Konzentrationen im Urin nach Aktivkohlegabe [187]. Weitere Ergebnisse über die Wirkung von Aktivkohle auf den TMAO-Metabolismus liegen derzeit nicht vor.

1.1.6 Funktionen der FMO3 in Xenobiotika-Metabolismus und menschlichem Stoffwechsel

Wie Cytochrom-P450-Proteine (CYP) sind FMO in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und katalysieren als Monooxygenasen Reaktionen diverser Xe-

nobiotika (darunter auch Medikamente) mit Übertragung eines molekularen Sauerstoffatoms [82]. Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) dient den FMO als prosthetische Gruppe, NADPH als Reduktionsmittel [82]. Bevorzugte Edukte sind Nukleophile mit N-, S-, P- oder Se-Atom, die durch Katalyse in der Regel in eine relativ polare, ausscheidungsfer-tige und weniger toxische/pharmakologisch aktive Substanz umgewandelt werden [123]. Während CYP-Enzyme Oxidationsreaktionen hauptsächlich durch elektrophile Reaktion mit intermediärer Radikalbildung katalysieren, scheinen FMO die nukleophile Addition zu präferieren [39].

Endogene Stoffe wie S-Adenosylmethionin (SAM), Methionin, Cysteamin, Cystein- und Homocystein-S-Konjugate [123, 135] sind ebenso wie therapeutische Xenobiotika (z.B. Ketokonazol, Morphin, Propranolol, Tamoxifen, Tyramin) FMO-Substrate; welchen Bei-trag FMO-Enzyme zum Xenobiotika-Metabolismus leisten, ist noch relativ unbekannt [82, 97].

Cruciani et al. resümierten, dass im Vergleich zu CYP-Enzymen die Eduktwahl der FMO aufgrund fehlender Oxidationsreaktion am Kohlenstoffatom reduziert ist [39]. Sie kon-statierten zudem, dass die Rolle der FMO-Proteinfamilie, insbesondere der FMO3, in der Vergangenheit unterschätzt und einige Reaktionen fälschlicherweise den CYP-Enzymen zugeschrieben worden seien [39].

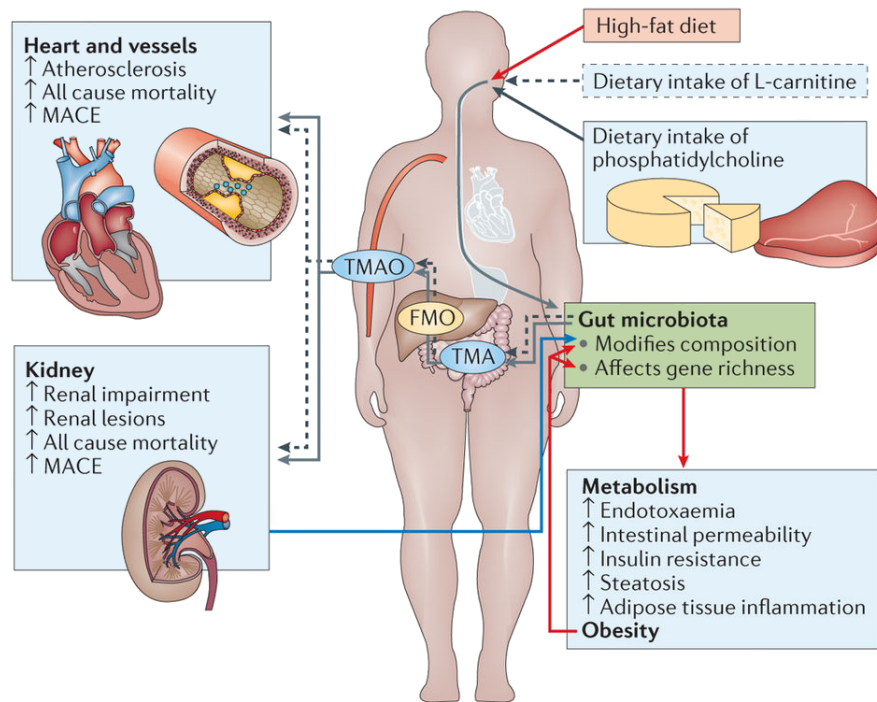
1.1.7 Assoziationen von Pathologien mit TMAO

Kapital 1.1.5 weist bereits darauf hin, dass dem TMAO-Plasmaspiegel Markereigenschaft zukommt. Darüber hinaus vermag TMAO in Abhängigkeit der Plasmakonzentration di-verse Pathologien und metabolische Veränderungen zu verursachen. Hohe Konzentratio-nen begünstigen kardiovaskuläre Erkrankungen (Atherosklerose, Myokardinfarkt, Schlag-anfall, Tod) [78, 175], Diabetes, [41, 116], Entwicklung und Progression chronischer Nie-renerkrankungen [163], erhöhtes Risiko der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (postmenopausal) [8], weitere siehe in Abbildung 9; niedrige Konzentrationen stehen im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und aktiver Colitis [183].

Im Folgenden wird die Rolle von TMAO in der Pathogenese fokussierter betrachtet, wo-bei u.a. die zugrunde liegenden Mechanismen thematisiert werden.

1.1.7.1 Assoziationen mit kardiovaskulären Erkrankungen: Cholesterol- und Gal-lensäurenstoffwechsel

In mehreren Studien wurden Zusammenhänge zwischen chronisch kardiovaskulären Er-krankungen und erhöhten Plasmakonzentrationen an TMAO und seinen Vorläufermole-külen (Cholin-, L-Carnitin- und Betain) konstatiert [79, 78, 175]. Positive Assoziationen



Nature Reviews | Nephrology

Abbildung 9: Übersicht über die wechselseitigen Beziehungen zwischen Einflussfaktoren des TMAO-Stoffwechsels (hier: Ernährung, Mikrobiom), TMAO-Konzentrationen im Körper und assoziierten metabolischen sowie pathologischen Veränderungen. Bild aus Aron-Wisniewsky und Clément [4]. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Nephrology: The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. Aron-Wisniewsky J, Clément K, Copyright ©2015, Springer Nature (2016).

mit der TMAO-Plasmakonzentration fanden sich bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit, koronarer Herzkrankheit und schweren kardialen Komplikationen (major adverse cardiovascular event - MACE) [160, 175]. Patienten mit stattgehabtem MACE wiesen höhere TMAO-Konzentrationen der Baseline auf [160].

Untersuchungen an Mäusen, die mehrere Wochen mit Cholin- oder TMAO-reicher Kost ernährt worden waren, führten u.a. Wang et al. zu dem Ergebnis, dass TMAO proatherosklerotisch wirkt [175]. Sie verzeichneten positive Korrelationen von TMAO-Konzentration und atherosklerotischer Plaque-Größe sowie einen Anstieg der TMAO-Plasmaspiegel (nicht jedoch der klassischen atherosklerotischen Risikofaktoren: Blutfette oder -glukose). Koeth et al. erwogen, dass die westliche Diät mit hohem Fleischkonsum und das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen mit erhöhten TMAO-Spiegeln in Zusammenhang stehen könnten [78].

Als erklärende Mechanismen für die TMAO-Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen wurden unter anderem eine Inhibierung des reversen Cholesteroltransports [78], Änderungen des hepatischen und intestinalen Cholesterol- und Gallensäurenmetabolismus sowie Veränderungen der Makrophagen der Arterienwände angeführt [79]. Ferner wurden Effekte von TMAO durch eine verlängerte hypertensive Wirkung von Angiotensin II, gesteigerte Thrombozytenaktivierung [34] und eine Induktion der Cytokin- und

Adhäsionsproteinexpression in aortalen Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen via NF- κ B-Signalweg (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) diskutiert [174].

ÄNDERUNGEN IN CHOLESTEROL- UND GALLENSÄURENMETABOLISMUS

TMAO greift an verschiedenen Stellen im Körper in den Cholesterol- und Gallensäurenstoffwechsel ein [78]. Untersuchungen an Mäusen zeigten:

1. in Makrophagen: Eine Induktion von Scavenger-Rezeptoren führt zur Akkumulation von Cholesterol in Makrophagen in arteriellen Gefäßwänden (Schaumzellbildung) [175].
2. in Enterozyten: Eine durch TMAO veränderte Expression von Cholesteroltransportern verringert die Aufnahme und Abgabe von Cholesterol im Darm [78]. Die mRNA-Level des LDL-Rezeptors und der Cholesterolsynthese bleiben unbeeinflusst [78].
3. in Hepatozyten: TMAO greift über Gallensäuren in den Hauptweg der Cholesterinausscheidung ein, indem es die Expression zahlreicher Gallensäuretransporter in der Leber verändert [78]. Die Größe des Gallensäurenpools wird unter anderem durch die Hemmung der Cyp7a1-Expression verringert, sodass das wichtigste Enzym der Gallensäuresynthese vermindert hergestellt wird [78].

Einige Studien konnten das proatherosklerotische Potential von TMAO allerdings nicht bestätigen [101]. Kritisiert wurde vor allem, dass die schlechte Nierenleistung die Ergebnisse einiger Studien beeinflusst und Assoziationen zwischen TMAO-Spiegel und koronarer Herzkrankheit vorgetäuscht haben könnten [109]. Velasquez et al. kontrastierten zudem, dass Fischverzehr trotz hohen TMAO-Gehalts eher als kardioprotektiv gilt [174].

1.1.7.2 Assoziationen mit Diabetes mellitus: Insulinresistenz, Glukosetoleranz und Fettbelastung

Dambrova et al. fanden bis zu zehnfach erhöhte TMAO-Plasmaspiegel bei diabetischen gegenüber nicht-diabetischen Mäusen [41]. Beim Menschen wiesen Diabetiker ebenfalls höhere Plasmakonzentrationen auf [41, 116, 138]. Hohe TMAO-Plasmaspiegel gingen laut Shan et al. mit einem gesteigerten Risiko für die Erstdiagnose Diabetes mellitus 2 einher, unabhängig von Polymorphismen der FMO3 [140]. Auch Barton et al. erkannten Zusammenhänge zwischen glykämischer Last und den Plasmakonzentrationen an TMAO. Es zeigte sich, dass nach 28-tägiger Diät mit niedriger glykämischer Last die TMAO-Plasmalevel im Vergleich zu hoher glykämischer Last stärker anstiegen [11].

In mehreren Studien stellten sich zudem Zusammenhänge von TMAO-Spiegel, Diabetesrisiko und fettreicher Kost dar [56, 94]. Li et al. beobachteten bei Versuchen an Affen

mit diätetisch hoher Fett- und Cholesterolaufnahme ein Ansteigen von TMAO, Laktat und verzweigtkettigen Aminosäuren (wie Leucin/Isoleucin), während Sphingomyelin und Cholin abnahmen. Eine Zunahme des visceralen Fetts, einen abnormen Lipidmetabolismus und eine gestörte Glukosetoleranz assoziierten sie mit TMAO [94].

Gao et al. berichteten bei Mäusen mit fettreicher Ernährung über TMAO-assoziierte Veränderungen im Insulinstoffwechsel einhergehend mit gestörter Glukosetoleranz, gehemmtem hepatischen Insulinsignalweg und Entzündung des Fettgewebes [56]. Dabei kam es zu einer veränderten Genexpression bezüglich des Insulinsignalstoffwechsels, der Glykogensynthese, Glukoneogenese und des Glukosetransports in der Leber [56]. Im Fettgewebe stieg das mRNA-Level des proinflammatorischen Cytokins Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), während das antiinflammatorische Cytokin IL-10 sank [56].

Kim et al. sahen in TMAO einen potentiellen Mediator zur Entwicklung eines Diabetes mellitus 2 [75]. Es wurden zudem Überlegungen angestellt, ob TMAO als Prädiktor zur Evaluation einer gestörten Glukosetoleranz und des Insulinresistenzrisikos im prädiabetischen Status herangezogen werden kann [94]. Die Mechanismen der Zusammenhänge von TMAO-, Glukose- und Fettstoffwechsel sind bisher allerdings noch weitgehend unbekannt und weitere Untersuchungen erforderlich [32].

1.1.7.3 Assoziationen mit weiteren Erkrankungen: Nierenerkrankungen und Tumore

Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zeigen erhöhte TMAO-Werte im Blut und ein schlechteres Gesamtüberleben [163]. Diätetisch erhöhte Cholin- und TMAO-Plasmakonzentrationen führten bei Mäusen zu progressiver tubulointerstitieller Fibrose, Kollagenablagerungen und renaler Dysfunktion [163]. Beim Menschen sind die Zusammenhänge mit Nierenerkrankungen bisher jedoch unzureichend erforscht, und über zugrundeliegende Mechanismen ist wenig bekannt [32].

In einigen Studien stehen erhöhte TMAO-Konzentrationen im Plasma bzw. Urin in Assoziation zu Karzinomen, darunter das kolorektale Karzinom [186] und Prostatakarzinom [108]. TMAO wurde als Prädiktor der gastrischen Tumorgenese vorgeschlagen [153], und auch sein Vorläufermolekül TMA wird mitunter als Marker für proliferatives Tumorgewebe angesehen [30]. Über die zugrunde liegenden Mechanismen von TMAO-Assoziationen mit Karzinomen liegen sehr wenige Daten vor [153].

1.2 Cholin-Stoffwechsel

Wie die TMAO- stehen die Cholin-Konzentrationen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose, für deren Genese unter anderem Dyslipidämien und Diabetes mellitus Hauptrisikofaktoren darstellen. Die Verknüpfungen von Cholin mit dem C1-, Lipid-, Cholesterol- und Gallensäurenstoffwechsel werden im Folgenden erläutert. Einen Überblick über die Cholin-Derivate, die dabei eine Rolle spielen, zeigt Abbildung 10. Als Phosphatidylcholin ist es in den Fettstoffwechsel involviert und zu Betain in Leber und Niere oxidiert am C1-Stoffwechsel beteiligt.

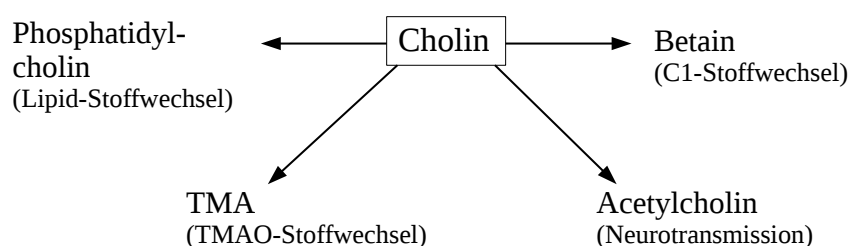


Abbildung 10: Über die gezeigten Derivate ist Cholin in verschiedene Stoffwechselwege eingebunden.

1.2.1 Cholin: Plasmakonzentrationen und Einflussfaktoren

Die Nüchternwerte von Cholin liegen im Plasma zwischen 7 und 20 μM (meist 10 μM) [68]. Diverse Faktoren determinieren die Plasmakonzentrationen von Cholin, siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Über verschiedene Mechanismen können Einflussfaktoren die Cholin-Konzentrationen im Blutplasma beeinflussen. Die Einflüsse sind zusammenfassend dargestellt. Referenz: [68].

Einflussfaktor	Mechanismus	Plasmakonzentration
Cholinspeicher	Cholin-Freisetzung bei Mangel	↑
Endogene Synthese	Cholin-Produktion (Induktion durch Östrogen)	↑
Ernährung	Cholingestion (postprandial)	↑
	Fasten/längere Cholin-defiziente Diät	↓
C1-Stoffwechsel	keine Kompensation von Mangelzuständen, Veränderung des Bedarfs	
Darmbakterien	TMA-Produktion (geringere Cholin-Aufnahme durch bakteriellen Verbrauch)	↓
weitere	Nieren-, Leberinsuffizienz	↑
	Bewegung*	↓

*Ausnahme: hier Referenz [22]

Alle Gewebe können Cholin speichern [68] und freisetzen, wenn mit der Ernährung geringe Mengen an Cholin- und Methylgruppenüberträgern zugeführt werden [69]. Einem Cholinmangel kann auch durch endogene Synthese entgegengesteuert werden [193].

ENDOGENE CHOLINSYNTHESE

Phosphatidylethanolamin ist das Ausgangsprodukt der endogenen Synthese. Durch Methylierung mittels Phosphatidylethanolamin N-Methyltransferase (PEMT) (vor allem in der Leber) entsteht Phosphatidylcholin [68, 193]. In diesem Stoffwechselweg wirkt Östrogen induzierend auf die PEMT-Genexpression und fördert dadurch die Phosphatidylcholinsynthese [131].

ERNÄHRUNG

Postprandial steigen sowohl die Konzentrationen an Cholin (um 10 % nach 1 Stunde) als auch Betain und DMG (um 25 - 30 % nach 2 - 3 Stunden) an [49, 63]. Der Cholinanstieg ist von der aufgenommenen Cholinmenge abhängig, wobei Nahrungsingestion mit niedrigem Cholingehalt keine signifikanten Cholinanstiege hervorruft [197]. Einwöchiges Fasten vermindert die Nüchternkonzentrationen an Cholin im Plasma nur moderat [137] und auch längere Cholin-defiziente Ernährung führt nur zu langsamen Abfällen (nach 3-wöchiger Defizienz fielen Cholin und Phosphatidylcholin um etwa 30 %) [199].

1.2.2 Cholin als Methyl donor im C1-Stoffwechsel

Der Cholin-Stoffwechsel ist über die Reaktion von Phosphoethanolamin zu Phosphatidylcholin mit Methylgruppenübertragung von S-Adenosylmethionin (SAM) [20] und über die Umwandlung zu Betain in den C1-Stoffwechsel involviert, siehe Abbildung 11.

Cholin wird zum Teil unverändert renal mit dem Urin ausgeschieden, der größte Teil jedoch durch die Niere zu Betain oxidiert [68]. Wie Abbildung 11 verdeutlicht, ist der Cholinbedarf des Körpers mit dem Methionin-, Folat- und B₁₂-Stoffwechsel assoziiert [200]. Bei Mangel eines dieser Metaboliten steigt der Bedarf an den anderen Methylgruppenüberträgern [136]. Gesteigerte Homocystein-Plasmalevel stellen häufig einen Marker für den Mangel an Methylgruppendonatoren dar [136]. Zur Bildung von Methionin ist die C1-Übertragung durch Betain oder 5-Methyl-Tetrahydrofolat (THF) erforderlich [53]. Alternativ reagiert Homocystein über Cystein zu Taurin weiter, das zur Gallensäurensynthese benötigt wird [125].

1.2.3 Cholin in Cholesterol- und Gallensäurestoffwechsel

Cholin wird zur Synthese von Phospholipiden (Phosphatidylcholin, Lyso-Phosphatidylcholin und Sphingomyelin) benötigt [194]. Es liegt hauptsächlich in Form von Phosphatidylcholin (ca. 95 %) vor [93]. Als Bestandteil von Phospholipiden ist es in den Lipid-

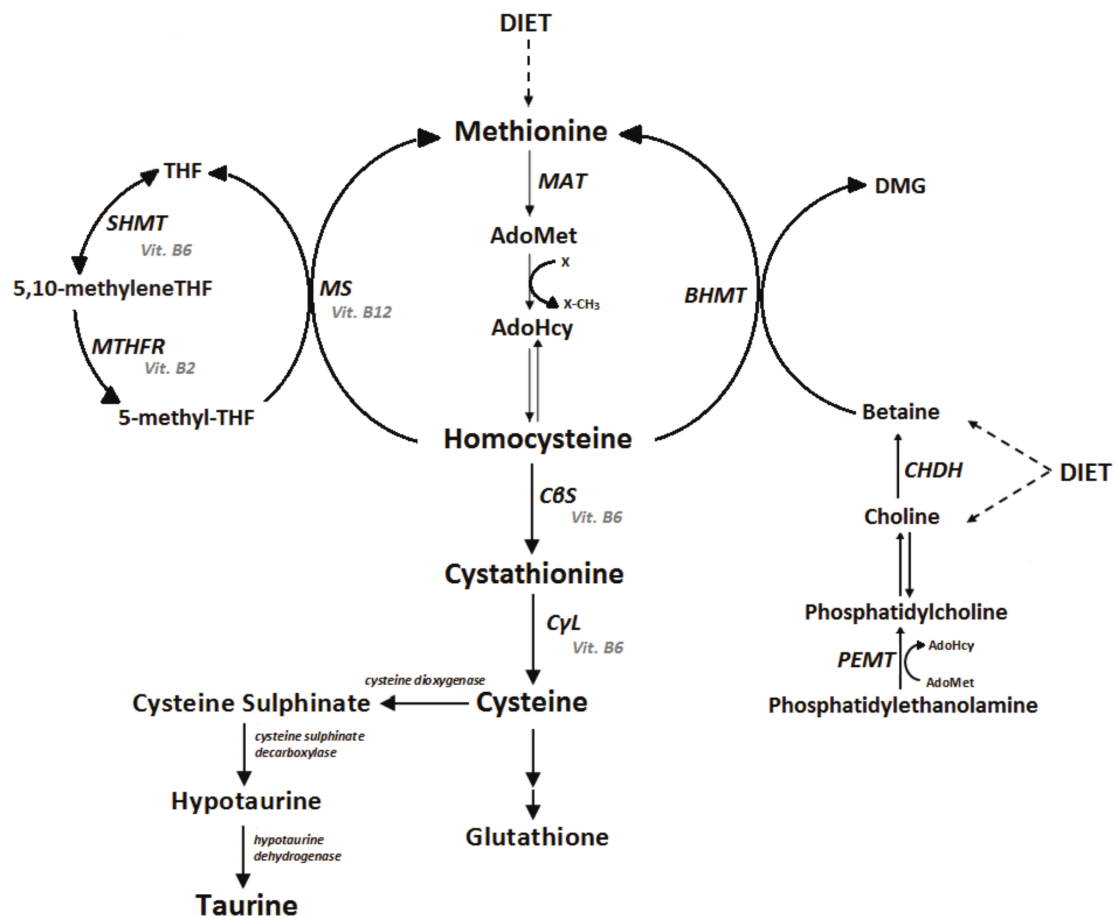


Abbildung 11: Cholin wird zu Betain, Phosphatidylcholin oder TMA verstoffwechselt. Über Phosphatidylcholin erhält es Anschluss an den Fettstoffwechsel und Cholesteroltransport via VLDL, über Betain ist es an den C1-Stoffwechsel und über mehrere Schritte auch an den Taurin- und damit Gallensäurenstoffwechsel angebunden. AdoMet: S-Adenosylmethionin (=SAM); AdoHcy: S-Adenosylhomocystein (=SAH); BHMT: Betain-Homocystein S-Methyltransferase; CHDH: Cholindehydrogenase; CβS: Cystathionin-β-Synthase; CγL: Cystathionin-γ-Lyase; DMG: Dimethylglycin; MAT: Methionin-Adenosyltransferase; MS: Methionin-Synthase; SHMT: Serin-Hydroxymethyltransferase; THF: Tetrahydrofolat; MTHFR: 5,10-Methylen-THF-Reduktase; PEMT: Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase; X: Methylakzeptor. Bild aus Poloni et al. [125] (modifiziert), lizenziert unter Creative Commons Attribution license: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

und Cholesteroltransport eingebunden. Es formiert Lipoproteinpartikel und übernimmt Funktionen im Cholesterolstoffwechsel (Lösen von Cholesterol und reverser Cholesteroltransport) [93, 116].

Fette und Cholesterin werden aus der Nahrung durch Enterozyten resorbiert. Für den Transport zur Leber benötigen Enterozyten Cholin-haltige Phospholipide, um Chylomikrone und VLDL-Partikel zu generieren und zu sezernieren [124, 113]. In der Leber wird Phosphatidylcholin vor allem zur Sekretion von VLDL, Bildung von HDL und Sekretion in die Gallenflüssigkeit verwendet [93].

Über VLDL-Partikel gelangen Fett und Cholesterol von der Leber zu Geweben. Wird dieser Transport z.B. durch Cholinmangel unterbrochen, akkumulieren Fett und Cholesterol in der Leber [113] und der Cholesterolgehalt im Plasma fällt ab [199]. Bei niedrigem Phosphatidylcholingehalt der VLDL-Partikel werden diese schneller aus der Zirkulation

resorbiert. Eine gestörte Phosphatidylcholin-Biosynthese reduziert das HDL-Cholesterin im Plasma durch Inhibition der hepatischen Bildung und gesteigerte Aufnahme aus dem Blut [35].

Nach Sekretion von Phosphatidylcholin in die Gallenflüssigkeit wird es im Darm zu nahezu 95 % resorbiert, wobei etwa 40 % zur Leber zurückgelangen und der Rest vom Körpergewebe verwendet wird [93]. Ein Cholinmangel verursacht Veränderungen im Gallensäurenmetabolismus: Die Phosphatidylcholin-Level in der Gallenflüssigkeit sind reduziert und Gallensäuren- und Cholesterolsekretion vermindert [124].

1.3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit stellt drei Studien vor, in denen die Rolle von TMAO sowie weiterer Metabolite des Cholin- bzw. C1-Stoffwechsels im menschlichen Fett-, Glukose-, HDL- und Xenobiotika-Stoffwechsel untersucht wurden.

Der erste Teil der Arbeit beurteilt die Effekte akuter Fett- und Glukosebelastung auf die Plasmakonzentrationen von Metaboliten des TMAO- und Cholin-Stoffwechsels. Die Durchführung als Pilotstudie an 18 Probanden diene der Identifikation von Markern, die potentiell der Früherkennung von abnormem Fett- und Glukosestoffwechsel dienen könnten, noch bevor sich Krankheitsschäden klinisch manifestiert haben. Die Studie könnte damit einen Ausgangspunkt zur späteren Etablierung von Frühmarkern in der Diagnostik darstellen. Hintergrund der Untersuchung waren Ergebnisse, die TMAO- und Cholin-Plasmaspiegel mit Diabetes und dem Fett- bzw. Cholesterolstoffwechsel in Verbindung brachten.

