

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS VON ORALER GLUKOSEAUFNAHME AUF DIE
MONOZYTÄRE GENEXPRESSION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sylvia Jutta Elisabeth Wurm

2008

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS VON ORALER GLUKOSEAUFNAHME AUF DIE
MONOZYTÄRE GENEXPRESSION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sylvia Jutta Elisabeth Wurm

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: PD Dr. Christa Büchler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Anja K. Bosserhoff
Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2009

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis	vi
1	EINLEITUNG	1
1.1	Insulinrezeptor und -signalweg	1
1.2	Der Orale Glukosetoleranztest (OGTT)	3
1.3	Das Metabolische Syndrom	4
1.3.1	Definition	4
1.3.2	Epidemiologie	4
1.3.3	Metabolisches Syndrom und Hyperglykämie	5
1.4	Die Rolle des Blutmonozyten in der Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms	5
1.4.1	Monozyten und Entzündung bei Adipositas	5
1.4.2	Monozyten und Arteriosklerose	6
1.4.3	Monozyten und Insulinresistenz	7
1.5	NF-κB regulierte Gene	8
1.6	Adipozytokine	9
1.7	Aufgabenstellung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien	14
2.1.4	Antikörper	16
2.1.4.1	Primäre Antikörper	16

2.1.4.2	Sekundäre Antikörper	16
2.1.5	Kit-Systeme	16
2.1.6	Puffer und Lösungen	17
2.1.6.1	Lösungen für Arbeiten mit DNA	17
2.1.6.2	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	18
2.1.6.2.1	Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten	18
2.1.6.2.2	Lösungen für SDS-PAGE	18
2.1.6.2.3	Lösungen für Western-Blotting	19
2.1.6.2.4	Lösungen für Adiponektin-, CCL4-, IL-6-, und Resistin-ELISA	20
2.1.6.2.5	Lösungen für IL-8-ELISA	21
2.1.6.3	Lösungen für die Isolierung primärer humaner Monozyten	21
2.1.7	Glukoselösung	21
2.1.8	Kultivierung humaner Zellen	22
2.1.9	Primer für LightCycler-Analysen	22
2.2	Methoden	25
2.2.1	Auswahl der Spender	25
2.2.2	Durchführung des OGTT	25
2.2.3	Homeostasis Model Assessment Index (HOMA-Index)	25
2.2.4	Isolierung humaner peripherer Monozyten aus Vollblut	26
2.2.5	Herstellen von autologem Serum	28
2.2.6	Kultivierung humaner Zelllinien	28
2.2.7	Arbeiten mit RNA	29
2.2.7.1	Isolierung von RNA aus Zellen	29
2.2.7.1.1	Isolierung von RNA aus THP-1 Zellen	29
2.2.7.1.2	Isolierung von RNA aus Monozyten	29
2.2.7.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	29
2.2.7.3	Reverse Transkription	30
2.2.8	Arbeiten mit DNA	31
2.2.8.1	Real-Time RT-PCR	31
2.2.9	Arbeiten mit Proteinen	33
2.2.9.1	Präparation von Gesamtzellextrakten	33
2.2.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33

2.2.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.9.4	Western-Blotting	35
2.2.9.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	36
2.2.9.6	Coomassie-Färbung	37
2.2.10	Stimulierung von THP-1 Zellen und primären Monozyten	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Anthropometrische Daten und Laborwerte der Probanden	39
3.2	Der Einfluss oraler Glukosebelastung auf humane Monozyten	41
3.2.1	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf NF-κB regulierte Gene im Monozyten	41
3.2.1.1	Das Chemokin IL-8 (CXCL8)	41
3.2.1.1.1	Analyse der Monozyten ex vivo	41
3.2.1.1.2	In vitro Untersuchungen	42
3.2.1.1.3	Der Einfluss von Inhibitoren auf die Insulin vermittelte IL-8 Induktion	42
3.2.1.2	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf das Zytokin IL-6 in Monozyten ex vivo und in vitro	44
3.2.1.3	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf die Superoxide Dismutase 2 (SOD2) in Monozyten ex vivo und in vitro	44
3.2.1.4	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Resistin	45
3.2.1.4.1	Analyse der Monozyten ex vivo	45
3.2.1.4.2	In vitro Untersuchungen	45
3.2.2	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels	47
3.2.2.1	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf das Apolipoprotein E (ApoE) in Monozyten ex vivo und in vitro	47
3.2.2.2	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Flotillin-1 in Monozyten ex vivo und in vitro	47
3.2.2.3	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf die Adiponektin Rezeptoren 1 (AdipoR1) und 2 (AdipoR2) in Monozyten ex vivo und in vitro	49
3.2.3	Der Einfluss oraler Glukosebelastung auf die mRNA Expression weiterer Gene im humanen Monozyten	50

3.3	Die Plasmakonzentrationen von Adipokinen und Zytokinen während eines OGTT	51
3.3.1	Die Plasmakonzentration von Leptin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	51
3.3.2	Die Plasmakonzentration von Adiponektin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	52
3.3.3	Die Plasmakonzentration von CORS-26 vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	53
3.3.4	Die Plasmakonzentration von Resistin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	54
3.3.5	Die Plasmakonzentration von Omentin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	54
3.3.6	Die Plasmakonzentration von ApoE vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	55
3.3.7	Die Plasmakonzentration von IL-8 vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	56
3.3.8	Die Plasmakonzentration von IL-6 vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung	57
4	DISKUSSION	58
4.1	Der Einfluss von oraler Glukosebelastung auf monozytäre NF-κB regulierte Gene	58
4.1.1	Das Zytokin IL-6 wird durch orale Glukosebelastung im Plasma reduziert, während die Sekretion in Monozyten nicht verändert wird	58
4.1.2	Orale Glukoseaufnahme induziert die SOD2 mRNA, während das intrazelluläre Protein nicht reguliert wird	59
4.1.3	Das Chemokin IL-8	59
4.1.3.1	Insulin stimuliert das Chemokin IL-8 (CXCL8) in humanen Monozyten über den MAP-Kinase-Signalweg	59
4.1.3.2	Die orale Glukoseaufnahme reduziert die IL-8 Plasmakonzentration in insulinsensitiven Probanden	60

4.1.4	Orale Glukoseaufnahme stimuliert intrazelluläres Resistin in humanen Monozyten, während die Plasmakonzentration unverändert bleibt	61
4.2	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels	63
4.2.1	Das Adipozytokin Adiponektin und seine Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2	63
4.2.1.1	Orale Glukosebelastung induziert die AdipoR1 Genexpression im Monozyten, während die AdipoR2 mRNA unverändert bleibt	63
4.2.1.2	Die Adiponektinkonzentration im Plasma wird durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst	64
4.2.2	Orale Glukoseaufnahme supprimiert die Flotillin-1 Genexpression und beeinflusst die Flotillin-1 Proteinmenge in humanen Monozyten	64
4.2.3	Orale Glukosebelastung induziert die ApoE mRNA im Monozyten und verringert die ApoE Plasmakonzentration	65
4.2.4	Orale Glukosebelastung induziert die Genexpression von ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)	66
4.3	Der Einfluss von Glukose und Insulin auf die Plasmakonzentrationen weiterer Adipozytokine	67
4.3.1	Die Leptinkonzentration im Plasma sinkt 2 h nach oraler Glukosebelastung	67
4.3.2	Die CORS-26 Plasmakonzentration wird durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst	68
4.3.3	Die Omentinkonzentration im Plasma wird durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst	68

5	ZUSAMMENFASSUNG	70
6	PUBLIKATIONEN	72
6.1	Erstautorenschaften	72
6.2	Koautorenschaften	72
7	LITERATURVERZEICHNIS	74

Abkürzungsverzeichnis

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
AdipoR1	Adiponektinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
Ak	Antikörper
AMV-RT	Avian Myoblastosis Virus Reverse Transkriptase
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
ATP III	Adult Treatment Panel III
BCA	Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid)
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
CCL2	CC chemokine ligand 2
CCL4	CC chemokine ligand 4
CCL5	CC chemokine ligand 5
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CORS-26	Collagenous repeat-containing sequence of 26 kDa protein
Cp	Crossing Point
CXCL8	CXC chemokine ligand 8 (= IL-8)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid (N = A,T,G,C)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E _x	Extinktion bei Wellenlänge x
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
GLUT4	Glukosetransporter 4 (Glucose transporter 4)
HDL	High-density Lipoprotein
HMW	High molecular weight
HOMA	Homeostasis Model Assessment Index
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)

IκB	Inhibitor of NF-κB
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFG	Impaired fasting glucose
IGF	Insulin-like growth factor
IGT	Impaired glucose tolerance
IKK	Inhibitor of NF-κB Kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRR	Insulin receptor related
IRS	Insulin receptor substrate
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein
LMW	Low molecular weight
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Monocyte chemoattractant protein 1
MEK-1	Mitogene-activated protein kinase kinase 1
mRNA	messenger RNA
mTOR	Molecular target of rapamycin
NCEP	National Cholesterol Education Program
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
p.o.	Per os
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PBST	PBS mit Tween®20
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3	Phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphat Kinase
PPRA-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTEN	Phosphatase and tensin homologue gene
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
S6K1	p70 S6 Kinase 1
SDHC	Succinate Dehydrogenase Complex Subunit C
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHIP2	SH2-domain containing inositol 5-phosphatase 2
SOD2	Superoxide Dismutase 2
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
Tris-NH ₃	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
uni	universe
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
Vv.	Venae
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Insulinrezeptor und -signalweg

Der Lipid- und Glukosestoffwechsel wird maßgeblich durch Insulin reguliert: Insulin fördert die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen und steigert dort zugleich die Lipogenese. In der Leber bewirkt das Hormon eine gesteigerte Glykogensynthese, während Glykogenolyse und Glukoneogenese gehemmt werden. All diese Mechanismen gehen primär vom Insulinrezeptor aus [1].

Der Insulinrezeptor gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren und beinhaltet den Insulin-like growth factor (IGF) Rezeptor und den Insulin receptor related (IRR) Rezeptor mit jeweils einer α - und einer β -Untereinheit. Wenn Insulin an die α -Untereinheit bindet, findet eine Autophosphorylierung der β -Untereinheit statt, wodurch wiederum intrazelluläre Substrate phosphoryliert und aktiviert werden (Insulin receptor substrate (IRS) 1-9). Dies bedingt die Aktivierung zweier Kaskaden: dem Phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphat (PI3) Kinase- und dem Mitogene-activated protein (MAP) Kinase-Signalweg (Abbildung 1).

Vor allem der PI3-Kinase-Weg ist im Lipid- und Glukosestoffwechsel von zentraler Bedeutung: Er reguliert sowohl die Glukoseaufnahme in die Zelle durch Translokation des Glucose transporter 4 (GLUT4) in die Plasmamembran als auch die Glykogen- und Lipidsynthese.

Verschiedene Inhibitoren können an dieser Signalkaskade angreifen (Abbildung 1): Zu den körpereigenen Inhibitoren zählen Phosphatase and tensin homologue gene (PTEN) [2] und SH2-domain containing inositol 5-phosphatase 2 (SHIP2), welche durch die Dephosphorylierung des Phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphates die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in die Zelle vermindern.

Neben diesen natürlichen Inhibitoren gibt es auch pharmakologisch hergestellte Substanzen, die die Insulinsignaltransduktion hemmen bzw. fördern können: Wortmannin und LY29400 inhibieren wie PTEN und SHIP2 die PI3K. Während Wortmannin die PI3K irreversibel hemmt, greift LY29400 an einer ATP-Bindungsstelle des Enzyms an, was zu einer reversiblen Hemmung führt.