Die Beurteilung des Fettstoffwechsels im klinischen Alltag erfolgt derzeit vor allem durch die Bestimmung von Triglycerid-, Cholesterin- (gesamt), HDL- und LDL-Konzentrationen im Nüchternblut. Zur erweiterten Diagnostik werden Apolipoproteine, Lipoprotein a, Chylomikrone und weitere Spezialparameter betrachtet, die jedoch teilweise nicht validiert sind. Ein einheitlicher Diagnostest wie der orale Glukosetoleranztest für Störungen im Glukosestoffwechsel ist für Störungen im Fettstoffwechsel bisher nicht etabliert. Die Messung einer Markerkonzentration wie von TMAO nach akuter Fettbelastung könnte eine Möglichkeit zur frühen Diagnostik von Fettstoffwechselstörungen darstellen. Die Effekte einer akuten Glukosebelastung wie durch einen oralen Glukosetoleranztest auf die TMAO- und Cholin-Stoffwechselkonzentrationen wurden bisher wissenschaftlich kaum untersucht. Ein Zusammenhang von Glukosestoffwechselstörungen und TMAO-Konzentrationen wurde bei Diabetikern (Typ 2) beobachtet, bei denen erhöhte TMAO-Konzentrationen im Blutplasma vorliegen. Der Studie liegt die Annahme zugrunde, dass postprandiale metabolische Reaktionen auf akute Belastungstests beginnende Stoffwechselstörungen besser erfassen als die Diagnostik mittels Nüchternblutwerte.

Hohe Konzentrationen an TMAO wurden mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Der Stoffwechsel und die Transportform von Cholesterin in Form von HDL- und LDL-Vesikeln spielen in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle. HDL ist insbesondere am reversen Cholesteroltransport mit Rücktransport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber beteiligt, während durch TMAO eine Hemmung dieses Transports beschrieben ist. Die zweite Studie dieser Arbeit untersucht daher, ob die Konzentrationen von antiatherogenem HDL mit proatherogenem TMAO assoziiert sind. Durch Gegenüberstellung von HDL- und TMAO-Konzentrationen von 331 Patienten soll in Quintilen eine Kohärenz der Faktoren überprüft werden, um einen weiteren Hinweis über potentiell beteiligte Mechanismen bei der Atherosklerose-Entstehung zu erhalten.

Im letzten Teil der Arbeit wird die Wirkung von Xenobiotika auf den TMAO- und C1-Stoffwechsel untersucht. Diverse Xenobiotika werden durch die FMO3, dem Schlüsselenzym des TMAO-Stoffwechsels, metabolisiert. In dieser Arbeit wird unter dem Einsatz von Abirateronazetat als Xenobiotikum bei 34 Patienten mit progressiv Chemotherapie-naivem Kastrations-resistentem Prostatakarzinom überprüft, ob es zur Änderung der Metabolitkonzentrationen des TMAO- und Cholin-Stoffwechsels kommt. Interessant ist diese Fragestellung auch im Hinblick darauf, dass bei Patienten mit Prostatakarzinom erhöhte TMAO-Plasmaspiegel vorliegen, die sich unter erfolgreicher Therapie womöglich normalisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie)

2.1.1 Fragestellung

Die Studie diente der Prüfung der folgenden Frage: Verursachen akute Fett- und Glukosebelastung bei gesunden Individuen Konzentrationsänderungen von Metaboliten des TMAO- und Cholin-Stoffwechsels im Blutplasma? Gemessen wurden die kurzfristigen Änderungen 4 Stunden nach oralem Fett- und 2 Stunden nach oralem Glukosetoleranztest.

2.1.2 Studiendesign

Die Studie wurde am Universitätsklinikum des Saarlandes im Bereich *Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor* in Form einer Interventionsstudie durchgeführt (Fallzahl: N=18). Die Probanden wurden aus Homburg und Umgebung (Saarland) von Mai 2016 bis Januar 2017 rekrutiert. Für die Studienteilnahme galten folgende Voraussetzungen:

Einschlusskriterien:

- Männer und Frauen
- Alter: 40 - 65 Jahre (Häufigkeitsgipfel der Erstmanifestation eines Diabetes mellitus Typ 2, Minimierung altersabhängiger Veränderung im TMAO-Metabolismus)
- stabiler Ernährungszustand (Gewichtsschwankungen um weniger als etwa 5 % des Körpergewichts)

Ausschlusskriterien:

- vorliegende Schwangerschaft
- Erkrankungen des Fett- oder Glukosestoffwechsels (z.B. Diabetes mellitus Typ 1 und 2)
- Malabsorption durch chronisch entzündliche Darmerkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Zöliakie), Diarrhoe, gastrointestinale Resektionen, übermäßiger Alkohol- oder Zigarettenkonsum
- Vorerkrankungen mit Einfluss auf den Stoffwechsel: Lebererkrankungen, Niereninsuffizienz, neoplastische Erkrankungen
- Einnahme folgender Medikamente: Antidepressiva, Antiepileptika, Fibrate, Folsäure-Antagonisten, Metformin, Statine, Zytostatika

Die Zustimmung zur Studie wurde von der „Ethik-Kommission bei der Ärztekammer des Saarlandes“ (Kenn-Nr. 256/15) eingeholt und die Studie gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Teilnehmer wurden vorab über das Forschungsvorhaben informiert und willigten schriftlich zur Teilnahme ein. Die Studie ist registriert unter ClinicalTrials.gov: NCT02603237.

2.1.3 Studienablauf und Messungen

Die Studiendurchführung, gezeigt in Abbildung 12, umfasste einen oralen Fett- (oFTT) und oralen Glukosetoleranztest (oGTT), durchgeführt im zeitlichen Abstand weniger Tage (Median: 7 Tage). Vorab erfolgte mit den Studieninteressenten ein telefonisches Gespräch, in dem eine kurze Schilderung des Studienablaufs stattfand und eine Vorauswahl der Probanden vorgenommen wurde. Hierzu fand eine grobe Abklärung des Vorliegens von oben genannten Einschlusskriterien statt.

Von anfänglich 20 Interessenten wurde eine Person aufgrund der Ausschlusskriterien (>65 Jahre, Multimorbidität) ausgeschlossen. Eine weitere Person entschied sich aufgrund des Fettbelastungstests gegen eine Teilnahme.

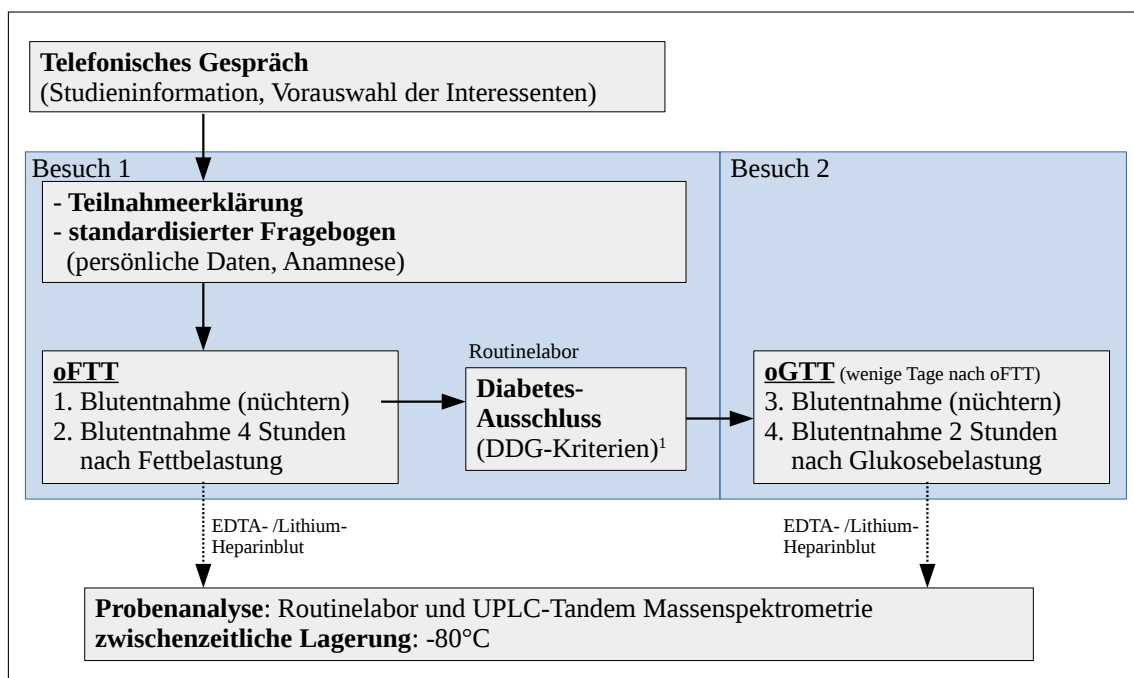


Abbildung 12: Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie): Ablauf und Durchführung der Studie sind im Fließschema dargestellt. ¹DDG-Kriterien zeigt Abbildung 13.

Am ersten Besuchstermin wurden per standardisiertem Fragebogen persönliche Daten, Krankheits-, Medikamentenanamnese und Ernährungsgewohnheiten erhoben (siehe Anhang E) und die oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien geprüft. Bei Erfüllung der Teilnahmevoraussetzungen und nach Erteilung der Einverständniserklärung durch den Probanden wurde im ersten Studienteil der oFTT im Nüchternzustand (≥ 8 Stunden)

durchgeführt. Der oFTT beinhaltete die orale Aufnahme von 250 g Sahne (Landliebe Schlagsahne, Fett-/Sahneanteil: 3,2 g / 10 g → 80 g / 250 g) innerhalb von fünf Minuten, siehe Zusammensetzung der Sahne nach Herstellerangabe in Tabelle 6.

Tabelle 6: Zusammensetzung der zum oralen Fetttoleranztest (oFTT) verwendeten Landliebe Schlagsahne nach Herstellerangabe.

Durchschnittliche Nährwertmenge	pro 10 g
Energie	128 kJ / 31 kcal
Fett	3,2 g
– davon gesättigte Fettsäuren	2,1 g
Kohlenhydrate	0,32 g
– davon Zucker	0,3 g
Eiweiß	0,24 g
Salz	0,01 g

Vor Durchführung des oFTT erfolgte eine Nüchternblutentnahme und Urinabgabe. Nach vier Stunden wurde eine zweite Blutentnahme vorgenommen und Urin abgegeben; im zwischenzeitlichen Testintervall fand keine weitere Nahrungsaufnahme statt.

Aus der ersten Nüchternblutentnahme wurden bei jedem Probanden Routineparameter bestimmt (CRP, Glukose, HbA_{1c}, Cholesterin, Triglyceride, HDL, LDL, Kreatinin, GFR, Harnstoff, Harnsäure, GOT, GPT, γ GT, AP, Bilirubin, Hb, Erythrozyten, Hkt, MCH, MCHC, MCV, Thrombozyten). Die Konzentrationen der Blutglukose und des HbA_{1c} dienten gemäß den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (siehe Abbildung 13) zum Ausschluss-Screening eines Diabetes mellitus. Alle Probanden konnten nach Ausschluss am folgenden oGTT am zweiten Besuchstermin teilnehmen. Dieser wurde im Abstand von einigen Tagen zum ersten Besuchstermin abgehalten.

Im zweiten Studienteil wurde ein oGTT durch orale Aufnahme einer standardisierten 75 g Glukose-Lösung (Roche: Accu-Chek Dextrose O.G-T. 300 ml Saft) durchgeführt. Das Testvolumen wurde innerhalb von 5 Minuten aufgenommen. Es erfolgte auch hier eine Nüchternblutentnahme und Urinabgabe unmittelbar vor dem oGTT sowie nach zweistündigem Intervall ohne weitere Nahrungsaufnahme.

Um Verzerrungen durch Tageszeit-abhängige Stoffwechselaktivität in gemessenen Metabolitkonzentrationen zu minimieren, wurden die Studientests morgens zwischen 8⁰⁰ und 9³⁰ Uhr durchgeführt.

2.1.4 Präanalytik

Für die Blutentnahmen wurden K⁺ EDTA- und Lithium-Heparin-Röhrchen verwendet. Die Messung der Routineparameter erfolgte aus EDTA-Plasma- und Lithium-Heparin-

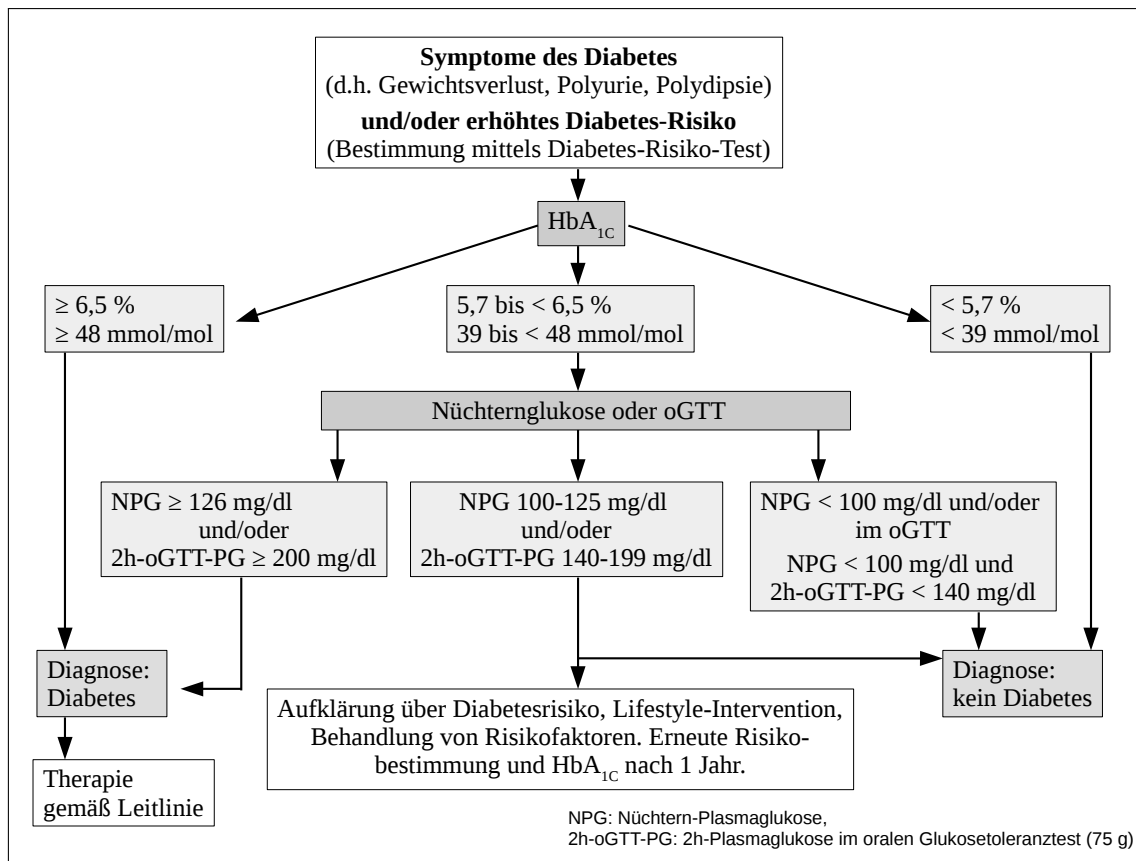


Abbildung 13: Diabetes-Diagnostik: Schema nach Kerner und Brückel (2012) im Auftrag der DDG [74].

Blut durch das Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes (Bestimmungsmethode und Referenzbereiche der Routineparameter: siehe Anhang D). Für die Messung von Betain, Cholin, DMG, TMA, TMAO und Taurin wurde das Plasma nach Zentrifugation des EDTA-Blutes (10 000 x g, 10 Minuten, 4°C) innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme aus dem Überstand aliquotiert (500 µl). Für die Messung von SAH/SAM wurde die EDTA-Aliquotierung mit 50 µl Essigsäure (1 N) versetzt und gut durchmischt, um durch Ansäuerung SAM zu stabilisieren und die Reaktion zu SAH zu verhindern [57]. Die Proben wurden bei -80°C gelagert und die Messung der Parameter <6 Monate mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie - Tandem Massenspektrometrie (UPLC-Tandem MS: ultraperformance liquid chromatography - tandem mass spectrometry) durchgeführt. Der Coefficient of variation (CV) für den Inter-Assay betrug für TMAO und TMA <8 % und <14 %. Die Plasmakonzentrationen für TMA lagen mit einer Ausnahme (0,19 µM) unterhalb der Detektionsgrenze (LOD - limit of detection) von 0,12 µM.

2.1.5 Messungen mittels UPLC-Tandem MS (Messprinzip)

Bei der **UPLC-Tandem MS Methode** handelt es sich um ein Kopplungssystem eines Flüssigkeitschromatographen (UPLC-Technik) mit zwei in Reihe geschalteten Massenspektrometern (Tandem MS). Nach Auftrennung in der UPLC über eine Säule werden

ionisierte Analyte im Massenspektrometer mithilfe von Isotop-markierten Standards identifiziert und quantifiziert.

Die **UPLC-Technik** (2004, Waters Corporation) ist eine Form der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography - HPLC), die im Vergleich zur herkömmlichen HPLC-Technik höhere Durchflussraten, eine höhere Sensitivität und ein höheres Auflösungsvermögen erzielt. Dies wird durch die Verwendung von Säulen mit kleinerer Partikelgröße der stationären Phase ($1,7 \mu\text{m}$ Hybridpartikel) und einer kürzeren Säulenlänge bei hohem Druck (bis 1000 bar) erreicht. Die eingesetzten Acquity BEH HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) und Acquity BEH C_{18} Säulen verleihen den Hydropartikeln durch Bridging (bridged ethyl hybrid - BEH) zu Methylgruppen in der Silica Matrix die ausreichend mechanische Stabilität.

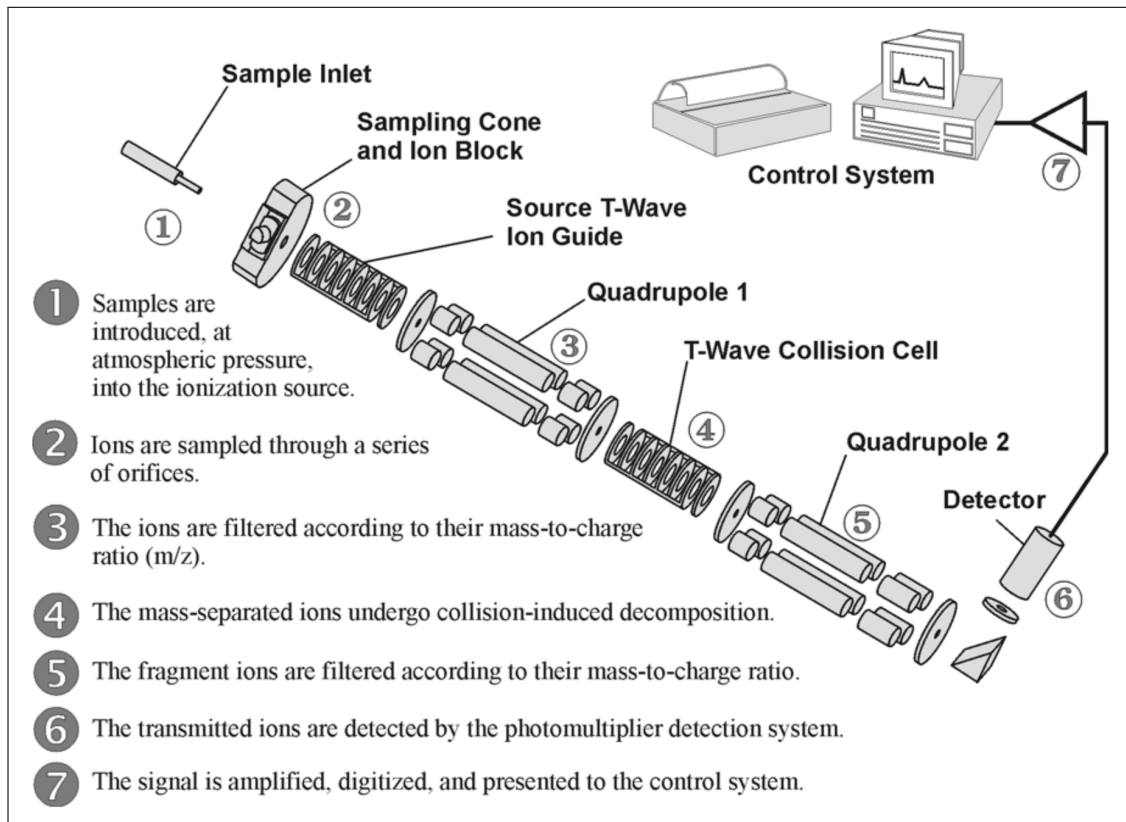


Abbildung 14: Aufbau und Funktionsweise des Quattro Premier TM XE - Tandem Quadrupol-Massenspektrometers. Die Ionisierung erfolgt per Elektrosprayionisation (ESI), bei der durch Anlegen einer Hochspannung an einem Analyt-tragenden metallischen Kapillarende ein Ladungsüberschuss mit Aerosolbildung entsteht, oder per Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), bei der eine Aerosolbildung durch einen Stickstoffstrom und die Analyt-Ionisierung durch anliegende Spannung via Lösungsmittel erzeugt wird. Bild aus Waters [181]. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Waters GmbH.

In der **Tandem MS** werden zwei Massenspektrometer vom Quadrupol-Typ eingesetzt, die durch eine Kollisionszelle getrennt sind. Ein Quadrupol-Massenspektrometer enthält vier im Quadrat angeordnete parallele Stabelektroden (gegenüberliegende Elektroden gleich gepolt), durch die im statischen Magnetfeld beschleunigte Ionen selektiert werden. Die Selektion erfolgt im Hochvakuum in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses.

Die vorgeschaltete Acquity HILIC VanGuard bzw. Acquity BEH C₁₈ VanGuard-Vorsäule filtert chemische Verunreinigungen aus dem aufgetragenen Analyten, schützt die Säule und verbessert die analytische Leistung [157, 180]. Abbildung 14 zeigt den Aufbau und die Funktionsweise des verwendeten UPLC-Tandem MS-Gerätetyps. Nach Passieren des ersten Massenspektrometers stoßen die selektierten Ionen in der Kollisionszelle mit Molekülen eines inerten Gases zusammen, siehe Abbildung 15. Dies führt zur Generierung von Ionisationsfragmenten (collision-induced dissociation - CID), die im nachgeschalteten zweiten Massenspektrometer analysiert und detektiert werden. Durch diese Verschaltung werden hohe Selektivität und Detektionen mit niedriger Nachweisgrenze gewährleistet.

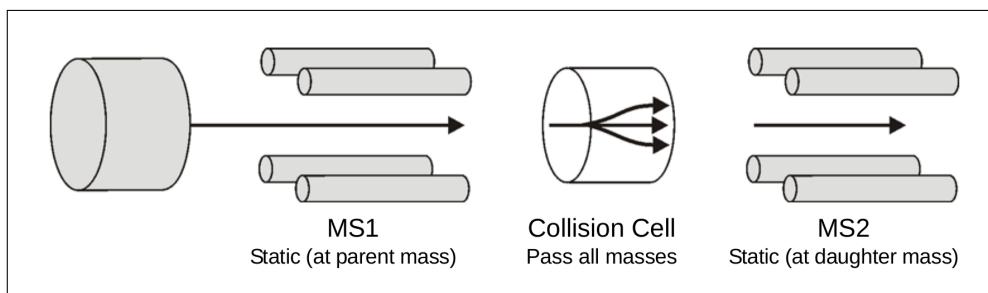


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt die Massenspektrometer bei Messung im MRM-Modus (Multiple reaction monitoring), durch dessen Verwendung eine längere Verweildauer der Ionen und somit eine höhere Sensitivität erreicht wird. Es erfolgt eine Selektion der Ionen (MS1) und ihrer Fragmente (MS2). Bild aus Waters [181]. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Waters GmbH.

2.1.6 Probenvorbereitung zur UPLC-Tandem MS Messung

Zur Messung wurden zunächst nur EDTA-Plasmaproben verwendet, die Urinproben werden im weiteren Verlauf der Studie nachgemessen und bei fortgeschrittener Analyse und Auswertung berücksichtigt. Es wurden drei Messmethoden zur Konzentrationsbestimmung mittels UPLC-Tandem MS angewandt: 1. Messung von Betain, Cholin, DMG; 2. Messung von TMA, TMAO, Taurin; 3. Messung von SAH/SAM. Alle verwendeten Materialien und Geräte sind im Anhang (siehe Abschnitt A und B) dezidiert aufgeführt. Die Lagerung der Standards und Isotopenmarker erfolgte bei -25°C.

Die eingefrorenen EDTA-Plasmaproben wurden zur Messung einmalig aufgetaut, gemischt, zentrifugiert (10 000 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur; SAH/SAM-Messung: 2 000 x g, 5 Minuten, 4°C) und nach unten beschriebenen Vorgang für die Konzentrationsmessungen mittels UPLC-Tandem MS vorbereitet. Alle Probenvorbereitungen erfolgten auf Eis, um die Verdunstung von Acetonitril gering zu halten. Nach der Vorbereitung wurden die Proben teilweise erneut bei -80°C eingefroren und <2 Wochen später aufgetaut, gemischt und gemessen (Ausnahme: SAH/SAM-Messung). Die Proben eines Probanden wurden in einem Lauf gemessen, um zufällige Perturbationen innerhalb der Messergebnisse bei einer Person zu minimieren.

Plasma

1. Betain, Cholin, DMG:

Die UPLC-Tandem MS Messung erfolgte nach der von Kirsch et al. beschriebenen Methode [77].

Materialien

- Standards: Betain, Cholin, DMG (Stocklösung: 1 000 μM)
- Internal Standards (IS): D9-Betain, D9-Cholin, D9-DMG, Acetonitril
- weitere Materialien: Ameisensäure, Ammoniumformiat, Wasser (ultrarein; Milli-Q)

In 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden 100 μl EDTA-Plasma/Kalibrator/Kontrolllösung vorgelegt. Die Proteinausfällung erfolgte durch Acetonitril nach Zugabe von 300 μl IS-Lösung. Die Lösungen wurden gemischt, zentrifugiert (10 000 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand (300 μl) in UPLC MS-Gefäße überführt. Die Startbedingungen der UPLC-Tandem MS Messung wurden eingestellt auf: 12,5 % mobile Phase A (15 mM Ammoniumformiat gelöst in ultrareinem Wasser, pH=3,5 durch Ansäuerung mit Ameisensäure); 87,5 % mobile Phase B (Acetonitril), Säulentemperatur 30°C, Sample Manager Temperatur 4°C, Flussrate 0,6 ml/Min. Verwendete Säulen: Acquity BEH HILIC (100 x 2,1 mm (i.d.); 1,7 μm Partikelgröße), Acquity BEH HILIC VanGuard-Vorsäule (5 x 2,1 mm (i.d.); 1,7 μm Partikelgröße), 0,2 μm In-Line Filter.

2. TMA, TMAO, Taurin

Die UPLC-Tandem MS Messung erfolgte nach der von Awwad et al. beschriebenen Methode [6].

Materialien

- Standards: TMA, TMAO, Taurin (Stocklösung: 1 000 μM)
- Internal Standards: D9-TMA, D9-TMAO, D4-Taurin, Methanol:Acetonitril (15:85), Ameisensäure
- weitere Materialien: Ammoniumformiat, Wasser (ultrarein; Milli-Q)

In 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden 100 μl EDTA-Plasma/Kalibrator/Kontrolllösung vorgelegt. Die Proteinausfällung erfolgte mittels Methanol:Acetonitril (15:85) in der IS-Lösung, angesäuert durch Ameisensäure (0,2 %). Nach Zugabe von 300 μl IS-Lösung wurde die Lösung gemischt, zentrifugiert (10 000 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand (300 μl) in UPLC MS-Glasgefäße überführt. Die Startbedingungen der UPLC-Tandem MS Messung wurden eingestellt auf: 10 % mobile Phase A (15 mM Ammoniumformiat gelöst in ultrareinem Wasser, pH=3,5 durch Ansäuerung mit Ameisensäure), 90 % mobile Phase B (Acetonitril), Säulentemperatur 30°C, Sample Manager Temperatur 4°C, Flussrate 0,4 ml/Min. Verwendete Säulen: Acquity BEH HILIC (100 x 2,1 mm (i.d.); 1,7 μm Partikelgröße), Acquity BEH HILIC VanGuard-Vorsäule (5 x 2,1 mm (i.d.); 1,7 μm Partikelgröße), 0,2 μm In-Line Filter.

3. SAH, SAM

Die UPLC-Tandem MS Messung erfolgte nach der von Kirsch et al. beschriebenen Methode [76].

Materialien

- Standards: SAH, SAM
- Internal Standards: $^2\text{H}_3$ -SAM, $^{13}\text{C}_5$ -SAH
- weitere Materialien: Essigsäure, Ammoniumazetat (20 mM, pH=7,4)

500 μl des Überstandes wurden mit 50 μl Ammoniak (1 M) neutralisiert (pH=7,4 - 7,5) und 25 μl IS-Lösung zugegeben. Zur Aufreinigung wurde eine Festphasenextraktion (solid - phase extraction - SPE) mittels Varian Bond Elut PBA (Phenylboronic acid) - Säule durchgeführt (Säulenvorbereitung: 1 ml wässrige Essigsäure (pH=2,636), anschließend 5 x 1 ml wässriges Ammoniumazetat, Zentrifugation nach jedem Waschschrift (500 x g, 1 Minute, 4°C)). Nach Probenauftragung wurde zentrifugiert (250 x g, 2 Minuten, 4°C) und hydrophile Verunreinigungen durch 2 x 1 ml Ammoniumazetat abgetrennt (500 x g, 1 Minute, 4°C). SAH/SAM-Ablösung erfolgte durch Waschen mit 3 x 350 μl wässriger Essigsäure (pH=2,636) und Zentrifugation (250 x g, 2 Minuten, 4°C). Es wurden eine Kalibratorreihe sowie eine High Control und eine Low Control in Ammoniumazetat-Puffer erstellt und mit 25 μl IS-Lösung versetzt. Die Startbedingungen der UPLC-Tandem MS Messung wurden eingestellt auf: 100 % mobile Phase A (100 % wässrige Essigsäure, glacial), Säulentemperatur 25°C, Sample Manager Temperatur 4°C, Flussrate 0,35 ml/Min. Verwendete Säulen: Acquity UPLC BEH C_{18} (50 x 2,1 mm (i.d.); 1,7 μm Partikelgröße), Acquity BEH C_{18} VanGuard-Vorsäule (5 x 2,1 mm (i.d.); 1,7 μm Partikelgröße), 0,2 μm In-Line Filter.

2.1.7 Rechner-basierte Auswertung der MS-Daten

Zur Software-gestützten Datenerhebung wurden die Windows-basierten Programme MassLynxTM und QuanLynxTM verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung des Analyten wurde mithilfe von Kalibratoren bekannter Konzentrationen eine Standardkurve (Ausschlagfläche gegen Konzentration aufgetragen) erstellt und mit dem Flächenintegral der zu analysierenden Substanz verglichen. Isotop-markierte Internal Standards (IS) wurden verwendet und den Proben bei Bearbeitung möglichst früh zugegeben. Ein IS dient als Normalisierungsfaktor, um systemische und zufällige Fehler, die während der Probenvorbereitung und des Analyseprozesses entstehen, zu minimieren. Er ähnelt dem Analyten stark (unter anderem chemische Eigenschaften, Retentionszeit), muss allerdings chromatographisch noch von diesem unterscheidbar sein [88].

Zur Validitätsprüfung der Daten wurde eine High Control und Low Control (bei der TMAO-Messung zusätzlich Medium Control) gemessen. Zur Präzision der Messung wurde als interne Kontrolle zudem zu Beginn und am Ende eines Messlaufs eine Probe des

hausinternen Urin- und Plasmapools gemessen. Ein regelmäßiger Blankabgleich nach acht Proben diente der Qualitätssicherung und als Negativkontrolle der Messung.

2.1.8 Statistische Analyse

Alle Messwerte wurden mittels One-Sample Kolmogorov-Smirnov-Test unter Lilliefors Signifikanzkorrektur auf Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Folgende Parameter lagen mitunter nicht normalverteilt vor: DMG vor oGTT und TMAO vor oFTT. Die TMAO-Werte vor und nach oFTT lagen nach Logarithmierung in beiden Fällen normalverteilt vor. Da die DMG-Werte vor oGTT nach Logarithmierung weiterhin nicht normalverteilt vorlagen, wurden die unlogarithmierten Werte zur weiteren Analyse verwendet.

Die Werte aller Messparameter und ihrer zeitlichen Veränderung sind als Mittelwert (Standardabweichung) angegeben. Die intraindividuellen Konzentrationsänderungen innerhalb eines Tests vor/nach oFTT bzw. vor/nach oGTT wurden in abhängiger t-Testanalyse (paired samples test) auf signifikante Devianzen untersucht. Durch einen Baseline-Vergleich (Konzentrationen vor oFTT und oGTT) wurde die zeitliche Konstanz/Variabilität der Messdaten überprüft. Es zeigte sich, dass eine Adjustierung auf die Baseline nicht erforderlich war. Die Parameterdifferenzen (Parameterkonzentration nach abzüglich vor oFTT bzw. oGTT) wurden berechnet und im abhängigen t-Test zwischen den Gruppen oFTT und oGTT (paired t-Test) verglichen, um von der Baseline ausgehend Unterschiede in der Reaktion festzustellen. Mittels abhängigem t-Test wurden die Konzentrationen nach oFTT mit denen nach oGTT verglichen. Eine Prüfung auf bivariate Korrelation innerhalb eines Tests mittels Spearmans Rho-Test wurde mit den Parameterdifferenzen durchgeführt, um gegenseitige Abhängigkeiten der Parameter festzustellen.

Im One-way analysis of variance (ANOVA)-Test wurde nach geschlechtsabhängigen Unterschieden zwischen Männern und Frauen in den Parameterkonzentrationen gesucht. Die Analyse für den Konzentrationsvergleich vor den Testdurchführungen und nach den Testdurchführungen sowie die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede erfolgten an einer geringeren Fallzahl für den oGTT (N=17) und SAH/SAM (N=13).

Zur statistischen Analyse wurde die Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 24 für Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) verwendet. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant, zwischen 0,05 und 0,10 als Tendenz gewertet.

2.2 Studie zur Abhängigkeit von TMAO und HDL

2.2.1 Fragestellung

Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob die Konzentrationen von HDL mit TMAO im Blutplasma assoziiert sind und ob sich eine Korrelation über das gesamte HDL-Spektrum

stetig darstellt. Die Studie sollte ebenfalls geschlechtsabhängige Unterschiede in der Assoziation aufdecken und Prädiktoren für die TMAO-Spiegel identifizieren.

Hintergrund der Fragestellung waren Untersuchungen, die einen Zusammenhang von hohen TMAO-Plasmaspiegeln mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose und kardiovaskuläre Ereignisse zeigten. Zudem sind Wirkungen von TMAO unter anderem auf den reversen Cholesterolfstoffwechsel beschrieben, an dem HDL wesentlich beteiligt ist.

2.2.2 Studiendesign, Probenauswahl und Messung

Die Studie wurde am Universitätsklinikum des Saarlandes im Bereich *Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor* in Form einer Querschnittsstudie durchgeführt. Zur Untersuchung des Zusammenhangs von HDL- und TMAO-Plasmapiegeln wurden Blutproben aus Serum-Entnahmeröhrchen von 333 Patienten (170 Männer, 163 Frauen) aus der Blutprobendatenbank des Zentrallabors selektiert (Zeitraum: 29.04.2016 - 02.11.2016).

Die Auswahl der Proben erfolgte anhand der tagesaktuellen Laborbefunde aus dem GLIMS-Labordatensystem. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die Probenzahl beider Geschlechter in etwa ausgeglichen ist. Es wurde kein hämolytisches Material gesammelt, um Störfaktoren bei der Messung zu minimieren. Wie in Abschnitt 1.1.5 beschrieben, nehmen pathogene Prozesse z.B. an Leber und Niere Einfluss auf den TMAO-Stoffwechsel. Die in Tabelle 7 genannten Selektionskriterien wurden daher bei der Probenauswahl berücksichtigt. Das Blutplasma der Proben wurde binnen 24 Stunden nach Eingang im Routinelabor des Universitätsklinikum des Saarlandes in Mikroreaktionsgefäße überführt und für maximal 6 Monate bei -80°C bis zur gesammelten Probenbearbeitung gelagert.

Die Bestimmung der HDL-Konzentrationen sowie weiterer Blutbildparameter (Kreatinin, GFR, Cholesterin, Triglyceride, LDL, GOT, GPT, Hb, Hkt, MCV, CRP) erfolgte durch das Routinelabor (Referenzbereiche siehe Anhang D). Die TMAO-Konzentrationen wurden mittels UPLC-Tandem MS im Serumblutplasma bestimmt. Da EDTA- und Serumblutproben vergleichbare Ergebnisse liefern [6], konnte statt der standardmäßigen Analyse von EDTA-Plasma Serum-Blutplasma zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden.

Die Serum-Blutproben wurden aufgetaut, gemischt und zentrifugiert ($10\,000 \times g$, 5 Minuten, Raumtemperatur). Die Vorbereitung zur Messung der Konzentrationen von TMAO mittels UPLC-Tandem MS erfolgte wie in Abschnitt 2.1.6, die Auswertung der Daten wie in Abschnitt 2.1.7 geschildert. Die Messung erfolgte teilweise unmittelbar nach Probenvorbereitung, teilweise 3 Tage später, wobei die Proben zwischenzeitlich bei -80°C eingefroren wurden. Nach Einfrieren wurden sie aufgetaut, gemischt und unmittelbar gemessen. Aufgrund von auffällig hohen TMAO-Konzentrationen wurden zwei Proben von

Tabelle 7: Kriterien mit Parameter/Blutmarker, die zur Beurteilung des Probenausschlusses dienen. Die Festlegung erfolgte nach internem Konsens, um Störeffekte auf den TMAO-Stoffwechsel zu minimieren.

Kriterium	Parameter/Marker mit Ausschlusskriterium	Begründung
Leberfunktion	GOT* > 2-fache Erhöhung der oberen Norm GPT* > 2-fache Erhöhung der oberen Norm	Eingeschränkte TMAO-Produktion durch FMO3 bei Leberinsuffizienz
Nierenfunktion	GFR (Cystatin C-GFR): Abweichungen vom Normbereich (Kreatinin* nur unterstützend) Urindiagnostik: Protein-/Glukosurie, Leuko-/Erythrozyten > 25/ μ l	Verminderte Ausscheidung von TMAO bei Niereninsuffizienz TMAO \uparrow
Kardiale Funktion	CK-MB*, LDH- und Troponin*-Anstieg pro-BNP*: nur leichte Anstiege toleriert	Assoziation von Herzerkrankungen mit TMAO \uparrow
akutes Entzündungs- geschehen	CRP* > doppelter Anstieg der oberen Norm Leukozytenzahl > 150 000/ μ l	Veränderter Stoffwechsel TMAO?
Alkoholabusus	CDT*-Erhöhung γ -GT* > 2-fache Erhöhung der oberen Norm	Mögliche Leberschädigung TMAO \downarrow
Kreislauferkrankungen	Tumormarker* (positiv) Leichtkettenerhöhung* (Plasmozytom)	Veränderter Stoffwechsel von Tumorzellen (TMAO \uparrow)
Schwangerschaft	β -HCG*-Normwertüberschreitung Befund der Frauenklinik mit Angabe des zyklischen Hormonstatus	Veränderter Stoffwechsel unter Schwangerschaft, FMO3-Induktion [65] TMAO \uparrow

* betrachtet wurden die Konzentrationen der Marker: Normbereiche sind im Anhang D aufgelistet

der statistischen Analyse ausgeschlossen.

2.2.3 Statistische Analyse

Bei der Auswertung wurden folgende Werte berücksichtigt: TMAO, HDL, LDL, Gesamt-Cholesterin, Triacylglyceride (TAG), GOT, GPT, Kreatinin, GFR, Atherogener Index, Hb, Hkt, MCV und Alter. Die Konzentrationen an Kreatinin wurden von [mg/dl] in [μ M], die HDL-Cholesterol-, LDL-Cholesterol-, Gesamtcholesterol- und TAG-Konzentrationen von [mg/dl] in [mM] (Standardeinheiten) umgerechnet. Da der LDL-Wert nicht aus allen Laborbefunden entnommen werden konnte, wurde dieser zur Vervollständigung der Daten nach untenstehender Formel 2.1 berechnet. Die Ergebnisse der Berechnung wurden mit den vorliegenden Messwerten verglichen, um die Güte der Berechnung zu prüfen und die Diskrepanz zum Erwartungswert so gering wie möglich zu wählen. Die LDL-Werte wurden für alle Proben berechnet und der Auswertung zu Grunde gelegt. Die LDL-Werte und der Atherogene Index (AI) wurden mithilfe folgender Formeln bestimmt:

$$LDL = \frac{TAG}{5} + HDL \quad [mM] \quad (2.1)$$

$$Atherogener\ Index = \log \frac{TAG}{HDL} \quad (2.2)$$

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit logarithmierten und nicht-logarithmierten Parametern. Es wurden die graphische Auswertung und die Abschätzung nach p-Wert berücksichtigt.

Die Mediane und 25. - 75. Perzentile wurden für die Gesamtgruppe sowie für die Gruppe der Männer und Frauen ermittelt. Ein Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer Test für 2 unabhängige, nicht normalverteilte Gruppen) wurde durchgeführt und die zentralen Tendenzen der Parameterkonzentrationen bei Männer und Frauen auf signifikante Unterschiede untersucht.

Die TMAO- und HDL-Konzentrationen wurden für beide Geschlechter in Quintile aufgeteilt und die Verteilung der oben genannten Parameter auf die Quintile berechnet. Mithilfe des ANOVA-Tests wurde auf signifikante Verteilungsunterschiede getestet.

Zur statistischen Auswertung wurde die Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 23 für Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) verwendet. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet, p-Werte zwischen 0,05 und 0,10 wurden als Tendenz gewertet.

2.3 Studie zur Wirkung von Xenobiotika (Abirateronazetat) auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel

2.3.1 Studiendesign

Die klinische Studie wurde von der *Klinik für Urologie und Kinderurologie* am Universitätsklinikum des Saarlandes geleitet und in Zusammenarbeit mit 21 urologischen Einrichtungen in Deutschland durchgeführt. Es handelt sich um eine Phase-II-Interventionsstudie, bei der Patienten mit progressiv Chemotherapie-naivem Kastrations-resistentem Prostatakarzinom multizentrisch an 12 Orten in Deutschland angemeldet sind. Für die vorliegende Arbeit wurden die deskriptiven Daten und Ergebnisse aus Blutuntersuchungen der Routine sowie Blutproben zum Zeitpunkt des Therapiebeginns (Zeitpunkt 1), nach 1 Monat (Zeitpunkt 2) und nach 2 Monaten (Zeitpunkt 3) zur Auswertung bereitgestellt. Es wurde Blutprobenmaterial von 34 der insgesamt 70 Teilnehmer analysiert, das im Zeitraum vom Juli 2014 bis Januar 2016 gesammelt wurde. Die relevanten Ein- und Ausschlusskriterien für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse sind im Folgenden aufgelistet, eine vollständige Auflistung im Rahmen des primären Studiendesigns zur Untersuchung von zwei Therapieprinzipien beim progressiv Chemotherapie-naivem Kastrations-resistentem Prostatakarzinom ist in der Studienregistrierung unter ClinicalTrials (siehe unten) dokumentiert.

Einschlusskriterien:

- Männer im Alter >18 Jahre
- Adenokarzinom der Prostata (histologisch oder zytologisch gesichert)
- asymptomatische oder mild-symptomatische Form
- medikamentöse Kastrierung (Testosteronkonzentration: <20-50 ng/dl)
- Laborwerte: Hämoglobin $\geq 9,0$ g/dl; Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$; Serumalbumin $\geq 3,0$ g/dl; Serumkreatinin <1,5 x der unteren Norm (ULN - upper limit of normal) oder Kreatinin-Clearance ≥ 60 ml/min; Serumkalium $\geq 3,5$ mM; Serumbilirubin <1,5 x ULN (Ausnahme: Patienten mit Morbus Gilbert); GOT oder GPT <2,5 x ULN

Ausschlusskriterien:

- akute Infektion
- Metastasen in Leber, Viszeralorganen oder Hirn
- Opiat-, Azol-, Flutamid-, Bicalutamid- oder Nilutamideinnahme innerhalb von Zyklus 1, Tag 1
- Radio-/Radionukleotidtherapie

- Hypophysen- oder Nebennierendysfunktion
- Herzerkrankungen wie stattgehabter Myokardinfarkt, kürzlich erlittene arterielle Thrombose, schwere oder instabile Angina pectoris, New York Heart Association (NYHA) Stadium II-IV, kardiale Ejektionsfraktion <50 %, unkontrollierter Hypertonus, Vorhofflimmern, behandlungsbedürftige Arrhythmien, Einnahme herzwirksamer Glykoside
- aktive oder symptomatische virale Hepatitis oder chronische Lebererkrankungen

Die Zustimmung zur Studie wurde von der „Ethik-Kommission bei der Ärztekammer des Saarlandes“ eingeholt (April 2014, Kenn-Nr. 250/13) und die Studie gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Teilnehmer wurden vorab über das Forschungsvorhaben informiert und willigten schriftlich zur Teilnahme ein. Die Studie ist registriert unter ClinicalTrials.gov: NCT02077634.

2.3.2 Studienablauf und Messungen

Die Teilnehmer, die die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten und nach Informierung der Studienteilnahme zugestimmt hatten, wurden auf einer Website registriert und in Sechsergruppen zur anschließenden Randomisierung gesammelt. Die randomisierte Zuordnung zu einer der beiden Interventionsgruppen erfolgte durch das Programm MedCFR (Zuteilungsverhältnis 1:1). Die jeweiligen Untersucher wurden nach Randomisierung über die Therapiegruppe ihres Patienten per E-Mail informiert. Eine Blutuntersuchung erfolgte am Tag des Therapiebeginns oder wenige Tage im Voraus (Baseline). Die Intervention erfolgte in mehreren Zyklen und wurde nach dem open-label Prinzip durchgeführt. Alle Probanden erhielten eine orale Therapie mit 1.000 mg Abirateronazetat und 10 mg Prednison (Abbildung 16).

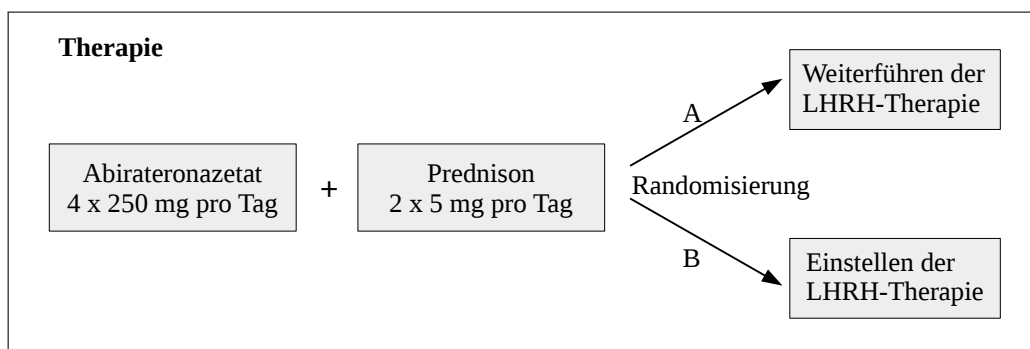


Abbildung 16: Interventionstherapie bei kastrierten männlichen Patienten mit metastasiertem CRPC (chemotherapy-resistant prostate cancer). Der Behandlungsunterschied zwischen den Gruppen (A und B) besteht im Fortführen bzw. Abbrechen der vorhergehenden LHRH-Hormonapplikation.

Die GFR wurde aus den Kreatinin-Werten nach folgender Formel berechnet (MDRD-

Formel):

$$GFR_{[ml/min/1,73m^2]} = 175 \cdot (S - Kreatinin_{[mg/dl]})^{-1,154} \cdot (Alter_{[Jahre]})^{-0,203} \quad (2.3)$$

Es erfolgte eine Messung der Parameter Taurin, TMA, TMAO, Betain, Cholin, DMG aus EDTA-Plasma zu drei Zeitpunkten mittels UPLC-Tandem MS (Probenvorbereitung und Datenauswertung erfolgte wie in Abschnitt 2.1.6 und 2.1.7 beschrieben).

2.3.3 Statistische Analyse

Alle Messwerte wurden mittels One-Sample Kolmogorov-Smirnov-Test in logarithmierter und unlogarithmierter Form auf Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. Die logarithmierten Daten lagen in vermehrter Zahl normalverteilt vor. Zum Vergleich der Messwerte zu allen drei Zeitpunkten zwischen Therapieform A und B wurde ein t-Test zwischen zwei unabhängigen Stichproben durchgeführt und hierbei mit den logarithmierten Werten gearbeitet. Zudem untersuchte ein abhängiger t-Test getrennt für Therapiegruppe A und B die Konzentrationsänderungen der TMAO-Stoffwechsel-, Cholin-Stoffwechsel- und Routineparameter im zeitlichen Verlauf. Unterschiede in der Konzentrationsänderung von TMAO zwischen beiden Therapiegruppen wurden ermittelt, indem die Probenhäufigkeit mit TMAO-Anstieg (von Zeitpunkt 1 zu 2 und Zeitpunkt 1 zu 3) sowie die mit TMAO-Abfall im exaktem X^2 -Test nach Fisher verglichen wurden. Die mittlere prozentuale Änderung von Zeitpunkt 1 zu 2 und Zeitpunkt 1 zu 3 für beide Therapiegruppen wurde bestimmt und diese mittels ANOVA-Test zwischen den Therapiegruppen verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie)

Die Studie umfasste eine Fallzahl von 18 Personen im Alter von $54,3 \pm 5,7$ Jahren (Mittelwert \pm SD) mit annähernd ausgeglichener Geschlechterverteilung (10 weibliche, 8 männliche Probanden). Tabelle 8 gibt einen Überblick über Maßzahlen wie Alter, Body-Mass-Index (BMI) und Körperumfang sowie über die Routineparameter der 18 Studienteilnehmer zu Studienbeginn.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Probandencharakteristika als Mittelwerte mit Standardabweichung aus der Routinediagnostik zu Studienbeginn (N=18).