Auch PD98059 zählt zu den artifiziellen Inhibitoren der Insulinsignaltransduktion. Er bindet an die Mitogene-activated protein kinase kinase 1 (MEK-1), was wiederum die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinase verhindert (Abbildung 1). Auch

Manumycin, ein Ras-Farnesyltransferase-Inhibitor, hemmt den MAP-Kinase-Signalweg (Abbildung 1) [3].

Rapamycin inhibiert Molecular target of rapamycin (mTOR), wodurch die Phosphorylierung der p70 S6 Kinase 1 (S6K1) und somit die Hemmung von IRS ausbleibt. Es folgt eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Außerdem weist Rapamycin durch die mTOR-Inhibition immunsuppressive und antikanzerogene Eigenschaften auf, die man sich sowohl in der Onkologie als auch in der Transplantationsmedizin zunutze macht [4].

Ein zweiter, von IRS unabhängiger Signalweg über den GLUT4 in die Plasmamembran transloziert wird, läuft über Cbl/CAP und sog. "Lipid Rafts": Durch die Aktivierung des Insulinrezeptors wird das Protoonkogen Cbl phosphoryliert, das mit dem Adaptorprotein CAP assoziiert ist. Daraufhin wird der Cbl/CAP-Komplex in Lipid Raft Domänen der Plasmamembran transloziert. Diese Translokation wird durch das Protein Flotillin-1 reguliert [5] und bewirkt letztendlich die Translokation von GLUT 4 in die Plasmamembran.

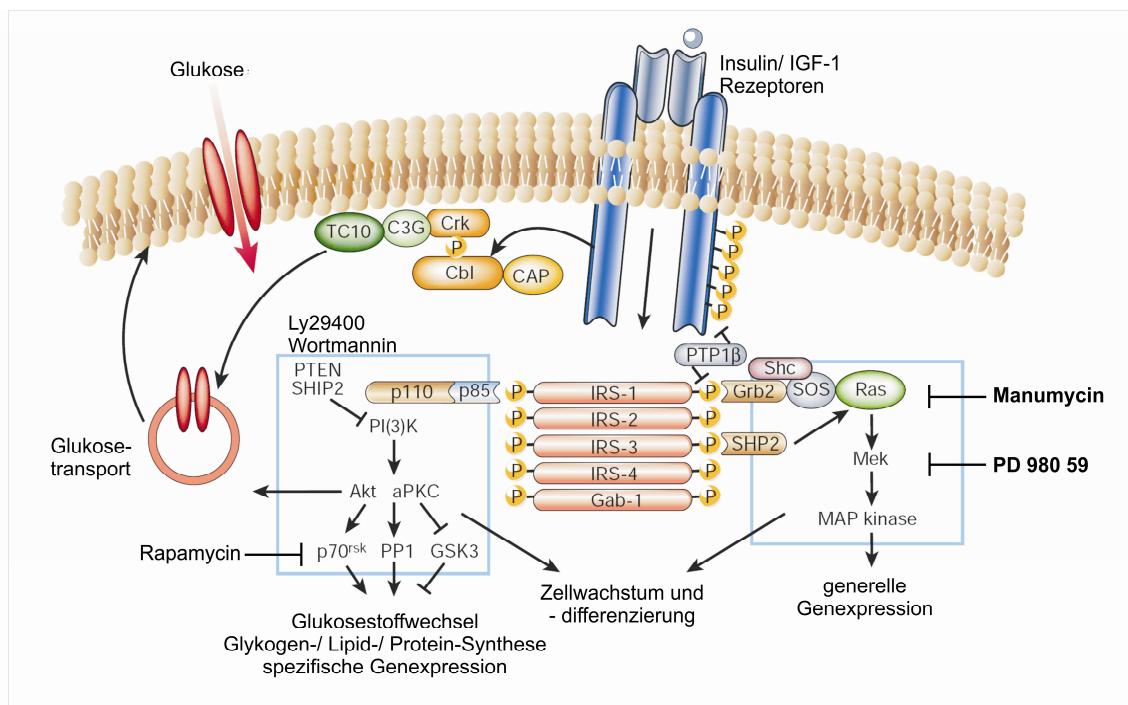


Abbildung 1: Die Insulinsignaltransduktion modifiziert nach Saltiel und Kahn [1]: Über die Phosphorylierung von Insulin receptor substrate (IRS) kommt es zur Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs und zu einer Induktion des Glukose- und Lipidstoffwechsels bzw. zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs und einer gesteigerten generellen Genexpression.

1.2 Der Orale Glukosetoleranztest (OGTT)

Die Effizienz der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Insulin induzierten Glukoseaufnahme in die Zelle kann durch einen OGTT sehr einfach bestimmt werden.

Während eines OGTT kommt es durch die Gabe von 75 g Glukose zunächst zu einem kurzen Anstieg des Blutzuckerspiegels. Beim gesunden Probanden steigt unmittelbar darauf die Insulinsekretion an, woraufhin der Blutzuckerspiegel durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme in die Zelle wieder abfällt. Liegt bei einem Patienten eine verminderte Insulinsekretion bzw. eine erhöhte Insulinresistenz im peripheren Gewebe vor, so kann nach 2 h ein erhöhter Blutzuckerspiegel gemessen werden. In Tabelle 1 sind die Blutzuckerwerte für normale und pathologische OGTTs zusammengestellt.

Befund	nüchtern	nach 2 h
Normalbefund	< 110 mg/dl	< 140 mg/dl
Gestörte Glukosetoleranz	110 – 125 mg/dl	140-199 mg/dl
Diabetes mellitus Typ II	≥126 mg/dl	≥200 mg/dl

Tabelle 1: Blutzuckergrenzwerte beim OGTT (WHO 1999)

Der Diagnostik eines gestörten Glukosestoffwechsels und eines Diabetes mellitus Typ II stehen verschiedene Parameter zur Verfügung, die sich jedoch in ihrer Sensitivität und Spezifität deutlich unterscheiden und jeweils in unterschiedlichen Krankheitsstadien zum Einsatz kommen.

Im Rahmen des Diabetes-Screenings wird vorerst der Nüchternblutglukosewert bestimmt. Liegt dieser unter 100 mg/dl, kann ein pathologischer Glukosestoffwechsel weitgehend ausgeschlossen werden. Bei einem Nüchternwert über 100 mg/dl ist ein OGTT indiziert, um eine abnorme Glukosetoleranz oder einen manifesten Diabetes mellitus Typ II diagnostizieren zu können. Auch bei adipösen Patienten, positiver Familienanamnese, Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Glukosurie sollte trotz normaler Nüchternblutglukosewerte ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt werden.

Es kann auch bei Patienten mit einem Nüchternblutzuckerspiegel im Normbereich eine Glukosestoffwechselstörung vorliegen: 14 % aller Patienten mit normalen

Nüchternglukosewerten weisen im OGTT eine gestörte Glukosetoleranz bzw. einen Diabetes mellitus Typ II auf [6]. Der postprandiale Glukosewert ist demnach sensitiver als der Nüchternglukosewert [7], was auch den häufigen Einsatz eines OGTT in Studien erklärt, wo dieser z.B. zur Einteilung des Probandenkollektivs in gesunde und glukoseintolerante Versuchsteilnehmer benutzt wird.

1.3 Das Metabolische Syndrom

1.3.1 Definition

Unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ bzw. „Syndrom X“ werden verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren zusammengefasst [8]. Schon 1923 definierte Kylin Hypertonie, Hyperglykämie, Hyperurikämie und Adipositas als Syndrom [9]. Schließlich wurde 1960 die Definition des Metabolischen Syndroms um die Dyslipidämie erweitert [10].

Zurzeit existieren mindestens vier unterschiedliche Definitionen des Metabolischen Syndroms, die sich zum einen durch die Grenzwerte verschiedener Parameter, zum anderen durch zusätzliche Kriterien wie Mikroalbuminurie unterscheiden: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) 1999 [11], World Health Organization (WHO) 1999 [12], National Cholesterol Education Program (NCEP)/Adult Treatment Panel III (ATP III) 2001 [13] und American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) [14]. Gemeinsame Hauptinhalte aller Definitionen sind die schon genannten Kriterien Hypertonie, Dyslipidämie, Adipositas und Störungen des Glukosestoffwechsels (verminderte Glukosetoleranz, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ II).

1.3.2 Epidemiologie

Über die Prävalenz des Metabolischen Syndroms lassen sich keine genauen Angaben machen. Ursachen hierfür sind zum einen die unterschiedlichen Definitionen: z.B. liegt die Prävalenz des Metabolischen Syndroms bei Männern laut WHO um ca. 50 % höher als laut EGIR [15]. Zum anderen gibt es Unterschiede hinsichtlich des Alters, des Geschlechts und der Rasse.

Mit zunehmendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit, an einem Metabolischen Syndrom zu leiden. Jedoch beobachtet man in den letzten Jahren eine steigende Anzahl dieser Patienten auch in der jüngeren Bevölkerung [16, 17], was auf die

veränderte Lebenssituation (schlechte Ernährung, wenig Bewegung) einhergehend mit Übergewicht zurückzuführen ist.

Die Prävalenzunterschiede zwischen verschiedenen Rassen und ethnischen Gruppen ist enorm und wird in vielen Studien belegt [18].

In der deutschen Bevölkerung sind gemäß einer Studie, die anhand der ATP III – Kriterien das Vorhandensein eines Metabolischen Syndroms definiert, über 20 % betroffen [19].

1.3.3 Metabolisches Syndrom und Hyperglykämie

Der gestörte Glukosestoffwechsel ist wohl der komplexeste Faktor im Metabolischen Syndrom. Das erste Anzeichen eines gestörten Glukosehaushaltes ist eine verminderte Glukosetoleranz, die jedoch im klinischen Alltag meist zu spät erkannt wird. So weisen ca. 60 % aller Patienten bereits fünf Jahre vor der Erstdiagnose eines Diabetes mellitus Typ II eine verminderte Glukosetoleranz (Impaired glucose tolerance, IGT) bzw. einen erhöhten Nüchternblutzuckerspiegel (Impaired fasting glucose, IFG) auf [20].

Da schon postprandiale hyperglykämische Phasen durch die Entstehung freier Radikale zu kardiovaskulären Komplikationen führen können [21], ist die Früherkennung einer verminderten Glukosetoleranz durch einen OGTT unbedingt erforderlich.

1.4 Die Rolle des Blutmonozyten in der Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms

Die Monozyten machen 2-8 % aller Leukozyten aus. Mit einem Durchmesser von ca. 25 µm zählen diese Zellen zu den größten humanen Blutzellen. Monozyten entwickeln sich aus einer myeloiden Vorläuferzelle und können zu Makrophagen differenzieren, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und des Diabetes mellitus Typ II spielen. Zudem sind Monozyten zelluläre Mediatoren bei Entzündungen.

1.4.1 Monozyten und Entzündung bei Adipositas

Die Adipositas, ein maßgeblicher Faktor im Metabolischen Syndrom, ist mit einer leichten chronischen Entzündung assoziiert.

Unter normalen Bedingungen übernehmen Adipozyten Lipidspeicher- und Stoffwechselfunktionen, während Monozyten an der immunologischen Antwort beteiligt sind. Beide Zelltypen haben jedoch die Kapazität, die jeweils anderen Aufgaben zu übernehmen: So können Makrophagen Lipide einlagern und Adipozyten-spezifische Produkte wie den Peroxisome proliferator-activator receptor gamma (PPAR γ) exprimieren, während Präadipozyten Makrophagen-spezifische Antigene exprimieren, phagozytotische Aktivitäten entwickeln und Zytokine produzieren können [22].