Messparameter	Mittelwert \pm SD	Spannweite
Alter [Jahre]	$54,3 \pm 5,7$	45 – 65
BMI [kg/m^2]	$26,8 \pm 5,2$	18,0 – 37,8
B=Bauchumfang [cm]	$98 \pm 14,3$	78 – 125
H=Hüftumfang [cm]	$106 \pm 11,5$	89 – 128
B/H	$0,93 \pm 0,10$	0,72 – 1,09
CRP [mg/l]	$2,2 \pm 2,9$	0,3 – 12,1
HbA _{1C} [mmol/mol]	36 ± 3	30 – 42
Cholesterin [mg/dl]	$213 \pm 36,6$	154 – 289
Triglyceride [mg/dl]	$112 \pm 52,5$	48 – 269
HDL [mg/dl]	$63,9 \pm 14,1$	41 – 92
LDL [mg/dl]	$136,8 \pm 35,3$	79 – 219
Kreatinin [mg/dl]	$0,91 \pm 0,17$	0,63 – 1,20
GFR [ml/min]	83 ± 15	60,6 – 106,6
Harnstoff [mg/dl]	$34,8 \pm 8,5$	23 – 52
Harnsäure [mg/dl]	$5,5 \pm 1,7$	3,0 – 10,8
GOT [U/l]	$25,2 \pm 5,9$	13 – 33
GPT [U/l]	$29,4 \pm 11,5$	10 – 59
γ GT [U/l]	$37,1 \pm 25,9$	14 – 104
Alkalische Phosphatase [U/l]	$56,3 \pm 16,8$	16 – 96
Bilirubin [mg/dl]	$0,57 \pm 0,30$	0,3 – 1,4
Hämoglobin [g/dl]	$14,3 \pm 1,2$	12,2 – 16,8
Erythrozyten [$10^{12}/\text{l}$]	$4,85 \pm 0,37$	4,06 – 5,64
Hämatokrit [%]	$41,3 \pm 2,8$	37 – 47
MCH [pg]	$29,4 \pm 1,9$	24 – 32
MCHC [g/dl]	$34,4 \pm 1,1$	32 – 36
MCV [fl]	$85,4 \pm 3,4$	76 – 90
Thrombozyten [$10^9/\text{l}$]	$234,1 \pm 53,4$	139 – 364

Bei keinem Probanden führte die Beurteilung anhand des HbA_{1C}- und Nüchtern glukose-Wertes gemäß dem DDG-Schema (siehe Abbildung 13 auf Seite 31) aus der ersten Blutent-

nahme zur Diagnose eines bisher nicht-diagnostizierten Diabetes mellitus. Ein Proband zeigte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Eine leicht abnorme Nüchternplasmaglukose (Bereich: 100-125 mg/dl) lag bei sieben Probanden vor, bei fünf Probanden ein leicht erhöhter HbA_{1C}-Wert (Bereich: 39 bis <48 mmol/mol). Der oGTT stellte sich bei allen Probanden unauffällig dar (2h Plasma-Glukose <140 mmol/mol).

Bei den Studienteilnehmern handelte es sich um nahezu gesunde Probanden, die angaben, sich im Allgemeinen ausgewogen und omnivor zu ernähren (Ausnahme: 1 Vegetarierin). Folgende gesundheitlichen Probleme wurden per Anamnesefragebogen erhoben: Hypothyreose (N=3), Hypertonie (N=2), leichte Gastritis (N=2), Anämie (N=1), Multiple Sklerose (N=1). Einige Probanden gaben eine regelmäßige Einnahme folgender Präparate an: Vitamin D (N=4), Thyroxin (N=3), Sevkar (N=1), Bisoprolol (N=1), Iodid (N=1), Pantoprazol (N=1), Letrozol (N=1), Equinova (N=1). Drei Probanden gaben ferner an, gelegentlich Nahrungsergänzungsmittel und Vitaminpräparate wie Omega 3 Fettsäuren und Folsäure einzunehmen.

3.1.1 Kolmogorov-Smirnov-Test

Es zeigte sich, dass TMAO vor oFTT und DMG vor oGTT nicht normalverteilt waren. Die logarithmierten TMAO-Werte waren vor und nach oFTT normalverteilt, die logarithmierten DMG-Werte vor oGTT nicht. Für die weitere Analyse wurden die nicht logarithmierten DMG-Werte verwendet.

3.1.2 Vergleich Parameterkonzentrationen innerhalb eines Tests

Der zeitliche Abstand zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme betrug beim oFTT 4 Stunden, beim oGTT 2 Stunden. Die Konzentrationsänderungen zwischen den Blutentnahmen wurden vor und nach oFTT bzw. oGTT innerhalb eines Tests für die Parameter Betain, Cholin, DMG, TMA, TMAO, Taurin, SAH, SAM und Glukose mittels gepaarter t-Testanalyse vergleichend untersucht. Beim oFTT wurden zusätzlich Cholesterin und Triglyceride betrachtet.

Signifikante Änderungen mit abnehmenden Konzentrationen durch den oFTT zeigten die Parameterkonzentrationen für Betain, Cholin und Glukose. Die Triglyceridkonzentrationen nahmen signifikant zu. Durch den oGTT veränderten sich die Konzentrationen für Cholin, DMG, TMAO, Taurin und SAM signifikant. Die Konzentration von Cholin nahm im Mittel durch den oGTT zu, während die mittleren Konzentrationen von DMG, TMAO, Taurin und SAM abnahmen. Die Ergebnisse signifikanter Änderungen zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Messparameter mit signifikanten Konzentrationsänderungen durch den oFTT bzw. oGTT. Verglichen werden die Konzentrationen zu den Zeitpunkten vor und nach Durchführung innerhalb eines Tests.

Parameter	Konzentration	Mittelwert \pm SD	Richtung der Änderung*	p-Wert** (zweiseitig)
Betain [μ M]	vor oFTT	33,4 \pm 9,2	↓	0,003
	nach oFTT	31,7 \pm 9,3		
Cholin [μ M]	vor oFTT	10,6 \pm 2,3	↓	0,004
	nach oFTT	9,2 \pm 2,3		
Glukose [mg/dl]	vor oFTT	97 \pm 8	↓	<0,001
	nach oFTT	90 \pm 6		
Triglyceride [mg/dl]	vor oFTT	112 \pm 53	↑	<0,001
	nach oFTT	224 \pm 117		
Cholin [μ M]	vor oGTT	10,1 \pm 2,5	↑	<0,001
	nach oGTT	11,1 \pm 2,7		
DMG [μ M]	vor oGTT	2,0 \pm 0,8	↓	0,005
	nach oGTT	1,7 \pm 0,8		
TMAO [μ M]	vor oGTT	4,0 \pm 2,1	↓	0,029
	nach oGTT	3,5 \pm 2,1		
Taurin [μ M]	vor oGTT	47,7 \pm 9,1	↓	0,020
	nach oGTT	44,5 \pm 7,8		
SAM [nM]	vor oGTT	103 \pm 18	↓	0,041
	nach oGTT	96 \pm 17		

Die Berechnung erfolgte auf Grundlage von 18 Probanden

* Richtung der mittleren Konzentrationsänderung durch den Test (oFTT bzw. oGTT)

** p-Werte durch Analyse im abhängigen t-Test zwischen den Gruppen vor und nach Durchführung innerhalb eines Tests (paired t-test) (Signifikanzniveau: <0,05)

3.1.3 Vergleich der Parameterkonzentrationen vor Testdurchführung

Der oFTT und oGTT wurden im zeitlichen Abstand einiger Tage (Median = 7 Tage) durchgeführt. Die Konzentrationen vor der Durchführung des oFTT und oGTT wurden als Mittelwerte für Betain, Cholin, SAH, Taurin, Glukose, SAM, DMG, TMA, TMAO bestimmt und im gepaarten t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ergaben sich keine Anhalte für Unterschiede in den Parameterkonzentrationen an beiden Testtagen, siehe Abbildung 17.

3.1.4 Relative Konzentrationsänderung

Die relativen Konzentrationsänderungen wurden berechnet, indem die Werte nach dem oFTT bzw. oGTT von denen vor den Tests subtrahiert wurden. Diese Änderungen wurden anschließend zwischen beiden Tests im gepaarten t-Test verglichen. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ unterschieden sich die relativen Konzentrationsänderungen von Cholin zwischen dem oFTT und oGTT. Der Vergleich für die Δ TMAO-Konzentrationen war mit einem Wert von $p = 0,050$ grenzwertig. Eine Tendenz mit einem p-Wert zwischen

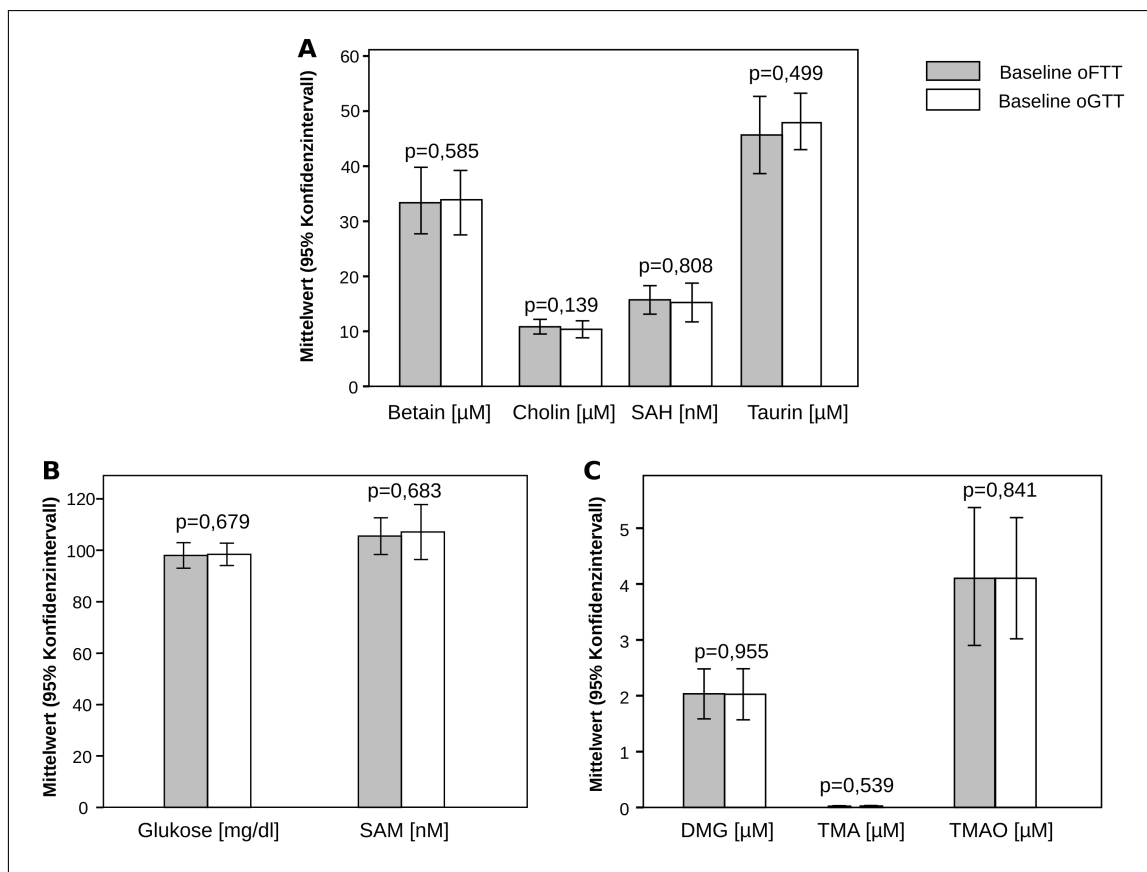


Abbildung 17: A-C Konzentrationen der Metabolite vor oFTT/oGTT (Signifikanzniveau $p < 0,05$) im zeitlichen Abstand der Durchführung zwischen oFTT und oGTT: Median = 7 Tage. Die Auswertung für SAH/SAM basiert auf einer Fallzahl von 13 Probanden, für die restlichen Parameter beim oGTT auf einer Fallzahl von 17 Probanden (Ausnahme: Glukose mit 18 Probanden) und für den oFTT mit 18 Probanden.

0,05 und 0,10 lag außerdem bei ΔBetain , ΔDMG und ΔSAM vor. Die Ergebnisse des Vergleichs zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Prüfung auf signifikante Parameteränderungen vergleichend zwischen zwei unabhängigen Tests (oFTT und oGTT).

Parameter	oFTT* (nach abzüglich vor)	oGTT* (nach abzüglich vor)	p-Wert**
Δ Betain	$-1,7 \pm 2,1$	$-0,05 \pm 2,88$	0,057
Δ Cholin	$-1,5 \pm 1,9$	$1,07 \pm 0,92$	$<0,001$
Δ TMAO	$1,5 \pm 3,7$	$-0,46 \pm 0,82$	0,050
Δ DMG	$-0,05 \pm 0,30$	$-0,32 \pm 0,40$	0,093
Δ Taurin	$2,8 \pm 16,97$	$-3,1 \pm 5,2$	0,206
Δ SAM	$-0,99 \pm 7,1$	$-6,5 \pm 12,6$	0,078
Δ SAH	$-0,91 \pm 5,2$	$-0,79 \pm 3,47$	0,913
Δ Glukose	$-7,33 \pm 5,81$	$-7,61 \pm 22,11$	0,959

Berechnung erfolgte auf Grundlage von 18 Fällen

* Werte angegeben als Mittelwert \pm SD

** p-Werte durch abhängige t-Testanalyse zwischen Gruppen oFTT und oGTT (paired t-test)

Zur Berechnung der Parameterdifferenzen wurden die vor dem oFTT bzw. oGTT erhobenen Daten von den danach ermittelten subtrahiert.

Da keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen vor den Testdurchführungen bestanden (siehe Abschnitt 3.1.3), wurde von einer Adjustierung auf die Anfangskonzentrationen abgesehen.

3.1.5 Vergleich der Parameterkonzentration nach Testdurchführung

Die mittleren Parameterkonzentrationen nach Durchführung des oFTT und oGTT wurden im gepaarten t-Test verglichen. Auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bestanden signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen oFTT und oGTT bei Cholin und DMG. TMAO ($p = 0,051$) und Betain ($p = 0,056$) zeigten auf dem Signifikanzniveau von $p = 0,05 - 0,10$ eine signifikante Tendenz. Die Ergebnisse des t-Tests aller Testparameter zeigt Abbildung 18.

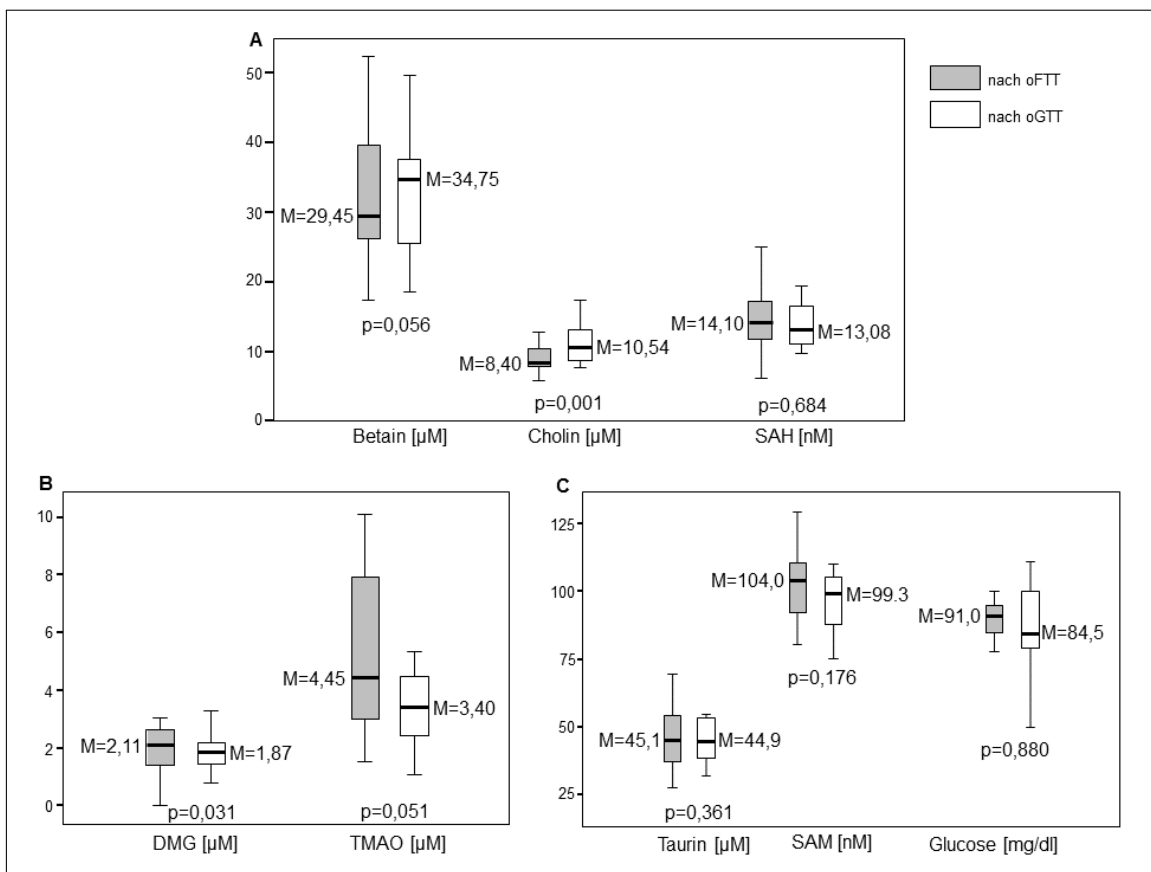


Abbildung 18: A-C Boxplot der Parameterkonzentrationen im Vergleich nach oFTT/oGTT (Signifikanzniveau: $p < 0,05$). Angegeben sind die Mediane (M) und p-Werte (zweiseitig). Die Auswertung für SAH/SAM basiert auf einer Fallzahl von 13 Probanden, für die restlichen Parameter beim oGTT auf einer Fallzahl von 17 Probanden (Ausnahme: Glukose mit 18 Probanden) und für den oFTT mit 18 Probanden.

3.1.6 Prüfung auf bivariate Korrelation

Im Spearman Rho-Test wurden die Konzentrationsveränderungen von Betain, Cholin, DMG, TMAO, Taurin, SAM, SAH und Glukose auf bivariate Korrelationen untersucht

(die Analyse erfolgte mit den Parameterdifferenzen: Konzentrationen nach abzüglich vor oFTT bzw. oGTT). Alle signifikanten Korrelationen der Analyse sind in Tabelle 11 für den oFTT und oGTT dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach dem Spearman Rho-Test für signifikant korrelierende Δ -Marker nach oFTT und oGTT. Der Vergleich der Parameterdifferenzen erfolgte innerhalb eines Tests (oFTT oder oGTT).

Parameter	oFTT		oGTT	
	Δ DMG	Δ Glukose	Δ Taurin	Δ SAH
Δ Betain	r=0,494 (p=0,037)	-	-	r=-0,762 (p<0,001)
Δ TMAO	r=0,534 (p=0,023)	-	-	-
Δ Taurin	-	r=0,532 (p=0,023)	-	-
Δ SAH*	-	r=-0,572 (p=0,041)	-	-
Δ SAM	-	-	r=0,602 (p=0,008)	-

Die Berechnung erfolgte auf Grundlage einer Fallzahl von 18 Fällen (Ausnahme Δ SAH*: N=13)

Alle Werte sind als Korrelationskoeffizient mit zugehörigem p-Wert (zweiseitig) angegeben.

Es sind nur signifikante Korrelationen gezeigt (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Δ Werte berechnet als Konzentrationen nach abzüglich vor oFTT bzw. oGTT.

Unter Fettbelastung zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen Δ DMG mit Δ Betain und Δ TMAO sowie zwischen Δ Glukose mit Δ Taurin und Δ SAH.

Unter Glukosebelastung korrelierten Δ SAH mit Δ Betain und Δ Taurin mit Δ SAM. Die Korrelationen für Δ SAH sind im Gegensatz zu den anderen Parametern nicht gleichgerichtet korreliert. Alle signifikanten Korrelationen zeigen eine große Effektstärke mit einem Korrelationskoeffizienten $r \geq |0,5|$ (Ausnahme: Betain grenzwertig mit $r=0,494$).

3.1.7 Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede

Mittels One-way ANOVA-Test wurde ein signifikanter Unterschied in den Parameterkonzentrationen zwischen der Gruppe der Männer und der Frauen festgestellt. Die relativen Konzentrationsänderungen der Parameter (Δ Werte berechnet als Konzentrationen nach abzüglich vor oFTT bzw. oGTT) unterschieden sich jedoch nur unwesentlich zwischen den Geschlechtern. Lediglich die Werte der Altersverteilung, des B/H-Index und der Veränderung der Glukosekonzentrationen (im oFTT und oGTT) variierte signifikant zwischen Männern und Frauen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnisse des ANOVA-Tests zur Untersuchung auf Unterschiede in den persönlichen Maßzahlen und Δ Konzentrationen der MS-Daten nach oFTT und oGTT zwischen Männern und Frauen.

	Parameter	Männer*	Frauen*	p-Wert**
	Alter [Jahre]	58 \pm 4,9	52 \pm 4,7	0,013
	BMI [kg/m ²]	26,0 \pm 3,9	27,4 \pm 6,2	0,611
	B/H	0,99 \pm 0,07	0,87 \pm 0,09	0,008
oFTT	Δ Betain	-1,59 \pm 1,98	-1,79 \pm 2,28	0,842
	Δ Cholin	-1,10 \pm 1,93	-1,75 \pm 1,90	0,480
	Δ TMAO	2,27 \pm 5,10	0,85 \pm 2,25	0,438
	Δ DMG	-0,045 \pm 0,379	-0,046 \pm 0,241	0,991
	Δ Taurin	5,92 \pm 25,73	0,37 \pm 3,74	0,508
	Δ SAM	-1,39 \pm 12,03	-1,23 \pm 2,21	0,972
	Δ SAH	2,27 \pm 3,43	-1,51 \pm 6,39	0,252
	Δ Glukose	-10,8 \pm 4,5	-4,6 \pm 5,4	0,020
	Δ Triglyceride	110,9 \pm 80,4	112,5 \pm 73,7	0,965
oGTT	Δ Betain	-0,56 \pm 3,67	0,40 \pm 2,07	0,508
	Δ Cholin	1,34 \pm 1,11	0,83 \pm 0,69	0,268
	Δ TMAO	-0,52 \pm 0,43	-0,47 \pm 1,10	0,908
	Δ DMG	-0,405 \pm 0,409	-0,235 \pm 0,397	0,399
	Δ Taurin	-2,66 \pm 5,86	-3,10 \pm 4,95	0,868
	Δ SAM	-6,28 \pm 8,86	-8,68 \pm 16,91	0,777
	Δ SAH	-1,24 \pm 3,28	0,46 \pm 4,03	0,446
	Δ Glukose	-19,8 \pm 21,9	2,1 \pm 17,8	0,032

Die Auswertung für SAH/SAM basiert auf einer Fallzahl von 13 Probanden, für die restlichen Parameter beim oGTT auf einer Fallzahl von 17 Probanden (Ausnahme: Glukose von 18 Probanden) und für den oFTT sowie die persönlichen Maßzahlen von 18 Probanden.

Δ Werte berechnet als Konzentrationen nach abzüglich vor oFTT bzw. oGTT.

* Werte angegeben als Mittelwert \pm SD

** p-Werte des Gruppenvergleichs zwischen Männern und Frauen nach One-way ANOVA-Test.

3.2 Studie zur Abhängigkeit von TMAO und HDL

Die Auswertung der HDL-Studie erfolgte mit 331 Proben in annähernd ausgeglichener Probenzahl für Männer und Frauen (Männer: N=168; Frauen: N=163). Ein breites HDL-Spektrum und insbesondere eine hohe Probenzahl im mittleren HDL-Bereich von 30 - 79 mg/dl wurden erfasst. Nach Messung mittels UPLC-Tandem MS wurden zwei der 333 gesammelten Proben ausgeschlossen, da für sie vergleichsweise auffällig hohe TMAO-Konzentrationen ($\geq 45 \mu\text{M}$) bestimmt worden waren. Die Ausreißer hätten die Auswertungsergebnisse verfälschen können. Die untenstehende Abbildung 19 zeigt für die HDL-Bereiche die kumulative Probenanzahl unter Berücksichtigung des Geschlechts.

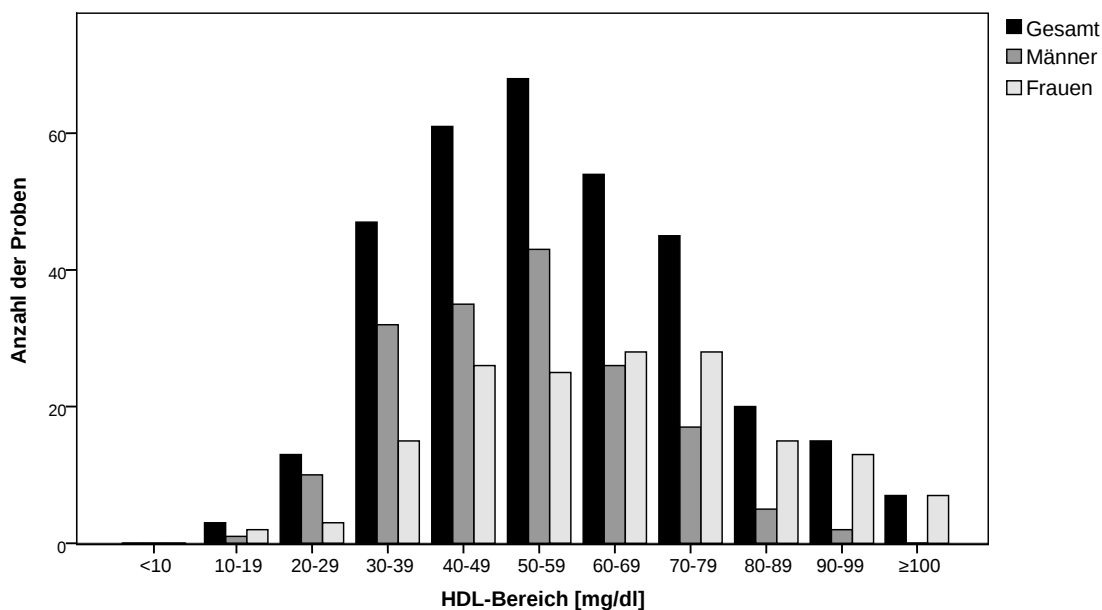


Abbildung 19: Gezeigt ist die Probenverteilung über den HDL-Bereich unter Berücksichtigung des Geschlechts (N=333).

3.2.1 Kolmogorov-Smirnov-Test

Bei der Prüfung auf Vorliegen einer Normalverteilung durch graphische Auswertung, lagen die folgenden Werte normalverteilt vor: Kreatinin, GFR, Cholesterol, HDL, LDL, Hb, Hkt, MCV. GOT war als grenzwertig zu betrachten. Die Werte für TAG, GPT, CRP und TMAO lagen nicht normalverteilt vor.

In der Abschätzung nach p-Werten (Signifikanzniveau $p < 0,05$) zeigten folgende Parameter eine Normalverteilung: GFR/logGFR, Cholesterin (grenzwertig), Atherogener Index, logHDL, logCholesterin, logTAG, logKreatinin, logGOT, logGPT. Den folgenden Parametern lag keine Normalverteilung zu Grunde: Kreatinin, TAG, HDL, LDL, GOT, GPT, Hb, Hkt, MCV, CRP, TMAO, logCRP, logMCV, logTMAO. Da für TMAO keine Normalverteilung vorlag, wurden zur Beschreibung der Konzentrationsänderung im zeitlichen Verlauf nicht-parametrische Tests zur weiteren Auswertung verwendet. Die Änderungen im Cholin-Stoffwechsel wurden mit den logarithmierten Werten im t-Test evaluiert.

3.2.2 Deskriptive Statistik und Geschlechtervergleich

Die Datenauswertung erfolgte unter Berücksichtigung einer Aufteilung in drei Gruppen: Gesamtgruppe, Gruppe der Frauen und Gruppe der Männer. Tabelle 13 zeigt Anzahl, Median und 25. - 75. Perzentil-Intervall für die Analysemarker jeder Gruppe.

Mithilfe des Mann-Whitney-U-Test wurden die Parameterkonzentrationen beider Geschlechter verglichen und der p-Wert berechnet (Signifikanzniveau: $p < 0,05$), um signifikante Diskrepanzen zu erkennen. Folgende Parameter unterschieden sich signifikant zwischen Männern und Frauen ($p < 0,05$): Alter, Atherogener Index, Cholesterol (gesamt),

Tabelle 13: Übersicht über verschiedene Marker unter Berücksichtigung des Geschlechts. Gezeigt sind zudem die Ergebnisse des Gruppenvergleichs zwischen Männern und Frauen.

Marker	Frauen und Männer*	Frauen*	Männer*	p-Wert**
Anzahl (N)	331	163	168	
TMAO [μ M]	3,3 [2,4 – 4,6]	3,3 [2,4 – 4,8]	3,3 [2,4 – 4,5]	0,755
HDL [mM]	1,42 [1,11 – 1,81]	1,63 [1,24 – 2,02]	1,32 [1,01 – 1,58]	< 0,001
LDL [mM] (berechnet)***	3,01 [2,31 – 3,83]	3,02 [2,36 – 3,88]	2,91 [2,20 – 3,66]	0,157
Cholesterin (gesamt) [mM]	4,78 [4,09 – 5,63]	5,15 [4,30 – 5,97]	4,55 [3,89 – 5,35]	< 0,001
Triacylglyceride [mM]	1,20 [0,87 – 1,81]	1,19 [0,88 – 1,88]	1,21 [0,87 – 1,71]	0,905
GOT [U/l]	23 [19 – 27]	22 [18 – 25]	24 [20 – 29]	< 0,001
GPT [U/l]	22 [17 – 30]	21 [16 – 26]	25 [19 – 35]	< 0,001
Kreatinin [μ M]	72,9 [65,4 – 83,1]	67,2 [61,0 – 72,5]	79,6 [72,5 – 90,2]	< 0,001
GFR [ml/min]	90 [78 – 102]	88 [77 – 100]	92 [80 – 104]	0,128
Atherogener Index	-0,07 [-0,26 – 0,14]	-0,14 [-0,33 – 0,12]	-0,01 [-0,22 – 0,21]	0,007
CRP [mg/l]	1,2 [0,6 – 3,0]	1,4 [0,8 – 3,2]	1,2 [0,5 – 2,8]	0,223
Hb [g/dl]	14,2 [13,3 – 15,0]	13,7 [12,9 – 14,4]	14,9 [13,8 – 15,6]	< 0,001
Hkt [%]	41 [38 – 43]	40 [38 – 42]	42 [40 – 44]	< 0,001
MCV [fl]	86 [84 – 89]	86 [84 – 89]	87 [84 – 89]	0,449
Alter	55 [41 – 65]	54 [40 – 66]	57 [43 – 65]	0,429

* Die angegebenen Werte zeigen den Median [25. - 75. Perzentil].

**p-Wertbestimmung (zweiseitig) erfolgte nach dem Mann-Whitney-U Test.

***Berechnung: LDL = TAG/5 + HDL

Umrechnungsfaktoren in SI-Einheiten: Cholesterin 1 mM = 38,66 mg/dl; Kreatinin 1 mM = 0,0113 mg/dl; Triglyceride 1 mM = 88,5 mg/dl

GOT, GPT, Hb, HDL, Hkt, Kreatinin. Da sich zwischen den Gruppen in mehreren Parametern signifikante Diskrepanzen zeigten, erfolgte die weitere Auswertung für beide Geschlechter getrennt.

3.2.3 Abhängigkeiten zwischen TMAO- und HDL-Konzentrationen (Stratifizierungsanalyse)

Um auf Assoziationen zwischen TMAO- und HDL-Konzentrationen zu untersuchen, erfolgte eine Aufteilung der HDL- und TMAO-Konzentrationen in Quintile getrennt für Männer und Frauen. Im Mann-Whitney-U-Test wurde die Verteilung der Parameter-Quintile mit den HDL- bzw. TMAO-Quintilen verglichen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Abhängigkeit: HDL- von TMAO-Konzentrationen

Die Einteilung nach HDL-Quintilen zeigte in der Gruppe der Männer signifikante Übereinstimmungen in den Rangsummen für HDL, LDL, TAG, Atherogener Index, GPT, in der Gruppe der Frauen zusätzlich für Cholesterin (gesamt) und Alter, wobei für die GPT-Quintile nur eine Tendenz mit einem p-Wert zwischen 0,05 - 0,10 vorlag. Mit den TMAO-Quintilen lagen weder in der Gruppe der Männer noch in der Gruppe der Frauen signifikante Übereinstimmungen vor. Die Ergebnisse der HDL-Quintilanalyse zeigt Tabelle 14.

Abhängigkeit: TMAO- von HDL-Konzentrationen

Für die Einteilung nach TMAO-Quintilen zeigten die Rangsummen für TMAO, Kreatinin und die GFR in der Gruppe der Männer, für TMAO, GOT, GPT, die GFR und das Alter (AI grenzwertig mit $p = 0,05$) in der Gruppe der Frauen signifikante Übereinstimmungen, wobei für die TMAO-Werte mit einem p-Wert von 0,059 eine Tendenz zu verzeichnen ist. Mit den HDL-Quintilen lagen weder in der Gruppe der Männer noch in der Gruppe der Frauen signifikante Übereinstimmungen vor. Die Ergebnisse der TMAO-Quintilanalyse zeigt Tabelle 15.

Insgesamt lieferten die HDL- und TMAO-Ränge in der Analyse weder nach HDL-Quintilen, noch nach TMAO-Quintilen Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen den Verteilungen.

Tabelle 14: Aufteilung nach HDL-Quintilen getrennt nach Männern und Frauen sowie das Ergebnis des Quintilvergleichs.

Marker	Q1*	Q2*	Q3*	Q4*	Q5*	p-Wert**
Männer						
TMAO [μ M]	3,9 \pm 2,9	3,6 \pm 2,1	4,2 \pm 2,4	3,2 \pm 1,5	4,5 \pm 3,1	0,266
HDL [mM]	0,81 \pm 0,11	1,08 \pm 0,07	1,33 \pm 0,06	1,52 \pm 0,07	1,91 \pm 0,21	< 0,001
LDL [mM] (berechnet)***	3,11 \pm 0,93	3,23 \pm 1,02	3,23 \pm 1,05	2,98 \pm 1,09	2,49 \pm 0,99	0,017
Cholesterin (gesamt) [mM]	4,33 \pm 0,99	4,64 \pm 1,11	4,83 \pm 1,08	4,71 \pm 1,11	4,62 \pm 1,05	0,412
Triacylglyceride [mM]	2,03 \pm 1,26	1,71 \pm 0,94	1,37 \pm 0,67	1,06 \pm 0,44	1,05 \pm 0,44	< 0,001
GOT [U/l]	25 \pm 8	27 \pm 11	26 \pm 7	24 \pm 4	25 \pm 8	0,408
GPT [U/l]	29 \pm 16	35 \pm 21	32 \pm 15	24 \pm 9	26 \pm 12	0,042
Kreatinin [μ M]	82,4 \pm 10,6	80,0 \pm 15,2	82,7 \pm 13,6	78,6 \pm 11,3	83,3 \pm 14,4	0,560
GFR [ml/min]	93 \pm 17	96 \pm 21	93 \pm 19	92 \pm 15	88 \pm 15	0,381
Atherogener Index	0,34 \pm 0,26	0,15 \pm 0,21	-0,03 \pm 0,19	-0,19 \pm 0,18	-0,29 \pm 0,19	< 0,001
Alter [Jahre]	52 \pm 17	51 \pm 16	51 \pm 16	58 \pm 18	57 \pm 15	0,218
Frauen						
TMAO [μ M]	4,4 \pm 2,4	4,3 \pm 5,1	4,0 \pm 2,5	4,1 \pm 2,4	3,4 \pm 1,9	0,748
HDL [mM]	0,95 \pm 0,18	1,32 \pm 0,11	1,64 \pm 0,09	1,95 \pm 0,09	2,43 \pm 0,25	< 0,001
LDL [mM] (berechnet)***	3,11 \pm 1,29	3,54 \pm 1,18	3,43 \pm 0,95	3,14 \pm 0,86	2,68 \pm 0,94	0,014
Cholesterin (gesamt) [mM]	4,56 \pm 1,45	5,17 \pm 1,25	5,35 \pm 1,01	5,32 \pm 0,90	5,32 \pm 0,94	0,034
Triacylglyceride [mM]	2,48 \pm 1,64	1,56 \pm 0,71	1,40 \pm 0,63	1,16 \pm 0,57	0,99 \pm 0,48	< 0,001
GOT [U/l]	23 \pm 9	23 \pm 5	21 \pm 7	22 \pm 4	23 \pm 6	0,482
GPT [U/l]	25 \pm 10	22 \pm 7	21 \pm 11	21 \pm 5	20 \pm 6	0,076
Kreatinin [μ M]	68,0 \pm 10,4	67,8 \pm 8,5	68,3 \pm 11,4	65,5 \pm 8,4	67,0 \pm 9,9	0,798
GFR [ml/min]	92 \pm 17	90 \pm 15	88 \pm 17	88 \pm 14	88 \pm 16	0,862
Atherogener Index	0,35 \pm 0,31	0,03 \pm 0,19	-0,10 \pm 0,17	-0,27 \pm 0,19	-0,44 \pm 0,24	< 0,001
Alter [Jahre]	46 \pm 18	50 \pm 18	52 \pm 18	58 \pm 15	56 \pm 15	0,028

* Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

**p-Wertbestimmung erfolgte nach dem Mann-Whitney-U Test.

***Berechnung: LDL = TAG/5 + HDL

Umrechnungsfaktoren in SI-Einheiten: Cholesterin 1 mM = 38,66 mg/dl; Kreatinin 1 mM = 0,0113 mg/dl; Triglyceride 1 mM = 88,5 mg/dl

Tabelle 15: Aufteilung nach TMAO-Quintile getrennt nach Männern und Frauen sowie das Ergebnis des Quintilvergleichs.

Marker	Q1*	Q2*	Q3*	Q4*	Q5*	p-Wert**
Männer						
TMAO [μ M]	1,6 \pm 0,5	2,6 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	4,2 \pm 0,4	7,7 \pm 3,1	< 0,001
HDL [mM]	1,32 \pm 0,41	1,29 \pm 0,38	1,29 \pm 0,41	1,31 \pm 0,33	1,41 \pm 0,45	0,728
LDL [mM] (berechnet)***	2,91 \pm 1,07	3,09 \pm 0,94	3,18 \pm 1,10	3,05 \pm 1,09	2,82 \pm 1,02	0,645
Cholesterin (gesamt) [mM]	4,49 \pm 1,19	4,70 \pm 0,88	4,79 \pm 1,12	4,63 \pm 1,19	4,52 \pm 0,95	0,759
Triacylglyceride [mM]	1,30 \pm 0,64	1,59 \pm 1,12	1,61 \pm 1,23	1,35 \pm 0,62	1,41 \pm 0,65	0,491
GOT [U/l]	26 \pm 9	23 \pm 6	25 \pm 7	28 \pm 9	26 \pm 7	0,110
GPT [U/l]	29 \pm 17	26 \pm 13	27 \pm 14	34 \pm 20	31 \pm 14	0,338
Kreatinin [μ M]	75,1 \pm 13,7	80,7 \pm 8,9	81,8 \pm 14,8	80,5 \pm 12,0	89,0 \pm 12,7	0,001
GFR [ml/min]	102 \pm 20	95 \pm 15	92 \pm 17	91 \pm 15	83 \pm 17	< 0,001
Atherogener Index	-0,03 \pm 0,25	0,03 \pm 0,35	0,04 \pm 0,38	-0,01 \pm 0,24	-0,02 \pm 0,30	0,846
Alter [Jahre]	49 \pm 17	52 \pm 17	53 \pm 16	58 \pm 17	57 \pm 14	0,231
Frauen						
TMAO [μ M]	1,4 \pm 0,4	2,6 \pm 0,3	3,4 \pm 0,3	4,5 \pm 0,4	8,5 \pm 4,3	< 0,001
HDL [mM]	1,65 \pm 0,58	1,75 \pm 0,50	1,77 \pm 0,54	1,52 \pm 0,52	1,59 \pm 0,50	0,235
LDL [mM] (berechnet)***	3,18 \pm 0,96	3,00 \pm 1,05	3,19 \pm 0,94	3,61 \pm 1,39	2,94 \pm 0,91	0,111
Cholesterin (gesamt) [mM]	5,12 \pm 1,09	5,04 \pm 1,11	5,21 \pm 1,01	5,49 \pm 1,50	4,89 \pm 0,89	0,286
Triacylglyceride [mM]	1,47 \pm 0,78	1,30 \pm 0,62	1,20 \pm 0,87	1,86 \pm 1,53	1,67 \pm 0,95	0,059
GOT [U/l]	24 \pm 7	19 \pm 5	23 \pm 8	23 \pm 6	23 \pm 6	0,007
GPT [U/l]	23 \pm 10	18 \pm 6	21 \pm 8	23 \pm 9	24 \pm 8	0,037
Kreatinin [μ M]	64,4 \pm 9,7	68,8 \pm 10,6	67,5 \pm 9,0	69,2 \pm 10,0	66,4 \pm 9,3	0,275
GFR [ml/min]	95 \pm 13	94 \pm 17	85 \pm 16	88 \pm 16	84 \pm 14	0,014
Atherogener Index	-0,07 \pm 0,34	-0,16 \pm 0,29	-0,21 \pm 0,34	0,02 \pm 0,37	-0,03 \pm 0,35	0,050
Alter [Jahre]	46 \pm 18	44 \pm 17	59 \pm 15	50 \pm 16	62 \pm 15	< 0,001

* Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

**p-Wertbestimmung erfolgte nach dem Mann-Whitney-U Test.

***Berechnung: LDL = TAG/5 + HDL

Umrechnungsfaktoren in SI-Einheiten: Cholesterin 1 mM = 38,66 mg/dl; Kreatinin 1 mM = 0,0113 mg/dl; Triglyceride 1 mM = 88,5 mg/dl

3.3 Studie zur Wirkung von Xenobiotika (Abirateronazetat) auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel

Die Probenzahl umfasste 34 männliche Patienten mit bekanntem Prostatakarzinom (Gleason-Score: Median = 8) im Alter von $72 \pm 6,2$ Jahren (Mittelwert \pm SD). Die analysierte Probenzahl beider Therapiegruppen war annähernd ausgeglichen (Therapie A: N=18; Therapie B: N=16). Die Messungen von TMA, TMAO, Taurin, Betain, Cholin und DMG erfolgte aus dem EDTA-Plasma zum Zeitpunkt des Therapiebeginns (Zeitpunkt 1), die Routineparameter wurden am selben Tag oder wenige Tage vorab bestimmt. Der Abstand von der Routineparameterbestimmung zum Therapiebeginn betrug: Median = 0 Tage, Intervall = [0;36] Tage. Da in der überwiegenden Zahl der Fälle die Routineblutdiagnostik und der Therapiebeginn am selben Tag stattfanden, wird im Folgenden weiterhin keine Unterscheidung dieser Zeitpunkte vorgenommen, sondern es werden beide zusammen als Zeitpunkt 1 beschrieben.

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der deskriptiven Parameteranalyse zum Zeitpunkt 1 vor Therapiebeginn.

3.3.1 Kolmogorov-Smirnov-Test

Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergab für einige Parameter keine zugrundeliegende Normalverteilung. Nach Logarithmierung lagen insgesamt mehr Parameter normalverteilt vor. Zur weiteren Auswertung wurden daher die logarithmierten Daten verwendet. Nicht normalverteilt waren bei Therapie A LogAlbumin, LogHkt, LogTriglyceride, LogTMA (Zeitpunkt 1); LogAlbumin, LogHb, LogTriglyceride, LogLDL, LogHDL, LogGOT, LogGPT (Zeitpunkt 2); LogAlbumin, LogBetain, LogHkt (Zeitpunkt 3) und bei Therapie B: LogBetain (Zeitpunkt 1); LogAlbumin, LogBetain, LogGOT, LogGPT (Zeitpunkt 3).

Da die Testosteron- und Dehydroepiandrosteron (DHEA)-Werte zum Zeitpunkt 2 und 3 bei allen Studienteilnehmern durch die Androgenproduktionshemmung nach Abirateronazetatgabe auf einen Wert von Null abgefallen waren, war keine Logarithmierung möglich.

3.3.2 Mittelwertvergleich der Therapiegruppen A und B zu den gemessenen Zeitpunkten (1, 2 und 3)

Die Mittelwerte aller Messparameter wurden zu allen Zeitpunkten zwischen den Therapiegruppen A und B verglichen. Der hierfür verwendete t-Test zwischen zwei unabhängigen Gruppen zeigte auf dem 5 %-Signifikanzniveau keine Unterschiede in den Konzentrationen zu den betrachteten Zeitpunkten außer bei logTMAO am Besuch 1, siehe Tabelle 16. Mit p-Werten zwischen 0,05 und 0,10 im t-Test lag zudem eine tendenzielle

Signifikanz der Hämatokrit-Werte zu Beginn ($p=0,069$) sowie der Betain- ($p=0,082$) und DMG-Werte ($p=0,069$) zum Zeitpunkt 2 vor. Im Levene-Test zeigten LogGOT (zu Beginn) und LogAlbumin (Zeitpunkt 2 und 3) Varianzungleichheit jedoch ohne signifikante Unterschiede im Welch-Test. Beide Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Altersverteilung ($p=0,459$).

Tabelle 16: Deskriptive Statistik der Gesamtstichprobenzahl (Fallzahl: $N=34$), Therapie A ($N=18$) und B ($N=16$).

Parameter	Therapie			p-Werte**
	gesamt: A \cup B	A	B	
Alter [Jahre]	72 \pm 6,2	71 \pm 6,4	72 \pm 6,1	0,459
BMI [kg/m ²]	27,2 \pm 3,8	26,5 \pm 3,7	27,9 \pm 3,8	0,264
Hämoglobin [g/dl]	13,4 \pm 0,8	13,2 \pm 0,7	13,6 \pm 0,9	0,259
Thrombozyten [$10^9/l$]	247 \pm 75,2	247 \pm 69	248 \pm 84,4	0,886
Hkt [%]	39 \pm 2,4	38 \pm 1,7	40 \pm 2,9	0,069
Kreatinin [mg/dl]	0,94 \pm 0,2	0,93 \pm 0,2	0,96 \pm 0,2	0,579
GFR [ml/min]	82 \pm 19	85 \pm 21	80 \pm 17	0,557
Triglyceride [mg/dl]	164 \pm 74	161 \pm 81	169 \pm 66	0,621
Cholesterin [mg/dl]	207 \pm 47	212 \pm 36	200 \pm 58	0,345
LDL [mg/dl]	129 \pm 39	130 \pm 33	127 \pm 47	0,620
HDL [mg/dl]	53 \pm 16	55 \pm 20	50 \pm 10	0,564
GOT [U/l]	29 \pm 13,8	26 \pm 4,4	33 \pm 19,3	0,224
GPT [U/l]	22 \pm 13,0	20 \pm 7,1	26 \pm 17,3	0,343
Albumin [g/dl]	10,5 \pm 16,5	10,7 \pm 18,0	10,2 \pm 15,0	0,910
PSA [ng/ml]	76,5 \pm 112,6	80,3 \pm 101,0	72,5 \pm 127,5	0,982
LH [IE/l]	0,10 \pm 0,25	0,08 \pm 0,21	0,13 \pm 0,30	0,694
FSH [IE/l]	3,38 \pm 1,76	3,19 \pm 1,55	3,59 \pm 1,99	0,955
Testosteron [ng/ml]	0,12 \pm 0,13	0,11 \pm 0,11	0,12 \pm 0,15	0,835
DHEA [μ g/l]	825 \pm 915	795 \pm 645	860 \pm 1170	0,593
TMA [μ M]	0,05 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02	0,205
TMAO [μ M]	5,0 \pm 4,6	3,7 \pm 2,1	6,4 \pm 6,2	0,036
Taurin [μ M]	56,2 \pm 25,7	50,4 \pm 17,5	62,7 \pm 31,9	0,200
Betain [μ M]	41,3 \pm 28,7	41,0 \pm 13,1	41,8 \pm 40,2	0,403
Cholin [μ M]	10,6 \pm 2,9	10,4 \pm 3,0	10,9 \pm 2,8	0,629
DMG [μ M]	3,17 \pm 1,5	3,19 \pm 1,0	3,15 \pm 2,0	0,533
Tumor- (T-Stadium)*	3 [1;4]	2,5 [1;4]	3 [1;3]	
Gleason-Score*	8 [5;10]	8 [5;10]	8 [5;10]	

Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung. Ausnahme:

*Tumorstadium und Gleason-Score angegeben als Median mit Interquartilabstand.

**p-Wertbestimmung (zweiseitig) erfolgte mit den logarithmierten Parameterwerten mittels t-Test zwischen unabhängigen Gruppen (Therapie A und B).

3.3.3 Abhängiger t-Test: Parameteränderung im Studienverlauf

Der abhängige t-Test wurde für Therapiegruppe A und B zwischen den Zeitpunkten 1 und 2, 1 und 3 sowie 2 und 3 durchgeführt. Signifikante Änderungen im TMAO-Stoffwechsel ergaben sich in den TMA-Konzentrationen. In Therapiegruppe A fielen die Konzentrationen zwischenzeitlich signifikant und stiegen zum Zeitpunkt 3 durchschnittlich wieder auf den Ausgangswert, während in Therapiegruppe B ein leichter Anstieg der Durchschnittskonzentration zum Zeitpunkt 3 zu verzeichnen war. Die TMAO-Werte änderten sich ausschließlich in der Therapiegruppe A signifikant ($p=0,018$ bzw. $p=0,007$) mit einem Anstieg der Durchschnittskonzentration. Im Cholin-Stoffwechsel fanden sich Veränderungen der Konzentrationen von Betain und Cholin, die DMG-Spiegel änderten sich nur in Therapiegruppe B signifikant. Die Betain-Konzentrationen fielen in beiden Therapiegruppen zwischenzeitlich ab und stiegen vom Zeitpunkt 2 zum Zeitpunkt 3 wieder an. Die Cholin-Konzentrationen zeigten in beiden Gruppen dagegen zunächst einen Anstieg zum Zeitpunkt 2 und fielen dann wieder ab. Eine Änderung über längere Zeit (Zeitpunkt 1 nach 3) fand sich nur in der Betain-Konzentration für Therapiegruppe A. Die signifikantesten Ergebnisse des t-Tests (inklusive der Routineparameter) zeigt Tabelle 17.

3.3.4 Untersuchung auf Unterschiede in den Konzentrationsänderungen von TMAO zwischen Therapiegruppe A und B

Es wurden die Zahl der Proben aus Therapiegruppe A und B berechnet, die eine Änderung der TMAO-Konzentrationen von Zeitpunkt 1 zu 2 und von Zeitpunkt 1 zu 3 aufwiesen. Der Anteil an Patienten, deren TMAO-Konzentrationen im Zeitverlauf anstiegen, wurde mittels exaktem X^2 -Test nach Fisher zwischen den Therapiegruppen verglichen. Mit einem p-Wert von 0,300 für den Vergleich zum Zeitpunkt 1 nach 2 bzw. 0,169 für den Vergleich zum Zeitpunkt 1 nach 3 zeigten sich somit auf dem 5 %-Signifikanzniveau keine signifikanten Diskrepanzen zwischen beiden Therapiegruppen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 18.

Da sich die Anfangskonzentrationen für TMAO nach Ergebnissen des unabhängigen t-Tests zwischen den beiden Therapiegruppen signifikant unterschieden, erfolgte eine Analyse des Einflusses der Baseline auf die zeitliche TMAO-Konzentrationsänderung. Hierzu wurde die prozentuale Konzentrationsänderung für Zeitpunkt 1 nach 2 und Zeitpunkt 1 nach 3 auf die Baseline normiert folgenderweise berechnet:

$$\frac{\text{Differenz der Konzentrationen} \cdot 100}{\text{Baseline}} = \text{prozentuale Änderung} \quad (3.1)$$

Im ANOVA-Test erfolgte der Vergleich der prozentualen Änderung bezogen auf die Ba-

Tabelle 17: Testung der logarithmierten Messwerte auf signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf der Studie.