Bei Übergewicht kommt es zu einer leichten Entzündung, die vor allem im Fettgewebe abläuft: Zum einen wandern Monozyten in das Fettgewebe ein, um dort zu Makrophagen zu differenzieren und proinflammatorische Zytokine wie Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) zu sezernieren [22, 23]. Zum anderen produzieren die Adipozyten selbst ebenfalls inflammatorische Zytokine [22]. Es wird sogar eine Differenzierung vom Präadipozyten zum Makrophagen diskutiert [24].

Außerdem sind bei Adipositas sowie bei Infektionen und anderen inflammatorischen Prozessen die Plasmalipidwerte erhöht, was wiederum zu Insulinresistenz und Arteriosklerose führt [22].

1.4.2 Monozyten und Arteriosklerose

Monozyten bzw. Makrophagen spielen in jeder Phase der Arteriosklerose eine zentrale Rolle [25]: In der frühen Phase der Arteriosklerose dringen Lipoproteine in die Intima der Gefäße ein und werden dort oxidiert. Dadurch exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und E-Selektin, woraufhin Monozyten in den subendothelialen Raum einwandern [26]. Auch andere Mediatoren wie Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (entspricht CC chemokine ligand 2 (CCL2)) spielen hierbei eine wesentliche Rolle [27].

In der Gefäßwand differenzieren die Monozyten zu Makrophagen, nehmen über Scavenger-Rezeptoren modifiziertes low-density Lipoprotein (LDL) auf und transformieren zu Schaumzellen. Diese sezernieren verschiedene Mediatoren wie den Transforming growth factor beta (TGF- β) oder den Platelet-derived growth factor (PDGF), die eine Proliferation der glatten Muskelzellen und deren Migration von der Media in die Intima bewirken [28].

Außerdem produzieren Makrophagen neben den bereits genannten Faktoren TGF- β und PDGF andere Zytokine (TNF- α , IL-1), proteolytische Enzyme (Metalloproteininasen) und Wachstumsfaktoren (IGF-1), die in den einzelnen Phasen der Arteriosklerose jeweils eine tragende Rolle spielen [25].

Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass postprandiale Hyperglykämien mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind [29, 30]. So ist ICAM-1 unter akuter Hyperglykämie sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Diabetikern im Serum erhöht [31, 32]. ICAM-1 bindet an das auf Monozyten exprimierte CD11a/CD11b, was zur Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen führt und deren Migration in den subendothelialen Raum fördert (s. oben). Auch die postprandial erhöhte Oxidation von LDL soll mit der Glukosekonzentration im Plasma assoziiert sein [33].

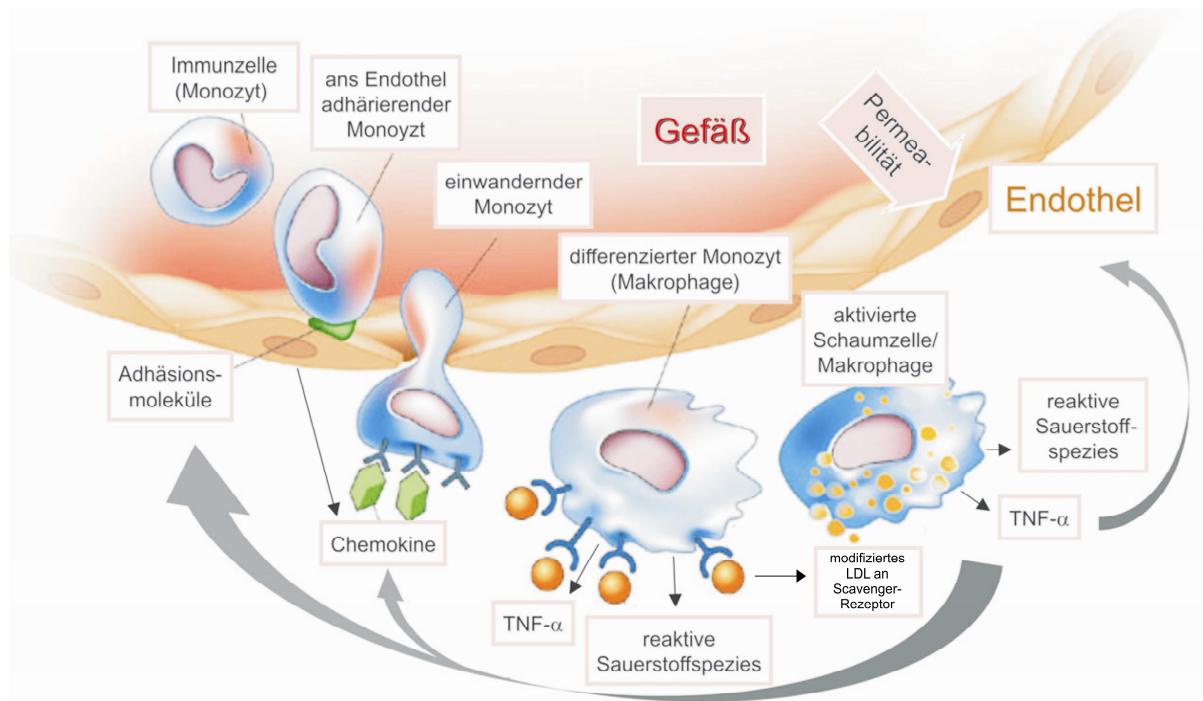


Abbildung 2: Die Rolle des Monozyten im Pathomechanismus der Arteriosklerose, modifiziert nach Kiemer, Diesel [34].

1.4.3 Monozyten und Insulinresistenz

Die Entstehung von Insulinresistenz hängt u.a. mit einem Signalweg im Makrophagen und Adipozyten zusammen, der durch Bakterien und deren Produkte aktiviert wird [35]. Dazu gehört Lipopolysaccharid (LPS), das über CD14 an die Zellmembran der Monozyten bindet und dort mit dem LPS-Signalrezeptor Toll-like

receptor 4 (TLR4) interagiert. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege, u.a. des Inhibitor of NF-κB Kinase (IKK) - Signalwegs und des c-Jun N-terminal Kinase (JNK) - Signalwegs [22].

JNK und IKK inhibieren über eine Serin-Phosphorylierung des IRS den Insulin-Signalweg, was zur Insulinresistenz beiträgt.

Außerdem führt die Phosphorylierung der IKK zur Phosphorylierung und Ubiquitierung des Inhibitors of NF-κB (IκB) [36], der daraufhin seine Affinität zum Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) verliert und im Proteasom abgebaut wird. NF-κB wird in den Zellkern transloziert und bewirkt dort die Transkription proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF-α), die ihrerseits wiederum zur Insulinresistenz beitragen [22].

Im adipösen Ernährungszustand werden IKK und JNK durch weitere Mechanismen induziert: Zum einen verursachen Hyperlipidämie und Hyperglykämie Stress im Endoplasmatischen Retikulum, was die JNK aktiviert [37]. Zum anderen werden durch die erhöhte Glukoseaufnahme in die Zelle und den vermehrten Glukoseabbau im Mitochondrium reaktive Sauerstoffverbindungen freigesetzt [38], die ebenfalls IKK und JNK induzieren [22].

1.5 NF-κB regulierte Gene

Der Transkriptionsfaktor NF-κB kommt in allen Zelltypen vor und spielt im Monozyten eine zentrale Rolle in der Immunantwort und Zellproliferation sowie -differenzierung. Er wird durch verschiedene Stimuli wie inflammatorische Zytokine oder oxidativen Stress induziert und reguliert die Expression von Chemokinen, Immunrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Zytokinen [39], von denen wiederum ein Teil zur Entstehung der Insulinresistenz beiträgt (s. oben).

Chronische Entzündung und Insulinresistenz sind oft mit dem Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCOS) vergesellschaftet. Bei PCOS-Patientinnen wird NF-κB unabhängig vom BMI durch Hyperglykämie induziert und IκB wird supprimiert [40]. Demnach initiiert eine postprandiale Hyperglykämie inflammatorische Prozesse. Auch Dhindsa et al. bestätigen eine Induktion von NF-κB nach oraler Glukoseaufnahme bei gesunden schlanken Erwachsenen, wobei hier auch die Insulinwerte postprandial ansteigen und somit ebenfalls zur Induktion von NF-κB führen könnten [41].

Andere Publikationen diskutieren einen postprandialen antiinflammatorischen Effekt von Insulin, der bei übergewichtigen Probanden NF-κB in mononuklearen Zellen inhibieren und IκB stimulieren soll [42].

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass NF-κB durch Hyperglykämien induziert und durch Insulin supprimiert wird. Bei insulinresistenten Patienten könnte somit eine längere hyperglykämische Phase die ohnehin schädlichen Auswirkungen erhöhter Glukosespiegel auf die Zelle noch verschlimmern. Bei jungen insulinsensitiven Probanden könnten jedoch die antiinflammatorischen Effekte des Insulins die proinflammatorischen Effekte der Glukose überwiegen.

1.6 Adipozytokine

Alle vom Fettgewebe sezernierten Proteine werden unter dem Begriff „Adipozytokine“ zusammengefasst. Dazu zählen u.a. Leptin, Adiponektin, Resistin, CORS-26 und Omentin. Einige dieser Proteine beeinflussen neben der Insulinsensitivität auch den Glukosestoffwechsel und können maßgeblich zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen [43].

Leptin reguliert im Hypothalamus die Nahrungsaufnahme und beeinflusst dementsprechend verschiedene periphere Zellen und Organe: Es ist sowohl an der Regulation von Immunzellen, pankreatischer beta-Zellen und Adipozyten als auch an der Regulation von Insulinsensitivität in Leber und Muskel beteiligt [44].

Während Leptin proportional zum Body-Mass-Index (BMI) steigt, werden die systemischen Adiponektinspiegel erniedrigt [45] und steigen erst bei Gewichtsreduktion wieder an. Adiponektin erhöht die Insulinsensitivität und weist eine antiinflammatorische Wirkung auf, wobei auch proinflammatorische Effekte des Adiponektins beschrieben wurden [45-47]. Adiponektin liegt im Blut als Trimer, Hexamer und HMW (high molecular weight) - Komplex vor [45], wobei der HMW-Komplex nach neueren Studien die aktive Form des Adiponektins darstellt [48].

CORS-26 (collagenous repeat-containing sequence of 26 kDa protein), ein Strukturhomologes des Adiponektins, wird sowohl von Adipozyten als auch von Monozyten produziert und weist antiinflammatorische Eigenschaften auf [49]. Obwohl in vitro Versuche darauf hinweisen, dass CORS-26 sezerniert wird [49], wurde CORS-26 bisher noch nicht im humanen Plasma analysiert.

Resistin ist mit der Entstehung der Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ II ebenfalls assoziiert [50]. Die Rolle von Resistin bei der Entstehung der Insulinresistenz im Menschen ist unklar. Während einige Studien erhöhte Resistinspiegel bei Typ II Diabetikern zeigen, konnten andere Untersuchungen dies nicht bestätigen. Obwohl Resistin die Glukose- und Lipidhomöostase der Maus stört, bleibt seine Rolle beim Menschen weiterhin unbekannt [51]. Während Resistin im Fett von Nagetieren nachgewiesen wurde, ist im Menschen bisher unklar, ob humane Adipozyten Resistin herstellen. Es konnte jedoch eine hohe Sekretion von Resistin im humanen Monozyten gezeigt werden, die durch proinflammatorische Stimuli erhöht wird.

Omentin wird v.a. vom viszeralen bzw. omentalen Fett sezerniert und konnte bereits mit Hilfe von Immunoblots im humanen Serum detektiert werden [52]. Rekombinantes Omentin fördert die insulinabhängige Glukoseaufnahme am Adipozyten [52], wobei bisher noch nicht untersucht wurde, ob akute Hyperglykämien das systemische Omentin beeinflussen. Das systemische Omentin ist bei Frauen erhöht, während es bei übergewichtigen Spendern erniedrigt ist [53].