Parameter	Therapie A			Therapie B		
	Zeitpunkt			Zeitpunkt		
	1 & 2	1 & 3	2 & 3	1 & 2	1 & 3	2 & 3
LogTMA	0,052	-	0,012	-	-	0,036
LogTMAO	0,018	0,007	-	-	-	-
LogBetain	0,001	0,027	0,002	0,007	-	0,001
LogCholin	0,001	-	0,011	0,012	-	0,070
LogDMG	-	-	-	0,026	-	0,027
LogBMI	-	-	-	0,098	0,074	-
LogHämoglobin	0,095	0,086	-	-	-	-
LogHämatokrit	0,027	0,050	-	-	-	-
LogThrombozyten	0,061	-	-	0,008	-	-
LogCholesterin	-	0,062	-	-	0,098	-
LogHDL	-	0,001	-	<0,001	0,004	-
LogLDL	-	-	-	-	-	0,031
LogGPT	0,099	0,076	-	-	-	-
LogPSA	0,009	0,001	0,002	0,023	0,050	0,005
LogFSH	-	0,012	-	-	0,047	0,010
LogLH	-	-	-	-	0,094	<0,001

Gezeigt sind die signifikanten p-Werte (zweiseitig) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Tendenz: $0,05 < p < 0,10$).

seline zwischen den beiden Therapiegruppen für Zeitpunkt 1 nach 2 sowie für Zeitpunkt 1 nach 3. Auf dem 5 %-Signifikanzniveau ergaben sich mit einem p-Wert von 0,305 für Zeitpunkt 1 nach 2 und von 0,231 für Zeitpunkt 1 nach 3 keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Änderung zwischen beiden Therapiegruppen, siehe Tabelle 18.

Tabelle 18: Vergleich der Konzentrationsänderung von TMAO im exakten X^2 -Test zwischen Therapiegruppe A und B sowie Adjustierung auf die Baseline im ANOVA-Test.

Zeitpunkt	$N_{[TMAO]\uparrow}$	$N_{[TMAO]\downarrow}$	X^2 -Test (nach Fisher)	ANOVA
1 → 2	21	12	0,300	0,305
1 → 3	20	13	0,169	0,231

*p-Wertbestimmung (zweiseitig) mittels exaktem Test nach Fisher (Signifikanzniveau: < 0,05)

3.4 Validität der erhobenen Messwerte

Gellekink et al. zeigten, dass sich in nicht-angesäuerten Proben die Konzentration von SAM/SAH rasch ändern (nach 3 Stunden bei Raumtemperatur SAM-Abfall um 10 %, SAH-Anstieg um 24 %). Die Ansäuerung der EDTA-Aliquotierung zur SAH-/SAM-Messung diente der Stabilisierung beider Parameter [57] und erfolgte in einem Zeitfenster von 30 Minuten, um Konzentrationsveränderungen zu minimieren. Bei der anschließenden Lagerungstemperatur von -70°C wurde von Kirsch et al. kein offenkundiger SAM-Abbau über mindestens 1 Jahr beobachtet [76]. TMAO und Taurin können bei -70°C 14 Monate gelagert werden und zeigen auch nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen keine relevanten Konzentrationsveränderungen [6]. Die Taurin-Konzentrationen steigen jedoch im EDTA-Plasma an, sofern keine schnelle Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen erfolgt [6]. Für TMA liegen derzeit keine Stabilitätsstudien vor. Da es sich allerdings um ein volatiles Gas (Siedepunkt: $2,9^\circ\text{C}$) handelt [67], könnte die Konzentrationsbestimmung fehlerhaft sein und zu falschen Schlüssen führen. Für Betain, Cholin und DMG zeigten Kirsch et al. Stabilität der Parameter im Plasma für mindestens 6 Monate bei der Lagerungstemperatur von -70°C sowie bei mehrfachem Einfrieren und Auftauen [77].

Die Proben der in dieser Arbeit beschriebenen Studien wurden innerhalb der nachgewiesenen Stabilitätskonformitäten der einzelnen Parameter temperiert und zeitlich begrenzt (< 6 Monate) gelagert sowie adäquat verarbeitet. Lediglich für die Studie zur Wirkung von Xenobiotika auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel erfolgte die Probenlagerung länger als zur sicheren Stabilität der Parameter nachgewiesen. Die UPLC-Tandem MS Messung erfolgte 0,5 - 2 Jahre nach Probensammlung.

4 Diskussion und abschließende Beurteilung

TMAO rückte durch Assoziation als Molekül mit prothrombotischem und diabetogenem Potential mit Wirkung auf Cholesterol-, Gallensäuren- und Insulinstoffwechsel verstärkt in den Fokus der aktuellen Forschung. Diese Arbeit zeigte:

1. oFTT und oGTT bewirkten bei gesunden Probanden innerhalb weniger Stunden Konzentrationsänderungen von TMAO- und C1-Stoffwechselfparametern:
 - Durch den oFTT fielen die Betain- und Cholin-Konzentrationen.
 - Der oGTT führte zum Anstieg der Cholin-Konzentrationen sowie zum signifikanten Abfall der DMG-, SAM- und TMAO-Konzentrationen.
2. Bei beiden Geschlechtern bestand kein direkter Zusammenhang von HDL-Cholesterol- und TMAO-Konzentrationen im Blutplasma. Männer und Frauen unterschieden sich anfänglich in mehreren Parametern (u.a. HDL- und Gesamtcholesterol).
3. Nach Abirateronazetatgabe stieg die TMAO-Konzentration in Therapiegruppe A. Die Therapiegruppen unterschieden sich in den Anfangskonzentrationen an TMAO signifikant, allerdings in der prozentualen Konzentrationsänderung unter Berücksichtigung des TMAO-Ausgangswerts (Zeitpunkt 1) nicht.

4.1 Cholin-Stoffwechsel nach oralem Fett- und Glukosetoleranztest (Pilotstudie)

Inzidenz und Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 steigen ab dem 50. Lebensjahr zunehmend und erreichen den Altersgipfel bei 85 Jahren [159]. Die Prävalenz einer Fettstoffwechselstörung nimmt ebenfalls mit dem Alter zu [132]. Das Risiko für beginnende Glukose- und Fettstoffwechselstörungen steigt in der Altersgruppe unserer Probanden zwischen 45 und 65 Jahren epidemiologisch stark an, und die Früherkennung erlangt zunehmende Relevanz. Die Festsetzung eines begrenzten Altersbereichs der Probanden bezweckte unter anderem verzerrende Effekte durch altersabhängige Faktoren zu minimieren. Der oFTT und oGTT zeigten signifikante Veränderungen in mehreren Parametern des TMAO- und Cholin-Stoffwechsels, die potentielle Marker für den Fett- und Glukosestoffwechsel darstellen.

Obwohl davon auszugehen ist, dass mit dem oFTT exogen Cholin zugeführt wurde, kam es zum signifikanten Abfall von Betain und Cholin. TMAO zeigte keine signifikante Konzentrationsänderung.

Boutagy et al. stellten nach akuter Fettbelastung (63 % Fettgehalt) einen TMAO-Anstieg fest, der über 4 Stunden anhielt und sich infolge 5-tägiger fettreicher Kost (55 % Fettgehalt) verstärkte. In den Konzentrationen an Cholin, L-Carnitin und Betain wurden nach Fettbelastung keine Änderungen detektiert. Lediglich nach 5-tägiger fettreicher Kost wurden 2 Stunden nach Fettbelastung einmalig niedrigere Betain-Konzentrationen gemessen [19].

Im Unterschied zu unserer Studie verwendeten Boutagy et al. als Test zur akuten Fettbelastung keine Sahne, sondern ein Menü bestehend aus je zwei Wurst-, Ei- und Käsebroten mit höchstwahrscheinlich wesentlich höherem Gehalt an Cholin, L-Carnitin und Methionin. Die höhere Zufuhr von Cholin- und L-Carnitin könnte den TMAO-Anstieg verursacht haben. Entsprechend stellten Miller et al. bei Konsum von zwei Eiern einen signifikanten Anstieg der TMAO-Konzentrationen fest [103]. Die in unserem oFTT enthaltene Menge könnte so gering gewesen sein, dass der überwiegende Teil enteral resorbiert wurde und nur ein kleiner verbleibender Teil der bakteriellen TMA-Synthese zur Verfügung stand.

Wir beobachteten bei der Hälfte der Probanden steigende, bei der anderen Hälfte leicht fallende bis gleichbleibende TMAO-Konzentrationen. Das interindividuelle Potential, TMAO zu generieren, hängt insbesondere von Unterschieden in der Ernährung und im Mikrobiom ab. Genetische Unterschiede der FMO3-Aktivität spielen eher eine untergeordnete Rolle [60]. Im Vergleich zu Boutagy et al. befolgten unsere Probanden im Vorfeld des Fettbelastungstests keine einheitliche Diät. Über die Ernährungsgewohnheiten unserer Probanden ist uns ihren Angaben zufolge bekannt, dass sie sich mit einer Ausnahme (Vegetarierin) ausgewogen omnivor ernähren.

Im Unterschied zu Boutagy et al. stellten wir eine Abnahme der Cholin-Konzentration fest. Über die Umwandlung zu Betain ist Cholin in den C1-Stoffwechsel eingebunden. Katalysiert durch die BHMT reagiert Betain mit Homocystein zu DMG und Methionin. Wir beobachteten eine positive Korrelation zwischen Δ DMG und Δ Betain, die DMG-Konzentration änderte sich nicht. Denkbar ist, dass die Reaktion von Betain zu DMG durch den oFTT zwar konstant abläuft, aber weniger Betain durch Cholin gebildet wird. Cholin wurde nach oFTT womöglich verstärkt für den Lipidtransport und die -synthese benötigt. Dadurch standen geringere Konzentrationen für die Reaktion zu Betain zur Verfügung. Über die Regulation der Reaktion von Cholin zu Betain ist wenig bekannt, vermutlich wird sie maßgeblich über den Cholin-Transport in die Mitochondrien gesteuert und weniger über die enzymatische Aktivität [147].

Gleichbleibende Cholin- und Betain-Konzentrationen, wie von Boutagy et al. detektiert, könnten mit der Aufnahme Methionin- und Protein-reicher Nahrung verbunden sein. Diese wirkt auf die BHMT aktivitätsmindernd [53], mit geringerem Umsatz von Betain zu

Methionin. Die hohe Cholinaufnahme hat den vermehrten Cholinverbrauch im Fettstoffwechsel möglicherweise maskiert.

Nach oGTT zeigten sich bemerkenswerterweise fallende Konzentrationen an TMAO und SAM. Bei Diabetikern wurden in der Vergangenheit erhöhte Plasmakonzentrationen beider Parameter gemessen [116]. TMAO ist dabei konzentrationsabhängig mit einem steigenden Risiko für Diabetes mellitus 2 assoziiert [140].

Nach Glukoseaufnahme im oGTT wird vom Körper bereits nach wenigen Minuten vermehrt Insulin ausgeschüttet. Insulin übt eine supprimierende Wirkung auf die FMO3 in vitro [102] und einen modulierenden Einfluss auf die Aktivität von Enzymen im C1-Stoffwechsel aus [112]. Eine Suppression der FMO3 könnte zum TMAO-Abfall geführt haben. Die TMA-Konzentration änderte sich jedoch nicht signifikant, was womöglich durch Regulationsmechanismen wie einer vermehrten Ausscheidung mit dem Urin kompensiert wurde. Denkbar ist auch, dass TMAO nach Glukosebelastung vermehrt in die Zellen aufgenommen wurde, möglicherweise zum Schutz vor osmotischem Stress.

Bei fettleibigen, insulinresistenten Patienten wurden erhöhte FMO3-Level in der Leber beobachtet [102]. Glukagon und Glukokortikoide, die durch einen veränderten Hormonstoffwechsel bei Diabetikern erhöht sind, verursachten eine verstärkte FMO3-Genexpression [102]. Bei Diabetes-Risikopatienten wurden nach oGTT jedoch keine Zusammenhänge zwischen TMAO-Spiegeln und der Insulinsensitivität im Plasma festgestellt [127]. Eine vermehrte Ausscheidung oder Umverteilung als Kompensationsmechanismus wurden dabei nicht untersucht.

Nieman und Schalinske stellten fest, dass bei diabetischen Ratten mehrere Enzyme des C1-Stoffwechsels Aktivitätsveränderungen aufweisen. Sie mutmaßten, dass die Blutglukosespiegel regulatorisch auf die Glycin N-Methyltransferase (GNMT)- und PEMT-Aktivität sowie den Homocysteinspiegel wirken [112]. Die GNMT katalysiert die Reaktion von Sarkosin und SAH aus Glycin und SAM. Eine Steigerung der PEMT-Aktivität nach Glukoseaufnahme würde die steigenden Cholin- und sinkenden SAM-Spiegel erklären. Die Konzentration von SAH stieg allerdings nicht.

SAM hemmt die BHMT [114]. Fallende SAM-Konzentrationen hätten zu einer geringeren Hemmung der BHMT führen müssen. Ein Anstieg von DMG und Betain war jedoch trotz hoher Cholin-Konzentration nicht zu verzeichnen. Stattdessen sank die Konzentration an DMG (ebenfalls ein Inhibitor der BHMT [114]), während die Betainkonzentration keine signifikante Änderung zeigte. Ho et al. beobachteten bei 337 nicht-Diabetikern ebenfalls einen durch oGTT ausgelösten Abfall der DMG-Konzentration [62]. Bei Diabetikern zeigte sich gegenüber Gesunden eine größere Schwankungsbreite der Plasma-

und Urinkonzentrationen von Betain und DMG [92]. Die Schwankungsbreite korrelierte mit der Glukoseexkretion. Eine vermehrte Ausscheidung von DMG und/oder Betain ist denkbar. Nieman und Schalinske beobachteten zudem eine Assoziation des Blutglukosespiegels mit der GNMT- und PEMT-Aktivität [112]. Möglicherweise wirkt der Blutglukosespiegel auch auf die BHMT-Aktivität.

Die Expression der Enzyme des C1-Stoffwechsels hängt zudem von der Ernährung ab. Induzierende und inhibierende Effekte können sich je nach Enzymlevel eventuell unterschiedlich darstellen.

SAM wirkt zudem auf die Cystathionin- β -Synthase aktivierend, die an der Taurinproduktion beteiligt ist [114]. Neben einer positiven Korrelation von Δ SAM und Δ Taurin beobachteten wir sinkende Taurin-Spiegel. Eine geringere Aktivierung durch eine niedrigere SAM-Konzentration könnte die Taurinproduktion verringert haben. Fortwährender Verbrauch hat dabei den Konzentrationsabfall bewirkt.

Insgesamt nahmen infolge des oGTT C1-Donatoren (SAM, DMG) ab. Die Fallzahl der Studie war limitiert und die Durchführung mit größerer Fallzahl wäre erforderlich, um die beobachteten Ergebnisse zu bestätigen. Interessant wäre auch eine vergleichende Analyse zwischen Hochrisikopatienten (z.B. mit familiärer Häufung von Fett- bzw. Glukosestoffwechselstörungen) und Patienten mit normalem Risiko, um die Effekte nach oFTT und oGTT zu vergleichen und zu bestätigen.

4.2 Studie zur Abhängigkeit von TMAO und HDL

In der Pathogenese der Atherosklerose gilt eine Dyslipoproteinämie mit einer hohen Konzentration an LDL-Cholesterin als maßgeblicher Atherosklerose-fördernder Faktor, während hohen HDL-Cholesterinkonzentrationen protektives Potential beigemessen wird. Auch TMAO wird Atherosklerose-förderndes Potential und eine Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels zugeschrieben [78, 175].

Im Mausmodell entdeckten Koeth et al., dass TMAO den reversen Cholesteroltransport hemmt [78]. Die mRNA-Level von LDL-Rezeptoren und Cholesterolsynthesegenen blieben von TMAO unbeeinflusst, ebenso wie der Plasmaspiegel von Gesamt- und HDL-Cholesterol. Die Expression von Transportern des reversen Cholesteroltransports änderte sich jedoch. Collins et al. konnten proatherosklerotische Eigenschaften von TMAO hingegen nicht bestätigen, fanden aber ebenfalls keine Änderungen der Cholesterol- oder Triglyceridkonzentrationen durch TMAO [36]. Die Verteilung von Cholesterol auf die Hauptklassen (VLDL, LDL, HDL) blieb unverändert.

Eine Assoziation von HDL- und TMAO-Plasmakonzentrationen konnten wir ebenfalls nicht nachweisen. In der Gruppe der Frauen (nicht jedoch der Männer) stellten wir aller-

dings tendenziell einen Zusammenhang der TMAO- mit den Triglycerid-Quintilen fest. Gleichzeitig war auch eine signifikante Übereinstimmung mit den Leberwerten zu erkennen. Die Leber als Hauptproduktionsort von TMAO und zentrales Organ des Lipidstoffwechsels könnte diese Zusammenhänge der TMAO- mit den Triglycerid-Quintilen möglicherweise vermittelt haben. Allerdings ist die Leber auch das Schlüsselorgan des Cholesterinstoffwechsels, und in der Quintilaufteilung nach HDL-Konzentrationen fanden sich keine Assoziationen mit den Konzentrationen an TMAO. Zudem zeigten die TMAO-Quintile nur in der Gruppe der Frauen tendenziell auch eine Übereinstimmung mit der Verteilung des Atherogenen Index.

Während sich die Ergebnisse von Koeth et al. und Collins et al. auf Experimente an Mäusen stützten, stellten Wang et al. mit unserem Ergebnis beim Menschen übereinstimmend fest, dass keine Assoziationen zwischen TMAO- und HDL-Plasmakonzentrationen bestehen [175]. Im Vergleich zur Studie von Wang et al. berücksichtigten wir bei unserer Probenauswahl jedoch zusätzliche Selektionskriterien, um Verfälschungen der TMAO-Plasmaspiegel z.B. durch eine herabgesetzte Leber- oder Nierenleistung zu minimieren. Zudem achteten wir darauf, ein breites HDL-Spektrum abzudecken.

Die Ernährung und die Einnahme von Medikamenten können den Cholesterin- und TMAO-Spiegel modifizieren. In einer 14-wöchigen Ernährungsstudie untersuchten DiMarco et al. die Zusammenhänge zwischen Cholesterin- und TMAO-Plasmaspiegel infolge diätetisch hohem Cholesterol- und Cholin-Konsum in Form von Ei-reicher Kost bei gesunden, jungen Frauen und Männern. Sie beobachteten ein Ansteigen von HDL- und Absinken des LDL-/HDL-Cholesterinquotienten, während sich die TMAO-Nüchternkonzentrationen im Plasma nicht veränderten [46]. Ein Zusammenhang von HDL- und TMAO-Konzentrationen war im Plasma somit ebenfalls nicht nachzuweisen. DiMarco et al. zeigten zudem, dass postprandiale TMAO-Anstiege z.B. nach starkem Konsum von Cholin vorzufinden und diese großen interindividuellen Schwankungen unterworfen sind [46]. Der Zeitpunkt der Blutentnahme erlangt daher für die Datenanalyse durchaus Bedeutung.

Die FMO3 ist nicht nur das Schlüsselenzym der TMAO-Produktion, sondern scheint auch eine wesentliche Funktion im Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsel einzunehmen [102, 175, 179]. Die bisherigen Untersuchungen stützten sich zumeist auf Experimente an Mäusen. Eine Induktion der FMO-Expression korrelierte mit gesteigerter Atherosklerose und verminderten HDL-Spiegeln im Blut [175]. Ein Knock-Down der FMO3 führte zu Veränderungen der biliären Lipidsekretion, des Makrophagen-vermittelten reversen Cholesteroltransports und der intestinalen Cholesterolabsorption [179]. Die Konzentrationen an VLDL- und LDL-Cholesterin sanken in der Folge ab, während die HDL-Cholesterinkonzentrationen konstant blieben [179]. Warrier et al. schrieben der FMO3

zentrale regulatorische Funktionen im Cholesterin- und Lipidstoffwechsel zu, unabhängig von der Rolle der TMAO-Produktion [179]. Die Frage ist, inwiefern die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

Inwieweit Atherosklerose und TMAO-Spiegel zusammenhängen und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen, bedarf weiterer Untersuchungen. Ein Zusammenhang zwischen TMAO- und HDL-Konzentrationen scheint allerdings zumindest im Blutplasma nicht messbar zu sein.

4.3 Studie zur Wirkung von Xenobiotika (Abirateronazetat) auf den Cholin- und TMAO-Stoffwechsel

Zum Xenobiotika-Stoffwechsel tragen neben CYP-Enzymen FMO-Enzyme, vor allem die FMO3, bei [31, 39]. Xenobiotika können über die FMO3 zu Änderungen im TMAO-Stoffwechsel führen (siehe Tabelle 4, Seite 18). Die Wirkung von Abirateronazetat auf den TMAO-Stoffwechsel und die FMO3 ist bisher nicht bekannt.

Interaktionen von Abirateron (aktivierte Form von Abirateronazetat) mit CYP-Enzymen wie CYP2D6, CYP2C8 und CYP3A4 sind bekannt. Durch Hemmung von CYP17 wird die Androgenproduktion supprimiert [5]. In den Ausschlusskriterien der Studie ist die simultane Einnahme von Azolen aufgeführt, die starke CYP-Inhibitoren sind. Diese hätten unsere Analyse durch eine Verschiebung der Zuständigkeiten zwischen CYP- und FMO-Enzymen beeinflussen können.

FMO-Enzyme können viele N- und S-haltige Substanzen oxidieren [123]. Abirateronazetat (chemische Nomenklatur: 17-(3-Pyridyl)-5,16-androstadien-3 β -azetat) [110] erfüllt durch den am Sterolgerüst angehängten Pyridyl-Rest prinzipiell die Voraussetzung für eine N-Oxidation. Es ist allerdings schwer, die Substratspezifität für die FMO3 vorherzusagen [39]. Manche Xenobiotika werden primär nicht von der FMO3, sondern von einem anderen FMO-Isoenzym mit geringerem Anteil an der TMAO-Produktion verstoffwechselt [14, 29, 86]. Sofern Abirateron mit FMO-Enzymen interagiert, kann je nach Isoenzym die Auswirkung auf den TMAO-Stoffwechsel unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Eine signifikante Konzentrationsänderung von TMAO fand sich lediglich bei Therapiegruppe A. Ist diese durch Abirateronazetat verursacht, hätte sie in beiden Interventionsgruppen auftreten müssen. Bei konstanter Nierenleistung fand sich bei Therapiegruppe A ein leichter Anstieg der GPT, der eventuell auf die hepatotoxische Nebenwirkung von Abirateronazetat zurückzuführen ist [5]. Leberzellen als Hauptort der TMAO-Synthese könnten durch eine Schädigung einen TMAO-Anstieg verursacht haben, zumal TMAO in der Leber die höchsten Konzentrationen erreicht [146]. Bei Leberfunktionsstörungen

wie bei vermehrter Leberverfettung wurden bereits erhöhte TMAO-Spiegel im Plasma beobachtet [127]. In der prozentualen Konzentrationsänderung von TMAO lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor. Die Anfangskonzentrationen, die sich zwischen den Gruppen signifikant unterschieden, könnten die Reaktion beeinflusst haben. Möglicherweise war auch die Fallzahl zu gering, um Änderungen zu detektieren.

Bei einem Messabstand von mehreren Wochen können sich die Expressionsraten der FMO-Enzyme geändert haben. Die Expression der FMO3 wird als Hauptregulator des TMAO-Spiegels angesehen [14]. Starke Änderungen der Expressionsrate wirken sich jedoch weniger stark auf den TMAO-Spiegel aus [14, 175]. In der Zwischenzeit können sich Kompensationsmechanismen wie eine Änderung der TMAO-Ausscheidung oder Kumulation in den Leberzellen etabliert haben. Über die Regulationsmechanismen der TMAO-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten und Geweben ist wenig bekannt. Eine Wirkung von Xenobiotika auf FMO-Enzyme ist anhand von Plasmaspiegeln daher womöglich schwer abzuschätzen.

Geschlechtshormone wirken auf die FMO3 [7, 14, 80], ihre Einflüsse auf die TMAO-Level werden allerdings noch kontrovers diskutiert [80]. Durch die Einnahme von Abirateronazetat fiel die Testosteron- und DHEA-Produktion unter die Nachweisgrenze. Bei Mäusen wurden starke Testosteron-abhängige Herunterregulierungen der FMO3 registriert [14]. Beim Menschen fand sich Testosteron-abhängig eine veränderte Kapazität zur N-Oxidation [7]. Durch den Testosteronabfall wäre demnach ein Anstieg der TMAO-Werte in beiden Therapiegruppen zu erwarten gewesen.

Zudem kam es in beiden Therapiegruppen zu signifikanten Änderungen der Cholin- und Betain-Konzentrationen. Die Cholin-Werte stiegen invers zu den Betain-Werten zunächst an und fielen bis zum Zeitpunkt 3 wieder ab. Beim Prostatakarzinom wird Cholin verstärkt in die Zellen aufgenommen [155]. Bei Patienten mit Hormon-naivem Prostatakarzinom ließ sich unter Androgenentzug nach 2 Monaten eine reduzierte Aufnahme von Cholin feststellen [44]. Da Abirateron anti-androgen wirkt, könnte eine verminderte Cholin-Aufnahme in die Tumorzellen zum temporären Cholin-Anstieg im Blutplasma geführt haben.

Insgesamt fand sich kein Zusammenhang zwischen Abirateronazetat-Gabe und den TMAO-Plasmaspiegeln. Letztere stiegen entgegen früherer Beobachtungen trotz gesunkener Testosteronkonzentrationen nicht an. Es bleibt zu klären, ob Abirateronazetat mit Enzymen der FMO-Familie interagiert, inwieweit TMAO in der Leber akkumuliert und wie die Freisetzung ins Blutplasma reguliert ist.

4.4 Limitationen der Studien

Eine standardisierte Diät wurde vorab nicht durchgeführt und die mikrobielle Darmflora nicht untersucht. Zur Analyse des Cholin-Stoffwechsels nach oFTT und oGTT wurde jedoch auf die Teilnahme nahezu gesunder Probanden mit stabilem Ernährungsstatus Wert gelegt. Die Probanden gaben mit einer Ausnahme an, sich ausgeglichen omnivor zu ernähren. Inwiefern die beobachteten Konzentrationsänderungen auf Produktion, Ausscheidung und/oder Verteilung der TMAO- und C1-Stoffwechselformen im Körper beruhen, wäre in weiteren Untersuchungen zu klären.