1.7 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen postprandialer Hyperglykämie und gesteigerter Insulinsekretion in jungen, gesunden Probanden analysiert werden. Dies beinhaltet sowohl die systemischen Mengen der Adipozytokine Adiponektin, Leptin, Omentin, CORS-26 und Resistin als auch die Gen- und Proteinexpression in Blutmonozyten. Hier wurden neben NF- κ B regulierten Genen auch Gene des Insulinsignalwegs und Mediatoren im Glukose- und Lipidstoffwechsel untersucht. Da die bisher publizierten Daten zu diesem Thema vor allem an Patienten mit einer Insulinresistenz bzw. einem Diabetes mellitus Typ II und/oder oft an älteren Personen, deren Glukosetoleranz ebenfalls erniedrigt ist, durchgeführt wurden, war es Inhalt dieser Dissertation, den Einfluss von oraler Glukoseaufnahme in insulinsensitiven und jungen Probanden zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Peqlab
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Blutzuckermessgerät ACCU-Chek® Comfort	Roche
CCD-Kamera	Rainbow
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
Drucker am Photometer DPU-414 Thermal Printer	Seiko
Eismaschine ZBE 150	Ziegra
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Geldokumentation	MWG-Biotech
Inkubationsschrank 37°C, 5% CO ₂	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
MidiMACST™ Separator quadro	Miltenyi Biotec
Mikroskop und Zubehör	Nikon
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-Q Biocell	Millipore
PCR Cycler programmierbar PTC-100	MJ Research, Inc.
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort

Power Supply Power Pac 200	BIORAD
Schüttler 3013	GFL
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	BIORAD
SDS-Gelplatten und Zubehör	BIORAD
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Stechhilfe ACCU-Chek® Softclix® Pro	Roche
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV/Vis Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Vortex Typ 54117 Reax 1 D R	Heidolph
X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,100 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon®
Blutzuckerteststreifen ACCU-Chek® Sensor Comfort Glucose	Roche
Dextro® O.G.T.-Saft	Roche
Dialyseschlauch (29 mm)	Serva
ELISA-Platte (96 Loch)	Corning Costar®
Gel Blotting Papier Whatman®	Schleicher & Schuell
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	BIORAD
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon®
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
MACS CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec
MACS LS magnetische Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Parafilm	American National Can™
Pipettenspitzen	Sarstedt

Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (25 ml, 50ml)	Corning Costar®
Steriflip® (50 ml, 0,22µm Porengröße)	Millipore
Sterile Einmalspritzen	BD Falcon®
Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterile Membran-Adapter	Sarstedt
Vacutainer®CPT™ (8 ml)	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems Safety-Lok™ Blood Collection Set	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems PrecisionGlide™ (0,8 bzw. 0,9 x 38 mm)	Becton Dickinson (BD)
Vakuum Sterilfiltrationssystem (500 ml, 1000 ml)	Millipore
Zell Schaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-, 24-Loch) Flat Bottom Cell+	Sarstedt
Zellkulturplatten (12-Loch) Multiwell™ 12 Well	BD Falcon®

2.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung (40%)	BIORAD
Ammoniumpersulfat (APS) (10%)	BIORAD
Bicinchoninsäure	Sigma
Biosafe™ Coomassie	BIORAD
Bisacrylamidlösung (2%)	BIORAD
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Biomol
CaCl ₂	Fluka
Chloroform	Merck
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
DNA-Leiter, 1kb	Invitrogen
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
FCS	Biochrom
Full Range Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences

Glukose	Sigma
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Igepal	Sigma
Insulin	Sigma
Kupfer(II)sulfat	Sigma
LPS	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
TEMED	Merck
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
NuSieve® 3:1 Agarose	Cambrex
PBS	Gibco
PMA	Sigma
2-Propanol	Merck
RPMI 1640	PAN
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
SeaKem® GTG® Agarose	Cambrex
SeaKem® LE Agarose	FMC BioProducts
Softasept® N	Braun
Thromborel® S b	Dade Behring
Tris-NH ₃	Merck
Tris-HCl	Merck
Trizol	Invitrogen
Tween® 20	Sigma
Xylencyanol	Merck

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Anti-ABCA1 monoklonaler Antikörper	Abcam
Anti-Actin monoklonaler Antikörper	Sigma
Anti-Apolipoprotein A-I polyklonalter Antikörper	Biodesign
Anti-Apolipoprotein C-I polyklonalter Antikörper	Biodesign
Anti-Apolipoprotein E polyklonalter Antikörper	Chemicon®
Anti-CD163 monoklonaler Antikörper	Serotec
Anti-Cors26 polyklonalter Antikörper	R&D Systems
Anti-Flotillin-1 monoklonaler Antikörper	BD Bioscience
Anti-Omentin polyklonalter Antikörper	Pineda Antikörperservice
Anti-PI3 Kinase p85 polyklonalter Antikörper	Upstate
Anti-Superoxide Dismutase II polyklonalter Antikörper	Lab Frontier
Anti-Syntaxin-13 polyklonalter Antikörper	Synaptic Systems
Anti-Syntaxin-6 monoklonaler Antikörper	BD Bioscience

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research

2.1.5 Kit-Systeme

Apo E4/Pan-Apo E ELISA Kit	MBL
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human CCL4/MIP-1 β	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human IL-6	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Resistin	R&D Systems

ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Bioscience
Human IL-8 ELISA Set	BD Bioscience
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Mercodia Insulin ELISA	Mercodia
Quantikine® HS High Sensitivity ELISA Human IL-6	R&D Systems
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems

2.1.6 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgeführt. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

2.1.6.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50-fach:

Tris-NH ₃	121	g
Essigsäure (99%)	28,6	ml
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	50	ml
	ad 0,5	l ddH ₂ O

Gelladepuffer, 10-fach:

Glyzerin (87 %)	5,8	ml
Bromphenolblau	0,025	g
Xylencyanol	0,025	g
	ad 10	ml 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.6.2 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

2.1.6.2.1 Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten

RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Puffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Der Puffer wurde bei 4°C höchstens zwei Wochen gelagert.

2.1.6.2.2 Lösungen für SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer (2 x Lämml), 2-fach:

Glyzerin (87 %)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der SDS-Probenpuffer wurde im Verhältnis 1:1 mit der jeweiligen Probe vermischt.

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH ₂ O	32,0	ml

Lösung für 10%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH ₂ O	28,5	ml

Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH ₂ O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels wurde der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:167 und TEMED im Verhältnis 1:334 zugegeben.

2.1.6.2.3 Lösungen für Western-Blotting**Tank-Puffer, 10-fach:**

Glyzin	140	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Wettransfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

PBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

Blockierlösung:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

Die Blockierlösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

BSA-PBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	5,0	ml
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbe wahrt. Die primären Antikörper wurden in dieser Lösung in der Regel im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

2.1.6.2.4 Lösungen für Adiponektin-, CCL4-, IL-6-, und Resistin-ELISA**Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

Reagent Diluent:

BSA	5	g
	ad 0,5	l PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbe wahrt.

Substratlösung:

Die Lösungen A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des Substrate Reagent Pack von R&D Systems wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.

Stopplösung:

Schwefelsäure rauchend	9,8	g
	ad 50	ml ddH ₂ O

Verdünnung der Antikörper:

Der Capture Antikörper wurde laut Protokoll in PBS, der Detection Antikörper in Reagent Diluent verdünnt.

Verdünnung des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Das HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsangabe in Reagent Diluent verdünnt.

2.1.6.2.5 Lösungen für IL-8-ELISA

Im Folgenden werden Lösungen aufgeführt, die nur für den IL-8-ELISA benötigt wurden. Waschpuffer, Substrat- und Stopplösung wurden wie oben beschrieben verwendet.

Assay Diluent:

FCS	50 ml
	ad 0,5 l PBS

Coating Buffer:

NaHCO ₃	8,40 g
Na ₂ CO ₃	3,56 g
	ad 1 l ddH ₂ O

Verdünnung der Antikörper:

Der Capture Antikörper wurde laut Protokoll in Coating Buffer verdünnt. Der Detection Antikörper wurde, zusammen mit dem HRP-Streptavidin, laut Protokoll in Assay Diluent verdünnt.

2.1.6.3 Lösungen für die Isolierung primärer humaner Monozyten

CD14 Beads Puffer:

BSA	0,5 g
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	2 ml
	ad 0,5 l PBS

Der CD14 Beads Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.7 Glukoselösung

Zur Durchführung eines OGTT wurde der Dextro® O.G.T.-Saft (Roche) verwendet. Eine Flasche mit 300 ml Saft enthält ein Mono-/Oligosaccharid-Gemisch (Glukose-Sirup), das nach enzymatischer Spaltung einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose entspricht, sowie Johannisbeermuttersaft, Kaliumsorbitat (Konservierungsmittel) und gereinigtes Wasser. Sie enthält außerdem 0,01-0,06 Vol.-% Alkohol.

2.1.8 Kultivierung humaner Zellen

Die humane monozytäre Zelllinie THP-1 (American Type Culture Collection) wurde bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert. Für die Kultivierung von THP-1 Zellen wurde das Medium RPMI 1640, das mit 10% FCS versetzt wurde, verwendet. Außerdem wurde dem Medium Penicillin (200mU/ml Medium) und Streptomycin (0,2 mg/ml Medium) als Antibiotika zugesetzt.

Die Kultivierung primärer Monozyten erfolgte ebenfalls mit RPMI 1640. Allerdings wurde hierbei statt FCS humanes Serum im selben Verhältnis zugesetzt. Auf Antibiotika wurde verzichtet.

2.1.9 Primer für LightCycler-Analysen

Die Primer für die LightCycler-Expressionsanalysen wählte man jeweils zu beiden Seiten eines Introns, um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp garantierte möglichst kurze Elongationszeiten. Außerdem wurden die Primer so entworfen, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug. Die Spezifität der Primer konnte durch Sequenzierung der PCR-Produkte verifiziert werden.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
ABCA_1	
ABCA_1uni	TCTTGCCCTTTGAGAGGA
ABCA_1rev	GGCACAAATTCCACAAGAACCC
β-Aktin	
β-Aktin_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG
β-Aktin_rev	CGCACGATTCCCTCTCAGCTC

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Adiponektin Rezeptor 1 (Adipo R1)	
AdipoR1_uni	GGGGAATTCTCTCCCACAAAGGATCTGTGGTG
AdipoR1_rev	GGGCTGCAGTTAAGTTCTGTATGAATGCGGAAGAT
Adiponektin Rezeptor 2 (AdipoR2)	
AdipoR2_uni	GGGGAATTCAACGAGCCAACAGAAAACCGATTG
AdipoR2_rev	GGGCTGCAGCTAAATGTTGCCGTGTTCTGTGTAT
Adipophilin	
Adipophilin_1156	ACACCCTCCTGTCCAACATC
Adipophilin_1394	AAAGGGACCTACCAGCCAGT
Annexin A4	
Annexin A4_uni	TTGGGTGGCTGAACCTCTGAT
Annexin A4_rev	GGTGCTCTTGTAGGCTGTCC
ApoE	
ApoE_uni	GGATCCTTGAGTCCTACTCAGC
ApoE_rev	CTGTCTCCACCGCTTGCT
Calumenin	
Calumenin_uni	TGCACCCCTGAGGAGTATGAC
Calumenin_rev	TCCTTGTCCATCTTCCCCATC
CCL2	
CCL2_uni	TTC TGT GCC TGC TGC TCA T
CCL2_rev	CAC CAA TAG GAA GAT CTC AGT GC
CCL4	
CCL4_uni	CCC AGC CAG CTG TGG TAT
CCL4_rev	AGG AAC TGC GGA GAG GAG TC
CCL5	
CCL5_uni	CCT CAT TGC TAC TGC CCT CT
CCL5_rev	ACA CAC TTG GCG GTT CTT TC
CD36	
CD36_uni	GGTGTGGTGATGTTGTTGC
CD36_rev	CAGGGCCTAGGATTGTTGA