Die HDL-Konzentrationen deckten ein breites Spektrum mit großer Fallzahl ab. Klinische Informationen zu Erkrankungen und Medikamenteneinnahme fehlten. Ein Einfluss hierdurch auf den TMAO-Stoffwechsel kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Selektionskriterien eine adäquate und zielführende Probenauswahl ermöglichten. Das große Probenkollektiv bezweckte, Störfaktoren von Einzelfällen zu nivellieren. Unsere Ergebnisse deckten sich zudem mit den Ergebnissen anderer Studien [46, 175]. Die Berücksichtigung der Ernährung und des Blutentnahmepunkts (z.B. nüchtern/postprandial) könnten zudem in einer künftigen Studie an einer gut charakterisierten Kohorte für ein noch homogeneres Untersuchungskollektiv sorgen.

Da die Proben der Xenobiotika-Studie im Rahmen einer urologischen Studie gesammelt wurden, fand eine Selektion unter dem Gesichtspunkt störender Einflüsse auf den TMAO-Stoffwechsel primär nicht statt. Informationen über die Studienteilnehmer (z.B. Interventionsgruppe, aktuelle Medikation, Routineparameter) waren standardisiert im MedCRF-Produktivsystem dokumentiert und standen uns zur Verfügung. Nicht enthalten waren Hinweise zu aktuellen Begleiterkrankungen, die mit veränderten TMAO-Plasmakonzentrationen einhergehen. Die Medikation mancher Probanden wirkt bekannterweise auf die FMO3 und die TMAO-Konzentrationen (z.B. β -Blocker [116], Statine [116]). Dies kann auch der Grund für die anfänglich signifikante Differenz des TMAO-Spiegels zwischen den Therapiegruppen sein, die sich in den Nieren-, Leber- und Hormonwerten sowie im Gleason-Score ansonsten nicht signifikant unterschieden.

4.5 Zusammenfassung

Akute Fett- und Glukosebelastung zeigten insbesondere im Cholin-Stoffwechsel signifikante Veränderungen der Metabolitkonzentrationen. Während durch den oFTT ein Abfall der Cholin-Plasmakonzentrationen auffiel, kam es durch den oGTT zu deren Anstieg. Nach dem oFTT fielen zudem die Konzentrationen an Betain und Glukose, während die Triglyceridkonzentrationen anstiegen. Durch den oGTT fielen dagegen die Konzentrationen der C1-Donatoren DMG und SAM sowie von Taurin und TMAO. Im Zeitverlauf unterschieden sich die Konzentrationsänderungen von Cholin, Betain, SAM und TMAO zwischen oFTT/oGTT signifikant und sprechen für eine unterschiedliche Reaktion auf akute Fett- und Glukosebelastung. Eine Untersuchung der Urinproben kann weitere Erkenntnisse zur Reaktion auf die Tests in den untersuchten Stoffwechselwegen liefern. Ein Vergleich mit Änderungen bei Hochrisikopatienten und größerer Fallzahl wäre interessant.

In der Quantilanalyse zeigte sich weder nach Aufteilung in TMAO-, noch in HDL-Quantile eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen an TMAO und HDL. Trotz Hinweise früherer wissenschaftlicher Analysen auf Zusammenhänge von TMAO mit dem Cholesterolfstoffwechsel sowie mit der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen konnten wir keine direkte Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln an TMAO und HDL beobachten. Inwiefern TMAO an atherosklerotischen Prozessen beteiligt ist, bedarf weiterer Abklärung.

Im Therapieverlauf fand sich bei Therapiegruppe A, nicht jedoch bei Therapiegruppe B eine signifikante Änderung der TMAO-Konzentration im Blutplasma. In der prozentualen Konzentrationsänderung unterschieden sich die Gruppen nicht. Möglicherweise haben die Ausgangskonzentrationen ein unterschiedliches Antwortverhalten geprägt oder die Fallzahl war zu gering, um einen Effekt in beiden Gruppen nachzuweisen. Trotz des Abfalls des Testosteron-Spiegels unter die Nachweisgrenze blieb ein TMAO-Anstieg in beiden Gruppen aus. Cholin stieg temporär an.

Ob Abirateronazetat Einflüsse auf Proteine der FMO-Familie besitzt und inwiefern sich anhand der Plasmakonzentrationen auf die FMO3-Aktivität und -Menge Rückschlüsse ziehen lassen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Literatur

- [1] Al-Waiz M, Mitchell SC, Idle JR, Smith RL (1987) The metabolism of ¹⁴C-labelled trimethylamine and its N-oxide in man. *Xenobiotica* 17:551-558
- [2] Al-Waiz M, Mitchell SC, Idle JR, Smith RL (1987) The relative importance of N-oxidation and N-demethylation in the metabolism of trimethylamine in man. *Toxicology* 43:117-121
- [3] Andersen PA, Kaasen I, Styrvold OB, Boulnois G, Strøm AR (1988) Molecular cloning, physical mapping and expression of the bet genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 134:1737-1746
- [4] Aron-Wisnewsky J, Clément K (2016) The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nature Reviews Nephrology* 12:169-181
- [5] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (2013) Zytiga[®] (Abitateron). Herbert-Lewin-Platz 1, 10623 Berlin
- [6] Awwad HM, Geisel J, Obeid R (2016) Determination of trimethylamine, trimethylamine N-oxide, and taurine in human plasma and urine by UHPLC-MS/MS technique. *Journal of Chromatography B* 1038:12-18
- [7] Ayesh R, Mitchell SC, Smith RL (1995) Dysfunctional N-oxidation of trimethylamine and the influence of testosterone treatment in man. *Pharmacogenetics* 5:244-246
- [8] Bae S, Ulrich CM, Neuhauser ML, Malysheva O, Bailey LB et al. (2014) Plasma choline metabolites and colorectal cancer risk in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Research* 74:7442-7452
- [9] Bain MA, Faull R, Fornasini G, Milne RW, Evans AM (2006) Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21:1300-1304
- [10] Barrett EL, Kwan HS (1985) Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annual Review of Microbiology* 39:131-149
- [11] Barton S, Navarro SL, Buas MF, Schwarz Y, Gu H et al. (2015) Targeted plasma metabolome response to variations in dietary glycemic load in a randomized, controlled, crossover feeding trial in healthy adults. *Food & Function* 6:2949-2956
- [12] Baskakov I, Bolen DW (1998) Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *The Journal of Biological Chemistry* 273:4831-4834

- [13] Baskakov I, Bolen DW (1998) Time-dependent effects of trimethylamine-N-oxide/urea on lactate dehydrogenase activity: An unexplored dimension of the adaptation paradigm. *Biophysical Journal* 74:2658-2665
- [14] Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y et al. (2013) Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell metabolism* 17:49-60
- [15] Bennion BJ, Daggett V (2004) Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: A chemical chaperone at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:6433-6438
- [16] Bergeron N, Williams PT, Lamendella R, Faghihnia N, Grube A et al. (2016) Diets high in resistant starch increase plasma levels of trimethylamine-N-oxide, a gut microbiome metabolite associated with CVD risk. *The British Journal of Nutrition* 116:2020-2029
- [17] Boini KM, Hussain T, Li PL, Koka S (2017) Trimethylamine-N-oxide instigates NLRP3 inflammasome activation and endothelial dysfunction. *Cellular Physiology and Biochemistry* 44:152-162
- [18] Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, Smithson AT, Englund TR et al. (2015) Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. *Obesity* 23:2357-2363
- [19] Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, Smithson AT, Englund TR et al. (2015) Short-term high-fat diet increases postprandial trimethylamine-N-oxide in humans. *Nutrition Research* 35:858-864
- [20] Bremer J, Greenberg DM (1961) Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine). *Biochimica et Biophysica Acta* 46:205-216
- [21] Brown JM, Hazen SL (2015) The gut microbial endocrine organ: Bacterially-derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annual Review of Medicine* 66:343-359
- [22] Buchman AL, Awal M, Jenden D, Roch M, Kang SH (2000) The effect of lecithin supplementation on plasma choline concentrations during a marathon. *Journal of the American College of Nutrition* 19:768-770
- [23] Canchi DR, García AE (2013) Cosolvent effects on protein stability. *Annual Review of Physical Chemistry* 64:273-293

- [24] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772
- [25] Chao CK, Zeisel SH (1990) Formation of trimethylamine from dietary choline by *Streptococcus sanguis* I, which colonizes the mouth. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1:89-97
- [26] Chen K, Zheng X, Feng M, Li D, Zhang H (2017) Gut microbiota-dependent metabolite trimethylamine N-oxide contributes to cardiac dysfunction in western diet-induced obese mice. *Frontiers in Physiology* 8:139
- [27] Chen ML, Yi L, Zhang Y, Zhou X, Ran L et al. (2016) Resveratrol attenuates trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis by regulating TMAO synthesis and bile acid metabolism via remodeling of the gut microbiota. *mBio* 7:e02210-15
- [28] Chen YM, Liu Y, Zhou RF, Chen XL, Wang C et al. (2016) Associations of gut flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Scientific Reports* 6:19076
- [29] Cherrington NJ, Yan Cao, Cherrington JW, Rose RL, Hodgson E (1998) Physiological factors affecting protein expression of flavin-containing monooxygenases 1, 3 and 5. *Xenobiotica* 28:673-682
- [30] Chhibber-Goel J, Gaur A, Singhal V, Parakh N, Bhargava B, Sharma A (2016) The complex metabolism of trimethylamine in humans: Endogenous and exogenous sources. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 18:e8
- [31] Chhibber-Goel J, Singhal V, Gaur A, Yogavel M, Sharma A (2017) Structure-function analysis of liver Flavin Monooxygenase 3 that drives trimethylaminuria in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 88:1681-1690
- [32] Cho CE, Caudill MA (2017) Trimethylamine-N-oxide: Friend, foe, or simply caught in the cross-fire? *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28:121-130
- [33] Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF et al. (2017) Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. *Molecular Nutrition & Food Research* 61

- [34] Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF et al. (2016) Trimethylamine-N-oxide biomarker response is a function of dietary precursor intake and gut microbiota composition in healthy young men. *The FASEB Journal* 30:406.6
- [35] Cole LK, Vance JE, Vance DE (2012) Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821:754-761
- [36] Collins HL, Drazul-Schrader D, Sulpizio AC, Koster PD, Williamson Y et al. (2016) L-Carnitine intake and high trimethylamine N-oxide plasma levels correlate with low aortic lesions in ApoE^{-/-} transgenic mice expressing CETP. *Atherosclerosis* 244:29-37
- [37] Craciun S, Balskus EP (2012) Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycy radical enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:21307-21312
- [38] Craig SA (2004) Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:539-549
- [39] Cruciani G, Valeri A, Goracci L, Pellegrino RM, Buonerba F, Baroni M (2014) Flavin monooxygenase metabolism: Why medicinal chemists should matter. *Journal of Medicinal Chemistry* 57:6183-6196
- [40] Dambrova M, Skapare-Makarova E, Konrade I, Pugovics O, Grinberga S et al. (2013) Meldonium decreases the diet-increased plasma levels of trimethylamine N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis. *The Journal of Clinical Pharmacology* 53:1095-1098
- [41] Dambrova M, Latkovskis G, Kuka J, Strele I, Konrade I et al. (2016) Diabetes is associated with higher trimethylamine N-oxide plasma levels. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 124:251-256
- [42] Day CR, Kempson SA (2016) Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1860:1098-1106
- [43] Degirolamo C, Rainaldi S, Bovenga F, Murzilli S, Moschetta A (2014) Microbiota modification with probiotics induces hepatic bile acid synthesis via downregulation of the Fxr-Fgf15 axis in mice. *Cell Reports* 7:12-18
- [44] DeGrado TR, Coleman RE, Wang S, Baldwin SW, Orr MD et al. (2001) Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled choline as an oncologic tracer for positron emission tomography: Initial findings in prostate cancer. *Cancer Research* 61:110-117

- [45] de Zwart FJ, Slow S, Payne RJ, Lever M, George PM et al. (2003) Glycine betaine and glycine betaine analogues in common foods. *Food Chemistry* 83:197-204
- [46] DiMarco DM, Missimer A, Murillo AG, Lemos BS, Malysheva OV et al. (2017) Intake of up to 3 eggs/day increases HDL cholesterol and plasma choline while plasma trimethylamine-N-oxide is unchanged in a healthy population. *Lipids* 52:255-263
- [47] Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR (1997) Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nature Genetics* 17:491-494
- [48] Duffy LC, Raiten DJ, Hubbard VS, Starke-Reed P (2015) Progress and challenges in developing metabolic footprints from diet in human gut microbial cometabolism. *The Journal of Nutrition* 145:1123S-1130S
- [49] Eckernås SÅ, Aquilonius SM (1977) Free choline in human plasma analysed by simple radio-enzymatic procedure: Age distribution and effect of a meal. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 37:183-187
- [50] Falls JG, Blake BL, Cao Y, Levi PE, Hodgson E (1995) Gender differences in hepatic expression of flavin-containing monooxygenase isoforms (FMO1, FMO3, and FMO5) in mice. *Journal of Biochemical Toxicology* 10:171-177
- [51] Falls JG, Ryu DY, Cao Y, Levi PE, Hodgson E (1997) Regulation of mouse liver Flavin-Containing Monooxygenases 1 and 3 by sex steroids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 342:212-223
- [52] Fennema D, Phillips IR, Shephard EA (2016) Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease. *Drug Metabolism and Disposition* 44:1839-1850
- [53] Finkelstein JD, Martin JJ (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 259:9508-9513
- [54] Fischer LM, daCosta KA, Kwock L, Stewart PW, Lu TS et al. (2007) Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85:1275-1285
- [55] Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q (2010) Role of carnitine in disease. *Nutrition & Metabolism* 7:30

- [56] Gao X, Liu X, Xu J, Xue C, Xue Y, Wang Y (2014) Dietary trimethylamine N-oxide exacerbates impaired glucose tolerance in mice fed a high fat diet. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118:476-481
- [57] Gellekink H, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van Rooij A, Struys EA, den Heijer M, Blom HJ (2005) Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma. *Clinical Chemistry* 51:1487-1492
- [58] Giskeødegård GF, Davies SK, Revell VL, Keun H, Skene DJ (2015) Diurnal rhythms in the human urine metabolome during sleep and total sleep deprivation. *Scientific Reports* 5:14843
- [59] Gluick TC, Yadav S (2003) Trimethylamine N-oxide stabilizes RNA tertiary structure and attenuates the denaturing effects of urea. *Journal of the American Chemical Society* 125:4418-4419
- [60] Hartiala J, Bennett BJ, Tang WH, Wang Z, Stewart AF et al. (2014) Comparative genome-wide association studies in mice and humans for trimethylamine N-oxide, a proatherogenic metabolite of choline and L-carnitine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34:1307-1313
- [61] Helman ML, Greenway FL (2016) A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. *Molecular Metabolism* 5:317-320
- [62] Ho JE, Larson MG, Vasan RS, Ghorbani A, Cheng S et al. (2013) Metabolite profiles during oral glucose challenge. *Diabetes* 62:2689-2698
- [63] Holm PI, Ueland PM, Kvalheim G, Lien EA (2003) Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49:286-294
- [64] Hoyles L, Jiménez-Pranteda ML, Chilloux J, Brial F, Myridakis A et al. (2018) Metabolic retroconversion of trimethylamine N-oxide and the gut microbiota. *Microbiome* 6:73
- [65] Hukkanen J, Dempsey D, Jacob P, Benowitz NL (2005) Effect of pregnancy on a measure of FMO3 activity. *British Journal of Clinical Pharmacology* 60:224-226
- [66] Huo T, Cai S, Lu X, Sha Y, Yu M, Li F (2009) Metabonomic study of biochemical changes in the serum of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of metformin hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 49:976-982

- [67] Institut für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung e.V. (DGUV) (April 2017) GESTIS-Stoffdatenbank: Trimethylamin. Aus: <http://gestis.itrust.de>
- [68] Institute of Medicine (1988) Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Choline. National Academies Press (US), Washington DC.
- [69] Jacob RA, Planalto FS, Henning SM, Zhang JZ, Swendseid ME (1995) In vivo methylation capacity is not impaired in healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *The Journal of Nutrition* 125:1495-1502
- [70] Jacob RA, Jenden DJ, Allman-Farinelli MA, Swendseid ME (1999) Folate nutrition alters choline status of women and men fed low choline diets. *The Journal of Nutrition* 129:712-717
- [71] Jameson E, Doxey AC, Airs R, Purdy KJ, Murrell JC, Chen Y (2016) Metagenomic data-mining reveals contrasting microbial populations responsible for trimethylamine formation in human gut and marine ecosystems. *Microbial genomics* 2:e000080
- [72] Jamieson AJ, Yancey PH (2012) On the validity of the Trieste flatfish: Dispelling the myth. *The Biological Bulletin* 222:171-175
- [73] Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM, Dalrymple LS, Kornak J et al. (2015) Associations of trimethylamine-N-oxide (TMAO) with nutritional and inflammatory biomarkers and cardiovascular outcomes in patients new to dialysis. *Journal of Renal Nutrition* 25:351-356
- [74] Kerner W, Brückel J (2012) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes. In: Kellerer M, Matthaei S im Auftrag der DDG (eds) *Diabetologie und Stoffwechsel. Supplement. Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft*. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York 7:84-87
- [75] Kim Y, Keogh J, Clifton P (2015) A review of potential metabolic etiologies of the observed association between red meat consumption and development of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 64:768-779
- [76] Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R (2009) Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 877:3865-3870

- [77] Kirsch SH, Herrmann W, Rabagny Y, Obeid R (2010) Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 878:3338-3344
- [78] Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E et al. (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* 19:576-585
- [79] Koeth RA, Levison BS, Culley MK, Buffa JA, Wang Z et al. (2014) γ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-Carnitine to TMAO. *Cell Metabolism* 20:799-812
- [80] Koukouritaki SB, Simpson P, Yeung CK, Rettie AE, Hines RN (2002) Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. *Pediatric Research* 51:236-243
- [81] Koukouritaki SB, Poch MT, Henderson MC, Siddens LK, Krueger SK et al. (2007) Identification and functional analysis of common human flavin-containing monooxygenase 3 genetic variants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320:266-273
- [82] Krueger SK, Williams DE (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* 106:357-387
- [83] Krüger R, Merz B, Rist MJ, Ferrario PG, Bub A et al. (2017) Associations of current diet with plasma and urine TMAO in the KarMeN study: direct and indirect contributions. *Molecular Nutrition Food Research* 61:1700363
- [84] Kühn T, Rohrmann S, Sookthai D, Johnson T, Katzke V et al. (2017) Intra-individual variation of plasma trimethylamine-N-oxide (TMAO), betaine and choline over 1 year. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 55:261-268
- [85] Kuka J, Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Liepins J, Cirule H et al. (2014) Suppression of intestinal microbiota-dependent production of pro-atherogenic trimethylamine N-oxide by shifting L-carnitine microbial degradation. *Life Sciences* 117:84-92
- [86] Lang DH, Yeung CK, Peter RM, Ibarra C, Gasser R et al. (1998) Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) and P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology* 56:1005-1012

- [87] Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS et al. (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5:e9085
- [88] LC GC's CHROMacademy: *Quantitative & Qualitative HPLC*. Crawford scientific. www.chromacademy.com [Stand: 08.Sept.2017]
- [89] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F et al. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500:541-546
- [90] Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V et al. (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *The Journal of Biological Chemistry* 278:25481-25489
- [91] Lever M, Slow S, Ueland PM (2011) Betaine: osmolyte and methyl donor. In: Herrmann W, Obeid R (eds) *Vitamins in the prevention of human diseases*. Walter de Gruyter & Co. KG, Berlin/New York, pp 563-598
- [92] Lever M, Slow S, McGregor DO, Dellow WJ, George PM, Chambers ST (2012) Variability of plasma and urine betaine in diabetes mellitus and its relationship to methionine load test responses: an observational study. *Cardiovascular Diabetology* 11:34
- [93] Li Z, Vance DE (2008) Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research* 49:1187-1194
- [94] Li X, Chen Y, Liu J, Yang G, Zhao J et al. (2012) Serum metabolic variables associated with impaired glucose tolerance induced by high-fat-high-cholesterol diet in *Macaca mulatta*. *Experimental Biology and Medicine* 237:1310-1321
- [95] Li Z, Li A, Gao J, Li H, Qin X (2016) Kidney tissue targeted metabolic profiling of unilateral ureteral obstruction rats by NMR. *Frontiers in Pharmacology* 7:307
- [96] Lin TY, Timasheff SN (1994) Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry* 33:12695-12701
- [97] Mackay RJ, McEntyre CJ, Henderson C, Lever M, George PM (2011) Trimethylaminuria: Causes and diagnosis of a socially distressing condition. *The Clinical Biochemist Reviews* 32:33-43
- [98] Mafra D, Borges NA, Cardozo LF, Anjos JS, Black AP et al. (2018) Red meat intake in chronic kidney disease patients: Two sides of the coin. *Nutrition* 46:26-32

- [99] Meadows JA, Wargo MJ (2015) Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology* 161:1161-1174
- [100] Méjean V, Iobbi-Nivol C, Lepelletier M, Giordano G, Chippaux M, Pascal MC (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Molecular Microbiology* 11:1169-1179
- [101] Meyer KA, Benton TZ, Bennett BJ, Jacobs DR, Lloyd-Jones DM et al. (2016) Microbiota-dependent metabolite trimethylamine N-oxide and coronary artery calcium in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study (CARDIA). *Journal of the American Heart Association* 5:e003970
- [102] Miao J, Ling AV, Manthena PV, Gearing ME, Graham MJ et al. (2015) Flavin-containing monooxygenase 3 as a potential player in diabetes-associated atherosclerosis. *Nature Communications* 6:6498
- [103] Miller CA, Corbin KD, da Costa KA, Zhang S, Zhao X et al. (2014) Effect of egg ingestion on trimethylamine-N-oxide production in humans: a randomized, controlled, dose-response study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 100:778-786
- [104] Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O et al. (2016) Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PLoS One* 11:e0141738
- [105] Mitchell SC, Smith RL (2001) Trimethylaminuria: The fish malodor syndrome. *Drug Metabolism and Disposition* 29:517-521
- [106] Mitchell SC, Zhang AQ, Smith RL (2002) Chemical and biological liberation of trimethylamine from foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 15:277-282
- [107] Mitchell SC, Smith RL (2016) Trimethylamine - the extracorporeal envoy. *Chemical Senses* 41:275-279
- [108] Mondul AM, Moore SC, Weinstein SJ, Karoly ED, Sampson JN, Albanes D (2015) Metabolomic analysis of prostate cancer risk in a prospective cohort: The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention (ATBC) study. *International Journal of Cancer* 137:2124-2132
- [109] Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A et al. (2015) Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. *Atherosclerosis* 243:638-644

- [110] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Abiraterone acetate, CID=9821849, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9821849> [Stand: März 2018]
- [111] Naumann E, Hippe H, Gottschalk G (1983) Betaine: New oxidant in the Stickland Reaction and methanogenesis from betaine and L-alanine by a *Clostridium sporogenes*-*Methanosarcina barkeri* coculture. *Applied and environmental microbiology* 45:474-83
- [112] Nieman KM, Schalinske KL (2011) Insulin administration abrogates perturbation of methyl group and homocysteine metabolism in streptozotocin-treated type 1 diabetic rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 301:E560-E565
- [113] Obeid R, Herrmann W (2009) Homocysteine and lipids: S-adenosyl methionine as a key intermediate. *FEBS Letters* 583:1215-1225
- [114] Obeid R (2013) The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients* 5:3481-3495
- [115] Obeid R, Awwad HM, Keller M, Geisel J (2016) Trimethylamine-N-oxide and its biological variations in vegetarians. *European Journal of Nutrition* 56:2599-2609
- [116] Obeid R, Awwad HM, Rabagny Y, Graeber S, Herrmann W, Geisel J (2016) Plasma trimethylamine N-oxide concentration is associated with choline, phospholipids, and methyl metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 103:703-711
- [117] Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O et al. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53:685-693
- [118] Overby LH, Carver GC, Philpot RM (1997) Quantitation and kinetic properties of hepatic microsomal and recombinant flavin-containing monooxygenases 3 and 5 from humans. *Chemico-Biological Interactions* 106:29-45
- [119] Patterson KY, Bhagwat SA, Williams JR, Howe JC, Holden JM in Kollaboration mit Zeisel SH, Dacosta KA, Mar MH (2008) USDA database for the choline content of common foods. Release two. Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, ARS, USDA
- [120] Pekala J, Patkowska-Sokoła B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P et al. (2011) L-carnitine - metabolic functions and meaning in humans life. *Current Drug Metabolism* 12:667-678

- [121] Penry JT, Manore MM (2008) Choline: An important micronutrient for maximal endurance-exercise performance? *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 18:191-203
- [122] Phillips IR, Dolphin CT, Clair P, Hadley MR, Hutt AJ et al. (1995) The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man. *Chemico-Biological Interactions* 96:17-32
- [123] Phillips IR, Francois AA, Shephard EA (2007) The Flavin-Containing Monooxygenases (FMOs): Genetic variation and its consequences for the metabolism of therapeutic drugs. *Current Pharmacogenomics* 5:292-313
- [124] Pinotti L, Baldi A, Dell'Orto V (2002) Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. *Nutrition Research Reviews* 15:315-331
- [125] Poloni S, Blom HJ, Schwartz IV (2015) Stearoyl-CoA desaturase-1: Is it the link between sulfur amino acids and lipid metabolism? *Biology* 4:383-396
- [126] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65
- [127] Randrianarisoa E, Lehn-Stefan A, Wang X, Hoene M, Peter A et al. (2016) Relationship of serum trimethylamine N-oxide (TMAO) levels with early atherosclerosis in humans. *Scientific Reports* 6:26745
- [128] Rasmussen LG, Winning H, Savorani F, Toft H, Larsen TM et al. (2012) Assessment of the effect of high or low protein diet on the human urine metabolome as measured by NMR. *Nutrients* 4:112-131
- [129] Rebouche CJ, Chenard CA (1991) Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites. *The Journal of Nutrition* 121:539-546
- [130] Rebouche CJ (2004) Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Annals New York Academy of Sciences* 1033:30-41
- [131] Resseguie M, Song J, Niculescu MD, da Costa KA, Randall TA, Zeisel SH (2007) Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *FASEB Journal* 21:2622-2632

- [132] Robert Koch-Institut (ed) (2014) Fettstoffwechselstörungen. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012«. RKI, Berlin www.rki.de/geda [Stand: 25.10.2014]
- [133] Rohrmann S, Linseisen J, Allenspach M, von Eckardstein A, Müller D (2016) Plasma concentrations of trimethylamine-N-oxide are directly associated with dairy food consumption and low-grade inflammation in a German adult population. *The Journal of Nutrition* 146:283-289
- [134] Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D, Rey FE (2015) Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *mBio* 6:e02481-14
- [135] Rossner R, Kaeberlein M, Leiser SF (2017) Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 292:11138-11146
- [136] Sanders LM, Zeisel SH (2007) Choline: Dietary requirements and role in brain development. *Nutrition Today* 42:181-186
- [137] Savendahl L, Mar MH, Underwood LE, Zeisel SH (1997) Prolonged fasting in humans results in diminished plasma choline concentrations but does not cause liver dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66:622-625
- [138] Schugar RC, Shih DM, Warriar M, Helsley RN, Burrows A et al. (2017) The TMAO-producing enzyme flavin-containing monooxygenase 3 regulates obesity and the beiging of white adipose tissue. *Cell Reports* 19:2451-2461
- [139] Serkova N, Fuller TF, Klawitter J, Freise CE, Niemann CU (2005) ¹H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney International* 67:1142-1151
- [140] Shan Z, Sun T, Huang H, Chen S, Chen L et al. (2017) Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106:888-894
- [141] Shih DM, Wang Z, Lee R, Meng Y, Che N et al. (2015) Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* 56:22-37
- [142] Shimizu M, Cashman JR, Yamazaki H (2007) Transient trimethylaminuria related to menstruation. *BMC Medical Genetics* 8:2

- [143] Shimizu M, Shiraishi A, Sato A, Nagashima S, Yamazaki H (2015) Potential for drug interactions mediated by polymorphic flavin-containing monooxygenase 3 in human livers. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 30:70-74
- [144] Simala-Grant JL, Weiner JH (1996) Kinetic analysis and substrate specificity of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase. *Microbiology* 142:3231-3239
- [145] Singh R, Haque I, Ahmad F (2005) Counteracting osmolyte trimethylamine N-oxide destabilizes proteins at pH below its pK_a . Measurements of thermodynamic parameters of proteins in the presence and absence of trimethylamine N-oxide. *The Journal of Biological Chemistry* 280:11035-11042
- [146] Slow S, Lever M, Chambers ST, George PM (2009) Plasma dependent and independent accumulation of betaine in male and female rat tissues. *Physiological Research* 58:403-410
- [147] Slow S, Garrow TA (2006) Liver choline dehydrogenase and kidney betaine-homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats. *The Journal of Nutrition* 136:2279-2283
- [148] Smallwood T, Allayee H, Bennett BJ (2016) Choline metabolites: Gene by diet interactions. *Current Opinion in Lipidology* 27:33-39
- [149] Smith JL, Wishnok JS, Deen WM (1994) Metabolism and excretion of methylamines in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 125:296-308
- [150] Stead LM, Brosnan JT, Brosnan ME, Vance DE, Jacobs RL (2006) Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *The American Journal of Clinical Nutrition* 83:5-10
- [151] Steiber A, Kerner J, Hoppel CL (2004) Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular Aspects of Medicine* 25:455-473
- [152] Strambini GB, Gonnelli M (2008) Singular efficacy of trimethylamine N-oxide to counter protein destabilization in ice. *Biochemistry* 47:3322-3331
- [153] Subramaniam S, Fletcher C (2017) Trimethylamine N-oxide: breathe new life. *British Journal of Pharmacology* 175:1344-1353
- [154] Sun X, Jiao X, Ma Y, Liu Y, Zhang L et al. (2016) Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 481:63-70

- [155] Sutinen E, Nurmi M, Roivainen A, Varpula M, Tolvanen T et al. (2004) Kinetics of [¹¹C]choline uptake in prostate cancer: a PET study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 31:317-324
- [156] Suzuki S, Kubo A, Shinano H, Takama K (1992) Inhibition of the electron transport system in *Staphylococcus aureus* by trimethylamine-N-oxide. *Microbios* 71:145-148
- [157] Swartz ME (2005) Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An introduction. Aus: Ultra Performance LC TM. Separation Science Redefined. Waters Corporation 8-14
- [158] Taesuwan S, Cho CE, Malysheva OV, Bender E, King JH et al. (2017) The metabolic fate of isotopically labeled trimethylamine-N-oxide (TMAO) in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry* 45:77-82
- [159] Tamayo T, Brinks R, Hoyer A, Kuß O, Rathmann W (2016) The prevalence and incidence of diabetes in Germany: An analysis of statutory health insurance data on 65 million individuals from the years 2009 and 2010. *Deutsches Ärzteblatt International* 113:177-182
- [160] Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB et al. (2013) Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine* 368:1575-1584
- [161] Tang WH, Stanley LH (2014) The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation* 124:4204-4211
- [162] Tang WH, Hazen SL (2015) Probiotic therapy to attenuate weight gain and trimethylamine N-oxide (TMAO) generation: A cautionary tale. *Obesity (Silver Spring)* 23:2321-2322
- [163] Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA et al. (2015) Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circulation research* 116:448-455
- [164] Tang WH, Wang Z, Shrestha K, Borowski AG, Wu Y et al. (2015) Intestinal microbiota-dependent phosphatidylcholine metabolites, diastolic dysfunction and adverse clinical outcomes in chronic systolic heart failure. *Journal of Cardiac Failure* 21:91-96

- [165] Tang WH, Wang Z, Li XS, Fan Y, Li DS et al. (2017) Increased trimethylamine N-oxide (TMAO) portends high mortality risk independent of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Chemistry* 63:297-306
- [166] Teft WA, Morse BL, Leake BF, Wilson A, Mansell SE et al. (2017) Identification and characterization of trimethylamine-N-oxide uptake and efflux transporters. *Molecular Pharmaceutics* 14:310-318
- [167] Tijet N, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB, Tuomisto J, Pohjanvirta R (2006) Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Molecular Pharmacology* 69:140-153
- [168] Tremaroli V, Bäckhed F (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489:242-249
- [169] Trøseid M, Ueland T, Hov JR, Svardal A, Gregersen I et al. (2015) Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *Journal of Internal Medicine* 277:717-726
- [170] Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe* 3:213-223
- [171] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480-484
- [172] Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R (2015) TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition* 31:1317-1323
- [173] Ussar S, Fujisaka S, Kahn CR (2016) Interactions between host genetics and gut microbiome in diabetes and metabolic syndrome. *Molecular Metabolism* 5:795-803
- [174] Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS (2016) Trimethylamine N-oxide: The good, the bad and the unknown. *Toxins* 8:326
- [175] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS et al. (2011) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472:57-63
- [176] Wang Z, Levison BS, Hazen JE, Donahue L, Li XM, Hazen SL (2014) Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 455:35-40

- [177] Wang Z, Tang WH, Buffa JA, Fu X, Britt EB et al. (2014) Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *European Heart Journal* 35:904-910
- [178] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W et al. (2015) Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell* 163:1585-1595
- [179] Warriar M, Shih DM, Burrows AC, Ferguson D, Gromovsky AD et al. (2015) The TMAO-generating enzyme flavin monooxygenase 3 is a central regulator of cholesterol balance. *Cell Reports* 10:326-338
- [180] Waters (ed) (2016) Improve productivity with modern UHPLC column technology. Aus: UHPLC Column Capabilities Brochure. Bibliotheks-Nummer: LITR134851280
- [181] Waters (ed) (2005) Waters Micromass Quattro Premier XE Mass Spectrometer. Operator's Guide. Milford, MA, USA.
- [182] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6578-6583
- [183] Wilson A, Teft WA, Morse BL, Choi YH, Woolsey S et al. (2015) Trimethylamine-N-oxide: A novel biomarker for the identification of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 60:3620-3630
- [184] Winter SE, Lopez CA, Bäumlér AJ (2013) The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Reports* 14:319-327
- [185] Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC et al. (2013) HMDB 3.0 - The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research (Trimethylamine N-oxide)*:D603-610
- [186] Xu R, Wang Q, Li L (2015) A genome-wide systems analysis reveals strong link between colorectal cancer and trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut microbial metabolite of dietary meat and fat. *BMC Genomics* 16:S4
- [187] Yamazaki H, Fujieda M, Togashi M, Saito T, Preti G et al. (2004) Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. *Life Sciences* 74:2739-2747

- [188] Yancey PH, Somero GN (1979) Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochemical Journal* 183:317-323
- [189] Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222
- [190] Yancey PH, Fyfe-Johnson AL, Kelly RH, Walker VP, Auñón MT (2001) Trimethylamine oxide counteracts effects of hydrostatic pressure on proteins of deep-sea teleosts. *The Journal of Experimental Zoology* 289:172-176
- [191] Yancey PH (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology* 208:2819-2830
- [192] Yancey PH, Gerrerger ME, Drazen JC, Rowden AA, Jamieson A (2014) Marine fish may be biochemically constrained from inhabiting the deepest ocean depths. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:4461-4465
- [193] Yao Z, Vance DE (1988) The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 263:2998-3004
- [194] Yao Z, Vance DE (1989) Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 264:11373-11380
- [195] Youxing Q, Bolen DW (2003) Hydrogen exchange kinetics of RNase A and the urea: TMAO paradigm. *Biochemistry* 42:5837-5849
- [196] Yue C, Yang X, Li J, Chen X, Zhao X et al. (2017) Trimethylamine N-oxide prime NLRP3 inflammasome via inhibiting ATG16L1-induced autophagy in colonic epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 490:541-551
- [197] Zeisel SH, Growdon JH, Wurtman RJ, Magil SG, Logue M (1980) Normal plasma choline responses to ingested lecithin. *Neurology* 30:1226-1229
- [198] Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK (1983) Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 225:320-324
- [199] Zeisel SH, da Costa KA, Franklin PD, Alexander EA, Lamont JT et al. (1991) Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB Journal* 5:2093-2098

- [200] Zeisel SH, Blusztajn JK (1994) Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 14:269-296
- [201] Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, Holden JM (2003) Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *The Journal of Nutrition* 133:1302-1307
- [202] Zeisel SH, da Costa KA (2009) Choline: An essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews* 67:615-623
- [203] Zeisel SH, Warriar M (2017) Trimethylamine N-oxide, the microbiome, and heart and kidney disease. *Annual Review of Nutrition* 37:157-181
- [204] Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL (1996) Exacerbation of symptoms of fish-odour syndrome during menstruation. *The Lancet* 348:1740-1741
- [205] Zhang AQ, Mitchell SC, Ayesh R, Smith RL (1993) Dimethylamine formation in man. *Biochemical Pharmacology* 45:2185-2188
- [206] Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G et al. (2015) Dietary modulation of gut microbiota contributes to alleviation of both genetic and simple obesity in children. *EBioMedicine* 2:968-984
- [207] Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, Schäfer H, Rajakumar K et al. (2014) Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:4268-4273
- [208] Zhu W, Wang Z, Tang WH, Hazen SL (2017) Gut microbe-generated trimethylamine N-oxide from dietary choline is prothrombotic in subjects. *Circulation* 135:1671-1673
- [209] Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K et al. (2012) A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition* 66:53-60

E Fragebogen

Fragebogen für den OGTT & OFTT Test [Zucker & Fett Belastung Test] Pilotstudie 05.2016

PERSÖNLICHE DATEN - Datum:; Fortlaufende-Nr.	
Name, Vorname:	Fortlaufende-Nr.
Geburtstag:	
Adresse:	Datum:
Gewicht, kg:	Größe, cm:
ERKRANKUNG	Sonstige (bitte auflisten)
<input type="checkbox"/> Hypertonie <input type="checkbox"/> Diabetes Typ 2 (ausgeschlossen) <input type="checkbox"/> Koronare Herzkrankheit (KHK) <input type="checkbox"/> Hyperlipidämie (mit Statine sind ausgeschlossen) <input type="checkbox"/> Chronische Gastritis (ausgeschlossen) <input type="checkbox"/> Magengeschwür (ausgeschlossen) <input type="checkbox"/> Morbus Crohn (ausgeschlossen) <input type="checkbox"/> Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) <input type="checkbox"/> Schilddrüsenüberfunktion <input type="checkbox"/> Anämie	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Ausgeschlossen (alles was die Aufnahme im Darm beeinflussen könnte)
MEDIKAMENTE (was, wie viel, wie oft ?)	Sonstige (bitte auflisten)
<input type="checkbox"/> Vitamine und Mineralstoff (z.B. Vit B12, Vit D, Ca) was, Dose, wie oft: <input type="checkbox"/> Frisch Oil, Omega 3, Omega 6, Q10, etc Dose, wie oft: <input type="checkbox"/> Pille Dose: <input type="checkbox"/> Protonenpumpenhemmer (z.B. Pantoprazol) Dose: <input type="checkbox"/> H2-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Ranitidin) Dose:	<input type="checkbox"/> ACE-Hemmer/ AT1-Antagonist (z.B. Ramipril, Candesartan) Dose: <input type="checkbox"/> Dose: <input type="checkbox"/> Dose: sonstige: Alternative Therapien, Vitamine, Nahrungergänzung mittel, ...
SONSTIGE BEMERKUNG	
<input type="checkbox"/> eine besondere Diät (Vegan, Kohlenhydratarm, Fettarm)? <input type="checkbox"/> Rauchen? Zigaretten pro Tag..... <input type="checkbox"/> Alkohol ? Menge pro Woche.....	
ANAMNESE (wird von Ärzten ausgefüllt)	
Bauch Umfang bitte messen, cm	
Hüften Umfang bitte messen, cm	
Uhrzeit Probe 1	
Uhrzeit Probe 2.....	
Wann war in etwa die letzte Mahlzeit (Uhrzeit):	

A Chemikalien und Standards

Chemikalie	Reinheit	Firma	CAS Nr.	Katalognr.
Cholin assoziierte Metabolite: Standards und Internal Standards				
Betaine anhydrous	ultra; $\geq 99.0\%$	Sigma Aldrich, Munich, Germany	107-43-7	61962
Choline chloride	$\geq 99\%$	Sigma Aldrich, Munich, Germany	67-48-1	C7017
N,N,-Dimethylglycine (=DMG)	99%	Sigma Aldrich, Munich, Germany	1118-68-9	D1156
N,N,N-Trimethyl-d ₉ -glycine hydrochloride (= d ₉ -betaine)	98 atom % D	Isotec, Sigma Aldrich, Munich, Germany	285979-85-3	616656
Choline chloride-trimethyl-d ₉ (=d ₉ -choline)	98 atom % D	Isotec, Sigma Aldrich, Munich, Germany	61037-86-3	492051
N,N-Dimethyl-d ₆ -glycine HCl (= d ₆ -DMG)	99 atom % D	CDN Isotopes, Quebec, Canada	347840-03-3	D-3509
SAH und SAM: Standards und Internal Standards				
S-(5'-Adenosyl)-L-homocysteine, crystalline (= SAH)	$\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma Aldrich, Munich, Germany	979-92-0	A9384
S-(5'-Adenosyl)-L-methionine p-toluenesul-fonate salt, from yeast (L-methionine enriched) (= SAM)	$\geq 80\%$ (HPLC)	Sigma Aldrich, Munich, Germany	17176-17-9	A2408
S-Adenosyl-L-methionine-d ₃ (S-methyl-d ₃) tetra(p-toluene-sulfonate) salt (= [2H ₃]-SAM)	85 % chem. Reinheit 99 atom % D	CDN Isotopes, Quebec, Canada	17176-17-9 (unlabeled compound)	D-4093

Chemikalie	Reinheit	Firma	CAS Nr.	Katalognr.
TMAO assoziierte Metabolite: Standards und Internal Standards				
D9-Trimethylamin-N-oxid (D9-TMAO)	98 %	Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA	1161070-49-0	DLM-4779-1
Trimethylamin (TMA)	≥ 99 % (anhydrous)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	75-50-3	243205
Trimethylamin-N-oxid (TMAO)	98 %	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	1184-78-7	317594
Taurin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	107-35-7	T0625
Trimethyl-d ₉ -amine HCl (=d ₉ -TMA)	99 atom % D	EQ Laboratories GmbH, Augsburg, Germany	593-81-7	D-764
2-Aminoethane-d ₄ -sulfonic Acid (=d ₄ -Taurin)	99 atom % D	EQ Laboratories GmbH, Augsburg, Germany	107-35-7	D-1971
weitere Chemikalien				
Acetonitrile (ACN)	ULC/MS grade	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	75-05-8	01204102
Ameisensäure	ULC/MS grade; 99 %	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	64-18-6	06914131
Ammoniumformiat	ULC/MS grade	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	540-69-2	01984156
Essigsäure	glacial; 99,99+%	Sigma Aldrich, München, Deutschland	64-19-7	506007
Methanol, absolut	ULC/MS grade	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	67-56-1	13684102

B Materialien und Ausstattung

Ausstattung	Beschreibung	Firma
Blut-/Urin- probenmaterial	Kanülen: Safety-Multifly 21G & 23G tube, 200 mm Blutentnahme-/Urinröhrchen: S-Monovette® - EDTA: 2,7ml K3E, 66 x 11 mm - EDTA: 9ml K3E, 92 x 16 mm - Lithium-Heparin: 4,7ml LH-Gel, 75 x 15 mm - Serum: 4,7ml Z-Gel, 75 x 15 mm - Urin: 10ml, 102 x 15 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kühlung	Ziegra Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Pipetten	HERAfreeze TM HFU B Serie, -86°C Biohit mLINÉ®, 1 Kanal: - m1000 (100 - 1000µl) - m200 (20 - 200µl) - m20 (2 - 20µl) - m10 (0,5 - 10µl) Multipipette® plus	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Serologische Pipetten: 25ml, 10ml 1000µl, 200µl, 20µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Combitips plus: 10ml PCR clean Microtube 1,5ml 50 ml Tube, 114 x 28 mm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Vortexmischer	IKA MS2 Minishaker	IKA - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitung Zentrifugen	Milli-Q Academic Sigma 3K12, Sigma 1-14 Micro 200	Millipore, Molsheim, Frankreich Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Hettich), Tuttlingen, Deutschland

Ausstattung	Beschreibung	Firma
UPLC-Materialien		
Gase	ALPHAGAZ 1 Argon	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
In-line filter	Cmc instruments NGM nitrogen-membrane-generator (LCMS)	Cmc instruments GmbH, Eschborn, Deutschland
Massenspektrometer	0,2 µm in-line filter	Waters Corporation, Milford, USA
Reaktionsgefäße	MicroMass Quattro Premier XE (coupled to UPLC system)	Waters Corporation, Milford, USA
	1,5ml Amber Micro-V Snap Vial, 100pk (12 x 32 mm)	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
	2 mL Clear Glass Screw Neck Max Recovery Vial, 100/pkg (12 x 32mm)	Waters Corporation, Milford, USA
Säulen	Acquity UPLC BEH HILIC column (100 mm x 2,1 mm (i.d.); 1,7 µm particle size)	Waters Corporation, Milford, USA
	Acquity UPLC BEH C ₁₈ column (50 mm x 2,1 mm (i.d.); 1,7 µm Partikelgröße)	
SPE-Säule	Varian Bond Elut PBA columns	Varian Inc., Palo Alto, USA
System	Waters Acquity UPLC	Waters Corporation, Milford, USA
Vorsäulen	Acquity BEH HILIC VanGuard pre-column (5 mm x 2,1 mm (i.d.); 1,7 µm particle size)	Waters Corporation, Milford, USA
	Acquity BEH C ₁₈ Van Guard pre-column (5 mm x 2,1 mm (i.d.); 1,7 µm Partikelgröße)	
Zubehör	12 x 32mm Snap Neck Cap and preslit PTFE/silicone Septum, 100/pkg	Waters Corporation, Milford, USA
	11 mm Snap/Crimp Caps with silicone/PTFE Septum, ms-Pure non-pigmented Silicone/PTFE Septum	Infochroma ag, Zug, Schweiz
	DURAN GL 45 Glasflaschen, 200ml, 500ml, 1000ml	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland

C Software

Software	Beschreibung	Firma
GLIMS-Labordatensystem		Götttert Software, Seeheim-Jugenheim, Hessen, Deutschland
LibreOffice Impress	Version 5.1.1.6.2	The Document Foundation, Debian und Ubuntu
MassLynx TM	Version 4.1	Waters Corporation, Milford, USA
MedCFR		MeckEvidence Med. Forschung, Schwarz, Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland
Microsoft Excel	Version 15.0	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
QuanLynx TM	Version 4.1	Waters Corporation, Milford, USA
SPSS	Version 23, 24 für Windows	International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, New York, USA
Texmaker	Version 4.4.1 für Linux	Pascal Brachet, GNU General Public License Version 2, veröffentlicht durch Free Software Foundation

D Referenzbereiche der Routinelaborparameter

Parameter	Probenmaterial	Bestimmungsmethode	Referenzbereich
AP	Lithium-Heparin Plasma	IFCC liquid 37°, UV-/VIS-Photometrie	Männer: 40-129 U/l Frauen: 35-104 U/l
Bilirubin (gesamt)	Lithium-Heparin Plasma	(DPD) Liquid: UV-/VIS-Photometrie	< 1,2 mg/dl
Cholesterin (gesamt)	Lithium-Heparin Plasma	CHOD-PAP, UV-/VIS-Photometrie	< 200 mg/dl
CRP	Lithium-Heparin Plasma	Immunologische Turbidimetrie	0-5 mg/l
Erythrozyten	EDTA-Plasma	Sysmex-Automat, Zählung elektrischer Impulse	Männer: 4,5-5,9·10 ¹² /l Frauen: 4-5,2·10 ¹² /l
γ-GT	Lithium-Heparin Plasma	IFCC liquid 37°, UV-/VIS-Photometrie	Männer: < 60 U/l Frauen: < 40 U/l
GFR	Lithium-Heparin Plasma	CKD-Epi-Formel	> 60 ml/min
Glukose	Lithium-Heparin Plasma	Hexokinase/G6P-DH, UV-/VIS-Photometrie	60-100 mg/dl
GOT	Lithium-Heparin Plasma	IFCC 37° mit Pyp, UV-/VIS-Photometrie	Männer: 10-50 U/l Frauen: 10-35 U/l
GPT	Lithium-Heparin Plasma	IFCC 37° mit Pyp, UV-/VIS-Photometrie	Männer: 10-50 U/l Frauen: 10-35 U/l
Harnstoff	Lithium-Heparin Plasma	Kinetischer Test mit Urease und Glutamatdehydrogenase (UV-/VIS-Photometrie)	17-48 mg/dl
Harnsäure	Lithium-Heparin Plasma	Enzymatischer Farbtest mit Uricase und Peroxidase (UV-/VIS-Photometrie, UA-Plus)	Männer: 3,4-7 mg/dl Frauen: 2,4-5,7 mg/dl
Hb	EDTA-Plasma	Sysmex-Automat, midif. Cyan-MHB-Methode	Männer: 14-18 g/dl Frauen 12-16 g/dl
HbA _{1c}	EDTA-Plasma	HPLC	< 42 mmol/mol
HDL	Lithium-Heparin Plasma	enzymatischer Farbtest mit PEG-Cholinesterase, PEG-Cholinoxidase und Peroxidase (UV-/VIS-Photometrie)	Männer: > 35 mg/dl Frauen > 45 mg/dl
Hkt	EDTA-Plasma	Sysmex-Automat, Kumulative Pulshöhensumm.	Männer: 41-53 % Frauen: 36-46 %

Parameter	Probenmaterial	Bestimmungsmethode	Referenzbereich
Kreatinin	Lithium-Heparin Plasma	Jaffe o. Enteiw.m.PLW, UV-/VIS-Photometrie	Männer: 0,7-1,2 mg/dl Frauen: 0,5-0,9 mg/dl
LDL	Lithium-Heparin Plasma	UV-/VIS-Photometrie	< 130 mg/dl
MCH	EDTA-Plasma	Symex-Automat, Berechnung aus RBC und Hb	27-33 pg
MCHC	EDTA-Plasma	Symex-Automat, Berechnung aus HB und HKT	31-37 g/dl
MCV	EDTA-Plasma	Symex-Automat, Berechnung aus RBC und HKT	80-99 fl
Thrombocyten	EDTA-Plasma	Symex-Automat, Zählung elektrischer Impulse	140-400 10 ⁹ /l
Triglyceride	Lithium-Heparin Plasma	UV-/VIS-Photometrie, GPO-PAP	< 150 mg/dl
Troponin T	Lithium-Heparin Plasma	Kalibration des quantitativen Elecsys, Immunoassay-System	< 14 pg/ml

F Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Obeid und Herrn Prof. Dr. Geisel, die es mir ermöglicht haben im Bereich der Klinischen Medizin und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor an der Universität des Saarlandes promovieren zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Rima Obeid für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Unterstützung und Hilfestellungen bei der Anfertigung der Arbeit.

Meinen besonderen Dank spreche ich auch Herrn Dr. Hussain Awwad aus, der durch seine Organisation und Anleitung besonders bei der praktischen Laborarbeit einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet hat.

Vielen Dank Herrn Dr. Ulrich Hüber/Zentrallabor für seine Unterstützung in ärztlicher Funktion bei der Probandenselektion und Testdurchführung.

Zudem danke ich allen Probanden der Studie für Ihre aktive Teilnahme, Ihr Interesse an und Engagement für die Wissenschaft.

Bei Frau Christiane Waldura bedanke ich mich für ihre kompetente Einführung in die Labormethodik und freundliche Art ihrer Erklärungen sowie bei allen Mitarbeitern des Zentrallabors für die Hilfe bei jeglichen Fragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Carsten Ohlmann/urologische Abteilung für seine bereitwillige Mitwirkung sowie ihm und seinen Mitarbeitern für die Überlassung von Proben aus ihrer Studie.