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
CD86	
CD86_uni	ACAGCAGAAGCAGCCAAAAT
CD86_rev	TCCTGGTCCTGCCAAAATAC
Centaurin	
Centaurin_uni	ATGGGCTGCAGATCACCTAC
Centaurin_rev	CCCAGTCTTTCCATGAAGC
Collagenous Repeat-Containing Sequence of 26-kDa Protein (CORS-26)	
CORS-26_436-uni	TTGCATTGATGGCTTCTCTG
CORS-26_649-rev	ACTGTGTTGCCATTGTGCAT
Flotillin-1	
Flotillin-1_uni	TTCTAACTCGCCTGCCAGAG
Flotillin-1_rev	GGTGGGACCTCACTGTCAAT
IL-6	
IL-6_uni	GCC CAG CTA TGA ACT CCT TCT
IL-6_rev	GCG GCT ACA TCT TTG GAA TC
IL-8	
IL-8_uni	ACCGGAAGGAACCATCTCACTG
IL-8_rev	GCATCTGGCAACCCTACAACA
PTEN	
PTEN_uni	TCCACAAACAGAACAAAGATGCT
PTEN_rev	CGATTCTTGATCACATAGACTTCC
Resistin	
Resistin_uni	TGCAGGATGAAAGCTCTCTG
Resistin_rev	AATGCTGCTTATTGCCCTAAAT
SDHC	
SDHC_uni	GTCCAGACCGGAACCCAAG
SDHC_rev	CTTATTCCAGAACCGCTCCA
SOD2	
SOD2_uni	GTTGGCCAAGGGAGATGTTA
SOD2_rev	GCCGTCAGCTCTCCTTAAA

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl der Spender

Die Auswahl der 20 Probanden, mit denen ein OGTT durchgeführt wurde, erfolgte nach Alter und BMI (Body-Mass-Index), um ein möglichst homogenes Kollektiv zu erhalten: Alle Probanden waren etwa gleichen Alters (22 ± 1 Jahre).

Der BMI der Probanden sollte in dem von der WHO definierten Bereich für Normalgewicht ($20\text{-}25 \text{ kg/m}^2$) liegen und wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\text{BMI [kg/ m}^2\text{]} = \text{Gewicht [kg] / Körpergröße}^2 \text{ [m}^2\text{]}$$

Es nahmen 6 Frauen und 14 Männer an der Studie teil, wobei allen Probanden jeweils eine Nummer von 1-20 zugeteilt wurde.

2.2.2 Durchführung des OGTT

Nach 10-stündigem Fasten wurde den Probanden im nüchternen Zustand venöses Blut durch Punktion einer der Vv. cubitales abgenommen. Den Spendern der RNA-Gruppe wurden 32 ml (4 Vaccutainer), denen der Protein-Gruppe 48 ml (6 Vaccutainer) Blut abgenommen. Direkt im Anschluss wurden den Spendern jeweils 75 g Glukose p.o. verabreicht. Nach zwei Stunden erfolgte eine weitere Blutentnahme durch eine erneute Venenpunktion, bei der nochmals 32 bzw. 48 ml Blut abgenommen wurden. Die Blutzuckermessung geschah jeweils parallel zur Blutentnahme mit venösem Vollblut.

2.2.3 Homeostasis Model Assessment Index (HOMA-Index)

Aus den während des OGTT bestimmten Konzentrationen für Insulin und Glukose lässt sich ein für jeden Patienten spezifischer Index berechnen, der sogenannte Homeostasis Model Assessment Index (HOMA-Index) [54].

Durch diesen Index kann sowohl auf die Insulinresistenz als auch auf die beta-Zell-Funktion geschlossen werden. Im klinischen Alltag werden zur Abschätzung der Insulinresistenz jedoch bevorzugt HDL- und Triglyzeridwerte verwendet, da diese leicht zu bestimmen sind und signifikant mit der Insulinresistenz korrelieren.

Patientinnen mit PCOS und Insulinresistenz weisen signifikant höhere Triglycerid- und Gesamtcholesterinwerte und zugleich niedrigere HDL-Werte auf als die Kontrollgruppe [55].

Die Berechnung des HOMA-Index erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{HOMA-Index} = \text{Insulin (nüchtern, } \mu\text{U/ml)} \times \text{Blutzucker (nüchtern, mg/dl)} / 405$$

oder

$$\text{HOMA-Index} = \text{Insulin (nüchtern, } \mu\text{U/ml)} \times \text{Blutzucker (nüchtern, mmol/l)} / 22,5.$$

Die HOMA-Index wurde nach folgendem Schema bewertet:

≤ 1	normal
> 2	Hinweis auf eine Insulinresistenz
$> 2,5$	Insulinresistenz sehr wahrscheinlich
$> 5,0$	Diabetes mellitus Typ II

2.2.4 Isolierung humaner peripherer Monozyten aus Vollblut

Die mit jeweils 8 ml Vollblut gefüllten Vaccutainer wurden direkt nach der Blutentnahme mehrmals invertiert, um das Natriumcitrat im Röhrchen mit dem Blut zu vermischen und eine Gerinnung zu verhindern. Anschließend wurden die Vaccutainer bei 2900 rpm für 25 min bei RT zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt und das Polyester-Gel in den Vaccutainern wurden die Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte separiert: Schwere Bestandteile, v.a. aber Erythrozyten, blieben am Boden des Röhrchens zurück, während leichtere Bestandteile, wie etwa das Plasma und mononukleäre Zellen, sich nun über der Gelschicht befanden. Die Vaccutainer wurden anschließend abermals 5-6 mal invertiert und unter der Sterilbank geöffnet. Plasma und mononukleäre Zellen eines Spenders wurden abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde anschließend bei 1200 rpm für 15 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 20 ml PBS gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 min, RT). Das Plasma der OGTT-Teilnehmer wurde jeweils auf vier Eppendorfcups zu je 1 ml aufgeteilt; der Rest wurde in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Schließlich wurde das gesamte Plasma bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 2 ml CD14-Beadspuffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (1200 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurde das Pellet in CD14-Beadspuffer (160 µl pro 6 Vaccutainer) resuspendiert und mit CD14-

Beads (40 µl pro 6 Vaccutainer) für 20 min bei 4°C inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde das Eppendorfcup alle 5 min angeschnippt, um eine gute Durchmischung von Beads und Zellen zu gewährleisten. Dabei konnten sich die an die magnetischen Beads gekoppelten monoklonalen CD14-Antikörper an das Oberflächenprotein CD14, das v.a. von Monozyten exprimiert wird, anlagern. Die so markierten Monozyten konnten nun durch ein magnetisches Feld von anderen Zellen separiert werden. Hierzu wurde der Zellsuspension nach der Inkubation 1 ml CD14-Beadspuffer zugegeben und bei 1200 rpm erneut 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in 2 ml CD14-Beadspuffer aufgenommen. In einen Magneten wurden LS Säulen eingespannt, die mit jeweils 3 ml CD14-Beadspuffer äquilibriert wurden. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension auf eine Säule gegeben und dreimal mit je 3 ml CD14-Beadspuffer gewaschen. Danach wurden die Monozyten eluiert: Hierzu wurden die Säulen nacheinander vom Magneten abgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt. Die Elution der Monozyten erfolgte mit 5 ml CD14-Beadspuffer. Schließlich wurden die monozytären Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in der für weitere Schritte benötigten Substanz resuspendiert: Zur RNA-Isolierung wurden die Monozyten in 300 µl Trizol aufgenommen und schließlich bei -80°C gelagert; für das Arbeiten mit Proteinen wurde das Zellpellet in 50 µl RIPA resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Eine Resuspension in RPMI-Medium erfolgte für in vitro Versuche, die unabhängig von den OGTT-Versuchen stattfanden (5 ml Medium pro 6 Vaccutainer); hiervon wurde ein 10 µl Aliquot verwendet, um die Zellzahl in der Neubauer Zellzählkammer zu ermitteln. Die Ausbeute lag bei ca. 1-1,5 Millionen Monozyten pro Vaccutainer.

2.2.5 Herstellen von autologem Serum

Für die Durchführung von in vitro Experimenten mit Monozyten war autologes Serum erforderlich, das während der Monozyten-Isolation aus Plasma gewonnen wurde (s. oben).

Vorab wurde PBS auf 4°C gekühlt und Thromborel in 10 ml Wasser gelöst, welches dann für mindestens 30 Minuten bei 37°C gelagert wurde.

Zum Plasma in dem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden schließlich sowohl eine Spatelspitze Calciumchlorid als auch das gelöste Thromborel (1%) gegeben. Es folgte eine Inkubation des Plasmas für 10 min bei 37°C. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette das Gerinnungsprodukt von der Innenwand des Zentrifugenröhrchens gelöst und für 30 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Dialyseeschlauch überführt und eine Stunde gegen das gekühlte PBS dialysiert; nach PBS-Wechsel erfolgte eine weitere Dialyse über eine Stunde. Abschließend wurde das so gewonnene Serum steril filtriert.

2.2.6 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der humanen Zelllinie THP-1 erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen für semi-adhärente Zellen. Die Zellen wurden in 20-30 ml mit FCS supplementierten RPMI-Medium in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre vermehrt. Da THP-1 Zellen nicht adhärent sind, erfolgte die Passage der Zellen alle 4-5 Tage nur durch Absaugen eines Teils der Zellsuspension und Zugabe von frischem Medium. Zur Differenzierung der THP-1 Zellen in einen Makrophagen ähnlichen Zustand wurden die Zellkulturflaschen mit jeweils 100 ng/ml PMA versetzt. Hierdurch erhielt man adhärente Zellen, die am Boden der Kulturflasche einen Monolayer ausbilden.

2.2.7 Arbeiten mit RNA

2.2.7.1 Isolierung von RNA aus Zellen

2.2.7.1.1 Isolierung von RNA aus THP-1 Zellen

Die Isolation von RNA aus THP-1 Zellen erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen. Die Zellen wurden in RLT-Puffer lysiert. Anschließend wurde die genomische DNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Lysats durch eine dünne Kanüle geschert und die RNA nach Angaben des Herstellers über Säulentchnik isoliert. Die RNA wurde mit 50 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) von dem Säulchen eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7.1.2 Isolierung von RNA aus Monozyten

Die Isolation von RNA aus Monozyten erfolgte nach der Trizol-Methode: Die Monozyten in 300 µl Trizol (s. 2.2.4) wurden aufgetaut, mit jeweils 1/5 Volumen Chloroform versetzt (60 µl) und das Gefäß 4-5 mal invertiert. Nach einer Inkubation über 2 min bei RT wurde der Ansatz für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die so entstandene klare obere Schicht wurde abgezogen, in ein anderes Eppendorfcup überführt und wiederum mit 1/5 Volumen Chloroform versetzt. Nach Wiederholung aller bisherigen Schritte wurde zu der klaren Lösung Isopropanol (0,7 Vol.) gegeben, das zum Ausfällen der RNA führt, und mehrmals invertiert. Es folgte eine Inkubation über 10 min auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit vorgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation über 15 min bei 12000 g wurde der Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Die so gewonnene RNA wurde in 40 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA wurde eine 1:100-Verdünnung mit RNase freiem Wasser hergestellt. Die Extinktion dieser Lösung wurde in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Referenz diente Wasser.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (V), der jeweils gemessenen Extinktion bei 260 nm (E_{260}) und des für RNA spezifischen Extinktionsfaktors (ϵ_{RNA}) von $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die RNA-Konzentration berechnet werden:

$$c_{RNA} = E_{260} \cdot \epsilon_{RNA} \cdot V$$

- c_{RNA} : Konzentration der RNA in der Lösung [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
 E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
 ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient von RNA, gleich $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
V: Verdünnungsfaktor, hier 100

Über die Reinheit der RNA konnte durch zusätzliche Messungen der Extinktion bei 280 nm (Proteine) und 320 nm (organische Reste) eine Angabe gemacht werden. Bei reiner, nicht degraderter RNA liegt das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} zwischen 1,5 und 2,0.

2.2.7.3 Reverse Transkription

Um PCR-Reaktionen, wie z.B. eine Real-Time RT-PCR, durchführen zu können, wurde die RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dies geschah mit dem Reverse Transcription System von Promega, wobei als Primer die Random Hexamer Primer eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz setzte sich, wie vom Hersteller vorgeschrieben, aus folgenden Komponenten zusammen:

$MgCl_2$, 25 mM	8	μl
RT-Puffer, 10 x	4	μl
dNTP-Mix, 10 mM	4	μl
Random Hexamer Primer, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1	μl
RNasin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/ μl	1	μl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/ μl	1,2	μl
RNA (2 μg) in nukleasefreiem Wasser	20,8	μl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion abgestoppt, indem die Reverse Transkriptase bei 95°C hitzeinaktiviert wurde. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.8 Arbeiten mit DNA

2.2.8.1 Real-Time RT-PCR

Mit Hilfe der Real-Time RT-PCR können Nukleinsäuren schnell und sensitiv quantifiziert werden. Durch die Kombination aus Thermocycler und Fluorimeter kann die Amplifikation von PCR-Produkten schnell analysiert und während des gesamten Reaktionsverlaufs verfolgt werden. Durch die Real-Time RT-PCR konnte die Genexpression sowohl in primären Monozyten als auch in THP-1 Zellen untersucht werden. Dazu wurde die RNA genannter Zellen in einzelsträngige cDNA überführt, welche in der Real-Time RT-PCR eingesetzt werden konnte. Zur Detektion wurde in allen Experimenten auf den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zurückgegriffen; es wurde der LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) verwendet. Zuerst wurde ein Master-Mix hergestellt, der bereits alle nötigen Reagenzien enthielt und dem nur noch die cDNA zugesetzt werden musste. Ein Master-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsmix (Roche)	2	µl
MgCl ₂ , 25 mM	2,4	µl
univere Primer, 5 pmol/µl	1	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1	µl
ddH ₂ O	11,6	µl

Der Master-Mix wurde nun zu je 18 µl auf dünne Glaskapillaren aufgeteilt. SYBR Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix (Roche) bereits enthalten. Nach der Zugabe von 2 µl der jeweiligen cDNA bzw. 2 µl Wasser für die Wasserkontrolle wurden die Kapillaren kurz bei 2000 rpm zentrifugiert. Daraufhin konnte die Reaktion in der Tiefe der Glaskapillaren ablaufen. Dazu wurden die Kapillaren in ein Karussell eingespannt, um so im LightCycler für 10 min auf 95°C erhitzt zu werden. Dabei wurde die Taq-Polymerase aktiviert, die die Amplifizierung des jeweiligen Genproduktes einleitete. Es erfolgten insgesamt 45 Amplifizierungszyklen, wobei sich jeder Zyklus aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 60°C (spezifisch für die jeweiligen Primer) und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammensetzte. Nach Abschluss der Elongationsphase wurde in jedem Amplifikationszyklus die Konzentration an cDNA bestimmt. Dies geschah durch die Bestimmung der Fluoreszenz bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C). Da

sich das SYBR Green I in doppelsträngige DNA einlagert, verhält sich die gemessene Fluoreszenz proportional zum Reaktionsprodukt der amplifizierten DNA (Abbildung 3). Durch die Fluoreszenz war es möglich, die Amplifikationszyklen ständig zu verfolgen.

Für jede Probe wurde ein spezifischer Crossingpoint (Cp) bestimmt, indem in einem Graphen die Fluoreszenzmesswerte gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurden. Der Cp beschreibt den Reaktionszyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz einen deutlich positiven Wert annimmt. Außerdem ist der Cp umgekehrt proportional zur Ausgangskonzentration der cDNA. Verschiedene Proben benötigen demnach in Abhängigkeit ihrer Ausgangskonzentration eine unterschiedliche Anzahl an Amplifikationszyklen, um den Cp zu erreichen.

Damit nun verschiedene PCR-Reaktionen unterschiedlicher Effizienz miteinander verglichen werden konnten, bediente man sich einem relativen Standard: Hierzu wurde jeweils eine 1:1-Verdünnungsreihe der betreffenden cDNA hergestellt (Monozyten-cDNA oder THP-1-cDNA) und jedem der vier Standardproben ein definierter Wert zugewiesen (50, 25, 12,5 und 6,25 ng). Durch die Auftragung der Cp-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration entstand eine Standardkurve, die jedem Cp eine definierte relative Konzentration zuordnete.

Um eine Aussage über die Regulation eines bestimmten Zielgens treffen zu können, wurde zusätzlich von jeder Probe die cDNA-Konzentration eines sog. Housekeeping Gens (hier β -Aktin) bestimmt, das durch die jeweilige Stimulation bzw. den OGTT nicht reguliert wurde. Der Quotient aus den cDNA-Konzentrationen des Zielgens und des β -Aktins ergibt einen zum Houskeeping Gen normalisierten Wert, der hinsichtlich Qualitäts- und Quantitätsunterschiede in der Probenvorbereitung korrigiert ist.

Schließlich wurde ein Quotient aus den normalisierten Werten der stimulierten Proben und der Kontrollen (THP-1) bzw. der 2 h- und der 0 h-Proben (OGTT) gebildet. Dieser ermöglichte es, eine Aussage über die Expression des Zielgens in Abhängigkeit der Stimulation zu treffen.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde nach der Amplifikationsphase durch eine Schmelzkurve überprüft: Dazu wurde die cDNA langsam ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{s}$) von 60°C auf 95°C erhitzt und analog die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Da jede spezifische Reaktion auch nur ein spezifisches Produkt bildet, das bei einer bestimmten Temperatur schmilzt, nimmt am Schmelzpunkt die Fluoreszenz plötzlich

stark ab. Entstehen jedoch durch unspezifische Reaktionen mehrere Produkte, so kommt es zu einer unscharfen Abnahme der Fluoreszenz, u.U. über mehrere Stufen.

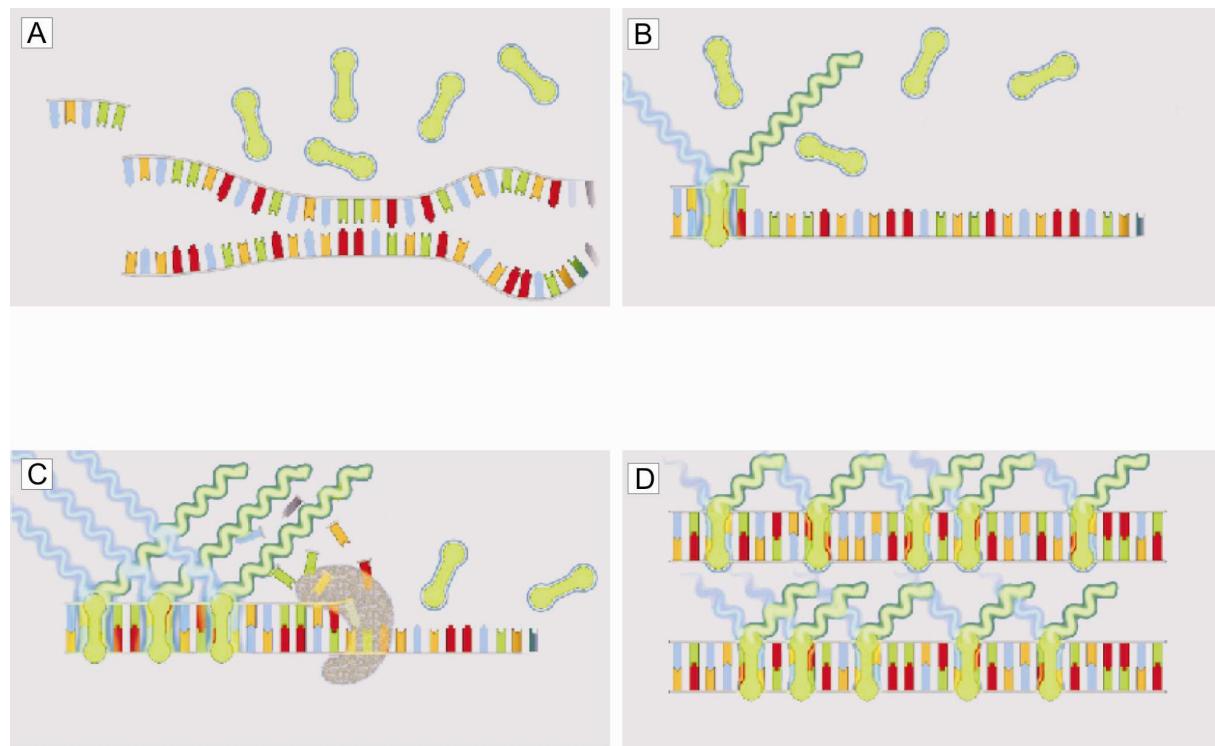


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR Green I (A) Denaturierung, (B) Annealing, (C) Elongation, (D) PCR-Produkt [56].

2.2.9 Arbeiten mit Proteinen

2.2.9.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen wurde zuerst der Überstand abgenommen. Die adhärenten THP-1 Zellen bzw. die primären Monozyten wurden anschließend mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und mit PBS, das mit einem Proteaseinhibitor versetzt war, gewaschen. Schließlich wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet im gleichen Volumen vorgekühlten RIPA-Zellysepuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Abschließend wurden mit Ultraschall sowohl die Zellen mechanisch lysiert als auch die genomische DNA geschert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA) - Methode [57]. Dazu wurden die Proben 1:10 in PBS verdünnt. Davon wurden wiederum 10 µl mit 200 µl der Reaktionslösung versetzt. Letztere bestand aus einem

Gemisch aus Bicinchoninsäure und 4%iger Kupfer-II-Sulfatlösung im Verhältnis 1:50. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Hierbei reduzieren die Proteine die Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen, die wiederum mit der Bicinchoninsäure einen violetten BCA-Cu¹⁺-Komplex bilden. Schließlich konnte die Extinktion bei 562 nm bestimmt werden und über eine BSA-Standardkurve auf die Proteinmenge geschlossen werden, die proportional zur Produktbildung ist.

2.2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierzu wurden die Proteine mit einem 2x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 10 min bei 60°C erhitzt. Das β-Mercaptoethanol des Puffers denaturierte die Proteine; zudem lagert sich das negativ geladene SDS des Probenpuffers gleichmäßig an die aufgefalteten Proteine an und überdeckt so die Eigenladung. So entsteht eine konstant negative Ladung pro Masseneinheit Protein, die es ermöglicht, die einzelnen Proteinfragmente ausschließlich nach ihrer Größe und ihrem Gewicht aufzutrennen.

Alle Gele wurden kurz vor Gebrauch frisch gegossen und bestanden jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngel. Zuerst wurden Trenngele hergestellt: für Proteine bis 80 kDa wurden 15%ige, für Proteine über 80 kDa 10%ige Trenngele verwendet. Hierzu versetzte man die jeweilige Stammlösung (s. 2.1.6.2.2) kurz zuvor mit den entsprechenden Mengen an 10%igem APS und TEMED. Zwischen zwei Glasplatten gegossen konnte das Gel nun auspolymerisieren, wobei die Oberfläche des Gels mit Wasser überschichtet wurde, um eine glatte Begrenzung zu erhalten. Anschließend konnte auf das Trenngel ein 5%iges Sammigel gegossen werden, in dessen Taschen die Proteinlösung pipettiert wird. Im Sammigel werden die Proben vor dem Eintritt in das Trenngel aufkonzentriert. Die so hergestellten Gele wurden schließlich in eine Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und vollständig mit 1x SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Nun konnten sowohl die vorbehandelten Proben als auch ein Proteinstandard aufgetragen werden. Als Standard diente der Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker, mit dessen Hilfe die Größe der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden konnte. Zur Elektrophorese wurde für ca. 90 min eine Stromstärke von 25 mA pro Gel angelegt.

2.2.9.4 Western-Blotting

Unter Western-Blotting versteht man den Transfer von Proteinen eines Gels auf eine Trägermembran und die anschließende immunchemische Detektion auf der Membran [58].

In dieser Arbeit nutzte man hierzu v.a die Wettransfer-Methode: Nach der SDS-PAGE wurden die Gele kurz in Wettransfer-Puffer gelegt. Als Trägermembran diente eine PVDF-Membran, die zuerst zugeschnitten und somit an die Gelgröße angepasst wurde, kurz in Methanol gelegt und schließlich in Wettransfer-Puffer äquilibriert wurde. Auch die Schwämmchen und die Whatman-Filterkartons wurden mit Wettransfer-Puffer benetzt. Anschließend wurde der Blot aufgebaut: Die Basis bildete ein Schwämmchen, auf das zwei Filterpapiere in der Größe des Gels gelegt wurden. Darauf platzierte man nun mittig die PVDF-Membran, auf die wiederum das Gel gelegt wurde. Überdeckt wurde das Ganze erneut von zwei Whatman-Filtern und einem Schwämmchen. Nach jeder Schicht wurde mit einem Plastikröhrchen mehrmals über die Oberfläche gerollt, um Luftblasen zu entfernen, die den Blotvorgang stören. Das so entstandene Paket wurde schließlich zwischen einer Klemme gelegt und so in eine Blotkammer eingespannt, dass die Membran zur Anode, das Gel zur Kathode zeigte. Die Kammer wurde nun vollständig mit Wettransfer-Puffer gefüllt und zusätzlich mit einer Durchlaufkühlung bzw. einem Eisblock versehen. Es wurde für 90 min eine konstante Spannung von 80 V angelegt, bei der der Transfer der Proteine auf die Membran stattfand.

Im Anschluss daran konnte die Detektion spezifischer Proteine auf der Membran erfolgen. Hierzu wurde die Membran nach dem Blotvorgang für eine Stunde in Blockierlösung gelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Nach kurzem Waschen mit PBST konnte der in BSA-PBST verdünnte primäre Antikörper auf die Membran gegeben werden. Dieser konnte über Nacht bei 4°C spezifisch an das Protein binden. Am nächsten Tag wurde die Membran eine weitere Stunde bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend dreimal mit PBST gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem jeweiligen sekundären Antikörper bei RT. Dieser mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Antikörper wurde zuvor 1:5000 in Blockierlösung verdünnt und konnte nun an den primären Antikörper binden. Nach dieser Inkubation wurde die Membran nochmals eine Stunde in PBST und anschließend kurz in PBS gewaschen, bevor die Detektion der

HRP mit ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience) erfolgen konnte. Dazu wurde 1 ml des Reagenz A mit 25 µl des Reagenz B versetzt und die Membran mit diesem Gemisch für 5 min bei RT zwischen zwei Folien inkubiert. Dabei kommt es in der ECL-Lösung, katalysiert durch die HRP, zu einer Reaktion, die zur Freisetzung von Chemilumineszenz führt, die wiederum durch einen Autoradiographie detektiert werden kann (Abbildung 4). Die Membran wurde dazu in einer Filmkassette zwischen zwei Folien platziert und in der Dunkelkammer ein Hyperfilm ECL™ aufgelegt. Je nach Intensität des Signals beließ man den Film für wenige Sekunden bis zu einer Stunde auf der Membran. Nach der Entwicklung des Films stellten sich die durch die Antikörper markierten Proteine als schwarze Banden dar.

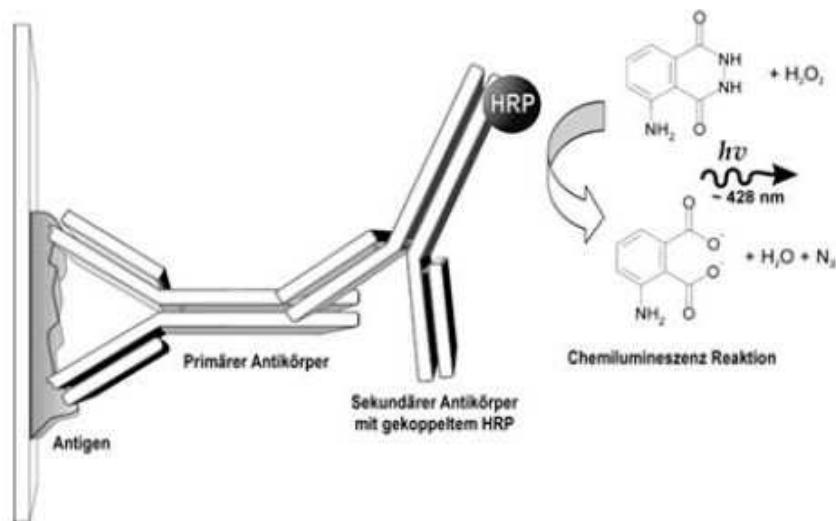


Abbildung 4: Western-Blotting in schematischer Darstellung [59].

2.2.9.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ähnlich wie beim Western-Blotting können auch beim ELISA gelöste Proteine durch eine Antikörper gekoppelte Farbreaktion nachgewiesen werden. Man machte sich hierzu die Methode des sogenannten Sandwich-ELISAs zunutze, bei der das Protein zuerst durch einen Capture Antikörper immobilisiert und anschließend durch einen zweiten Antikörper, dem Detection Antikörper, detektiert wird. An den zweiten Antikörper wird ein Enzym gekoppelt, das ein farbloses Substrat in ein farbiges umwandelt, welches im Anschluss photometrisch nachgewiesen werden kann. Da das farbige Produkt proportional zur Proteinmenge gebunden wird, kann über eine Standardkurve der Proteingehalt bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich ELISA-Kits der DuoSet® Reihe (R&D Systems) verwendet. Der Capture Antikörper wurde laut Protokoll in PBS verdünnt, auf einer 96-Loch-Platte zu je 100 µl pro Well verteilt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte mit jeweils 300 µl Waschpuffer dreimal gewaschen, bevor sie mit Reagent Diluent für eine Stunde blockiert wurde. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Nun konnten sowohl der Standard als auch die Proben pipettiert werden. Der Standard wurde laut Hersteller in Reagent Diluent verdünnt. Die Proben wurden je nach der zu erwartenden Menge des zu bestimmenden Proteins ebenfalls in Reagent Diluent, der auch als Leerwert diente, verdünnt. Es folgte eine weitere Inkubation mit den Proben für 2 h bei RT. Nach einem weiteren Waschschnitt wurde die Platte 2 h mit dem biotinylierten Detection Antikörper inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit HRP-Streptavidin, das über das Streptavidin spezifisch an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet. Nach einem letzten Waschschnitt wurde die Platte mit einer Substratlösung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin inkubiert, in der die HRP die Bildung eines blauen Farbstoffs unterstützt. Nach 20 min wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Stopplösung beendet, wodurch die Farbe von blau nach gelb umschlug. Die Intensität dieser Gelbfärbung wurde im Anschluss mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Eine Korrektur dieser Werte erfolgte durch Subtraktion der jeweiligen Intensitäten bei 540 nm, dem unspezifischen Hintergrundsignal.

Der IL-8-ELISA (BD Bioscience) war nach demselben Prinzip aufgebaut. Der einzig nennenswerte Unterschied lag in der Inkubation mit dem Detection Antikörper und dem HRP-Streptavidin, die hier gleichzeitig erfolgte.

Auch der Insulin-ELISA (Mercodia), der ApoE-ELISA (MBL) sowie der Quantikine® HS Human-IL-6-ELISA (R&D Systems) waren nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut und wurden laut Protokoll durchgeführt.

2.2.9.6 Coomassie-Färbung

Nach dem Westen-Blotting und der Antikörper-Reaktion konnten mit Hilfe der Coomassie-Färbung die aufgetrennten Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden. Durch die unspezifische Bindung des Coomassie an alle Proteine auf der Membran entsteht ein blauer Farbstoff.

Die Membran wurde zuerst kurz in Wasser gewaschen und im Anschluss in Biosafe™ Coomassie (BIORAD) inkubiert, bis sich die gewünschte Farbintensität

eingestellt hat. Danach wurde die Membran erneut in Wasser gewaschen und auf einem Tuch bei RT getrocknet.

2.2.10 Stimulierung von THP-1 Zellen und primären Monozyten

Um die Ergebnisse der OGTT-Versuche möglicherweise durch eine in vitro Stimulation mit Insulin bzw. Glukose simulieren zu können, wurden in vitro Experimente sowohl mit THP-1 Zellen als auch mit primären Monozyten durchgeführt. Nach der Stimulation der Zellen wurden Analysen auf mRNA Ebene durchgeführt. Des Weiteren wurden Untersuchungen mit Hilfe der zellulären als auch der sezernierten Proteine gemacht.

Zur Stimulierung der Zellen wurde jeweils eine definierte Anzahl an Zellen pro Well auf die Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurden zuvor in RPMI 1640-Medium aufgenommen, das jeweils mit 10% Serum versetzt war. THP-1 Zellen wurden mit FCS, primäre Monozyten mit autologem Serum inkubiert. Die THP-1 Zellen konnten im direkten Anschluss stimuliert werden. Die primären Monozyten hingegen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert; am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation im Brutschrank über 2 h.

Die Zellen wurden mit Insulin (1 µM), Glukose (50 mM) oder Insulin und Glukose (1 µM und 50 mM) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollgruppe. Nach einer erneuten Inkubation im Brutschrank über eine, zwei oder drei Stunden wurden sowohl die Zellen als auch die Überstände abgenommen. Die Zellüberstände wurden kurz abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in PBS vom Plattenboden abgeschabt. Schließlich wurden auch diese bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Zellen, aus denen ein Proteinextrakt hergestellt werden sollte, wurden in einer entsprechenden Menge RIPA-Puffer (ca. 40 µl) aufgenommen. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt. Zur RNA-Isolation wurden THP-1 Zellen in RLT-Puffer aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Anthropometrische Daten und Laborwerte der Probanden

Die Probanden, die am OGTT teilnahmen, wurden nach strengen Kriterien ausgewählt, um ein möglichst homogenes Kollektiv hinsichtlich Alter und BMI zu erhalten. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt des OGTT zwischen 21 und 23 Jahre alt; das Durchschnittsalter betrug 22 ± 1 Jahre. Der durchschnittliche BMI lag bei $22.2 \pm 2 \text{ kg/m}^2$, das Gewicht zwischen 55 und 90 kg.

Alle Probanden wiesen Blutzuckerwerte im Normbereich auf. Der Nüchternblutzucker betrug im Durchschnitt $88 \pm 7 \text{ mg/dl}$, der Blutzucker nach 2 h $79 \pm 14 \text{ mg/dl}$ (Referenzwerte s. Tabelle 1). Dies lässt die Aussage zu, dass bei keinem der Teilnehmer eine Insulinresistenz oder eine verminderte Insulinsekretion vorlag. Die meisten der Probanden wiesen sogar einen erniedrigten Blutzuckerspiegel 2 h nach oraler Glukoseaufnahme auf.

Neben dem Glukosespiegel wurden auch die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt. Gemäß dem im Normbereich liegenden Blutzucker stieg die Insulinkonzentration im OGTT signifikant an. Der Nüchterninsulinspiegel lag im Durchschnitt bei $2,4 \pm 1 \text{ mU/l}$, die Insulinkonzentration 2 h nach oraler Glukosebelastung bei $7,4 \pm 3,7 \text{ mU/l}$ ($p \leq 0,000001$) (Abbildung 5).

Die HOMA-Indices der Probanden lagen zwischen 0,27 und 0,98 und somit im Normbereich. Der durchschnittliche HOMA-Index betrug $0,5 \pm 0,2$, was für eine hohe Insulinsensitivität aller Spender spricht.

In Tabelle 2 wurden die Probandendaten nochmals zusammengefasst.

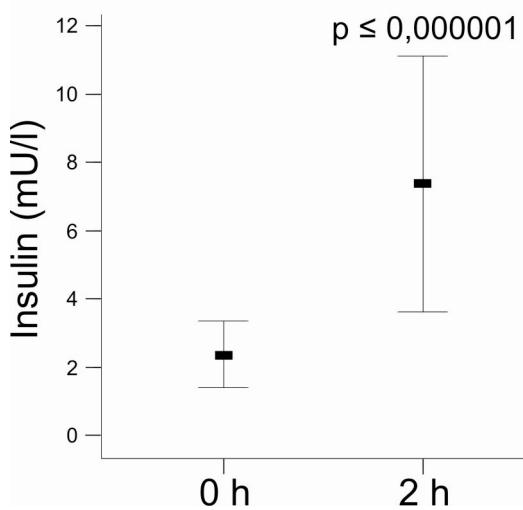


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Insulinkonzentration im Plasma vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

Probanden	Gewicht (kg)	Größe (m)	BMI (kg/m ²)	Glc_0 h (mg/dl)	Glc_2 h (mg/dl)	Ins_0 h (mU/l)	Ins_2 h (mU/l)	HOMA	Geschlecht (M/W)
1	55	1,67	19,7	90	104	4,4	12,1	0,98	W
2	72	1,83	21,5	88	74	1,5	7,4	0,33	M
3	62	1,75	20,2	81	71	3,7	10,6	0,73	M
4	81	1,85	23,7	83	64	2,1	6,1	0,43	M
5	90	1,87	25,7	93	90	3,5	4,5	0,80	M
6	65	1,75	21,2	80	54	3,7	10,5	0,73	W
7	75	1,82	24,2	97	89	1,7	4,2	0,41	M
8	80	1,73	25,1	101	88	1,9	5,1	0,47	M
9	55	1,72	18,6	81	61	2,0	11,5	0,40	W
10	55	1,63	20,7	75	71	1,4	7,5	0,27	W
11	70	1,75	22,9	94	86	1,3	6,4	0,30	M
12	49	1,61	18,9	93	98	3,7	13,3	0,84	W
13	86	1,89	24,1	97	87	1,9	4,7	0,45	M
14	80	1,80	24,7	87	69	1,4	1,6	0,30	M
15	75	1,80	23,1	87	79	1,5	4,3	0,31	M
16	83	1,92	22,5	83	55	1,5	2,3	0,31	M
17	69	1,71	23,6	90	74	1,8	11,5	0,40	W
18	70	1,79	21,8	91	98	2,7	7,1	0,61	M
19	71,5	1,76	23,1	80	91	2,5	13,6	0,49	M
20	75	1,77	23,9	90	78	3,4	3,5	0,76	M
Mittelwerte	70,93	1,77	22,5	88	79	2,4	7,4	0,52	
± SD	11	0,08	2	7	14	1,0	3,8	0,22	

Tabelle 2: Anthropometrische Daten und Laborparameter der Probanden in der Übersicht (SD = Standardabweichung, M = männlich, W = weiblich, Glc = Glukose, Ins = Insulin).

3.2 Der Einfluss oraler Glukosebelastung auf humane Monozyten

Von 20 Probanden wurden Monozyten vor und 2 h nach oraler Glukoseaufnahme isoliert, welche sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene hinsichtlich verschiedener Gene bzw. Proteine analysiert wurden. Da die Monozytenanzahl limitiert war, konnte für jeden Probanden entweder mRNA oder Protein isoliert werden, d.h. es lagen insgesamt zehn mRNA- und zehn Proteinproben vor.

3.2.1 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf NF-κB regulierte Gene im Monozyten

3.2.1.1 Das Chemokin IL-8 (CXCL8)

3.2.1.1.1 Analyse der Monozyten ex vivo

Die relative IL-8 Genexpression wurde mittels LightCycler bestimmt und nahm nach oraler Glukoseaufnahme bei den Probanden signifikant zu. Bei einem 0 h Wert von $17,1 \pm 7,3$ betrug der Wert 2 h nach oraler Glukosebelastung $46,4 \pm 44,2$ ($p = 0,03$) (Abbildung 6 A). Alle LightCycler Werte wurden gegen einen Housekeeper (β -Aktin) normalisiert.

Die IL-8 Konzentrationen in den Proteinproben wurden mittels ELISA gemessen. Dem Nüchternwert von $24,9 \pm 19,7$ ng IL-8/mg Gesamtprotein stand ein 2 h Wert von $27,2 \pm 16,6$ ng/mg gegenüber ($p = 0,35$) (Abbildung 6 B).

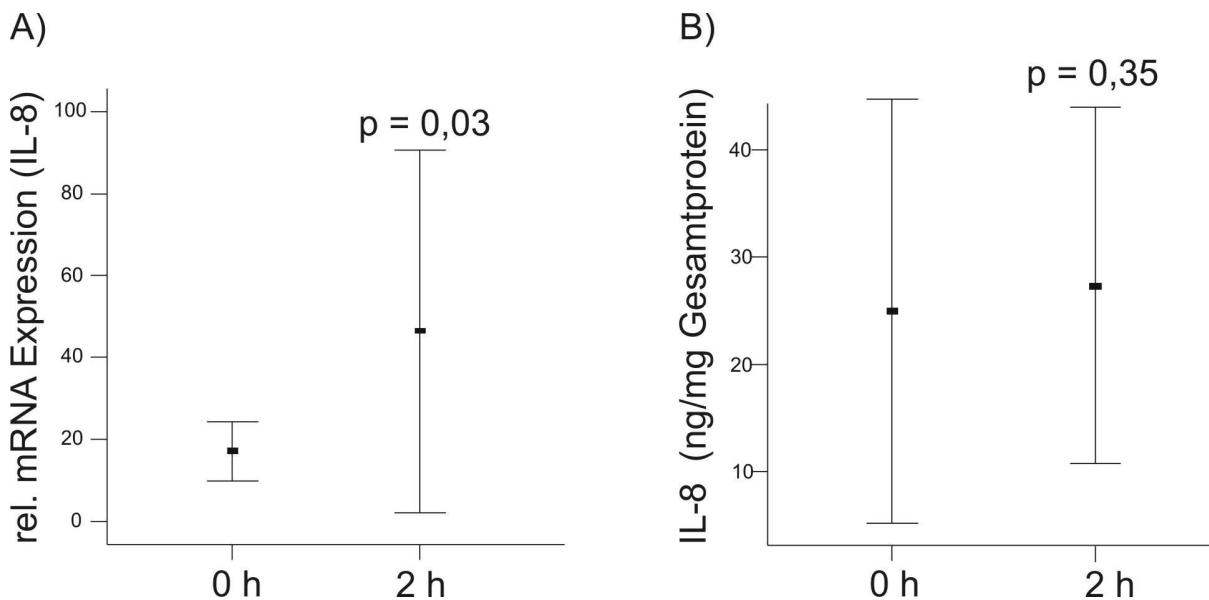


Abbildung 6: IL-8 mRNA und IL-8 Proteinkonzentration in Monozyten isoliert aus Probanden nach 12-stündigem Fasten (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

3.2.1.1.2 In vitro Untersuchungen

Daraufhin wurden weitere in vitro Versuche durchgeführt. Primäre Monozyten wurden jeweils 2 h mit Glukose bzw. Insulin stimuliert und anschließend wurden die IL-8 Konzentration in den Überständen gemessen. Während die Glukosestimulation die IL-8 Sekretion nicht beeinflusste, stieg sie unter Insulinstimulation ausgehend von einem Kontrollwert von 100 % auf 128 ± 11 % an ($p = 0,02$). Auch bei fünf weiteren Spendern ergab sich nach der in vitro Stimulation mit Insulin eine signifikant höhere IL-8 Sekretion ($14,1 \pm 3,8$ ng/ml) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollproben ($8,1 \pm 0,65$ ng/ml) ($p = 0,03$).

Zusätzlich wurde die intrazelluläre IL-8 Konzentration in diesen Monozyten bestimmt, die sich nach Insulinstimulation ($47,7 \pm 10,1$ ng/ml) verglichen mit den Kontrollen ($35,4 \pm 15,7$ ng/ml) nicht signifikant änderte ($p = 0,24$).

Hingegen stieg die relative mRNA Expression von $11,3 \pm 1,9$ in den unstimulierten Kontrollen durch die Insulininkubation auf $24,4 \pm 4,5$ an ($p < 0,001$).

3.2.1.1.3 Der Einfluss von Inhibitoren auf die Insulin vermittelte IL-8 Induktion

Um die an der Induktion von IL-8 beteiligten Signalwege zu identifizieren, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt (s. auch Abbildung 1). Die primären Monozyten dreier Spender wurden mit Insulin, Wortmannin (100 nM) und Rapamycin (10 nM)

stimuliert. Die Ansätze wurden wie folgt inkubiert: unstimuliert (ohne Insulin), mit Insulin (2 h), mit Wortmannin (3 h), mit Rapamycin (3 h) oder mit Insulin für 2 h nach einer einstündigen Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor.

Die IL-8 Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. In den unstimulierten Kontrollen ergab sich eine IL-8 Konzentration von $6,8 \pm 1,8$ ng/ml, in den Insulin stimulierten Proben von $12,3 \pm 3,7$ ng/ml ($p = 0,001$). Die IL-8 Sekretion stieg weder in den mit Wortmannin ($6,7 \pm 3,8$ ng/ml), noch in den mit Rapamycin behandelten Monozyten ($6,6 \pm 1,8$ ng/ml) an. Hingegen konnte ein deutlicher Anstieg der IL-8 Konzentrationen in den Überständen nach simultaner Inkubation der Proben mit Insulin und Wortmannin ($12,1 \pm 1,6$ ng/ml) bzw. Insulin und Rapamycin ($11,5 \pm 0,8$ ng/ml) festgestellt werden, der sich vom Anstieg in den nur mit Insulin stimulierten Proben nicht signifikant unterschied (Abbildung 7 A).

Des Weiteren erfolgte eine Stimulation mit Insulin, PD98059 (50 μ M) (Mechanismus s. Abbildung 1) und mit beiden Substanzen nach einer einstündigen Vorinkubation mit PD98059 für jeweils zwei Stunden. Auch hier stieg die IL-8 Konzentration in den Überständen durch die Insulinstimulation verglichen mit einem Kontrollwert von $8,4 \pm 2,1$ ng/ml auf $24,4 \pm 4,5$ ng/ml signifikant an. Durch eine Inkubation mit PD98059 wurde die basale IL-8 Sekretion nicht beeinflusst, die Insulin stimulierte Sekretion wurde jedoch auf $14,4 \pm 6,3$ ng/ml supprimiert und war somit nicht mehr signifikant gegen die Kontrollen erhöht (Abbildung 7 B).

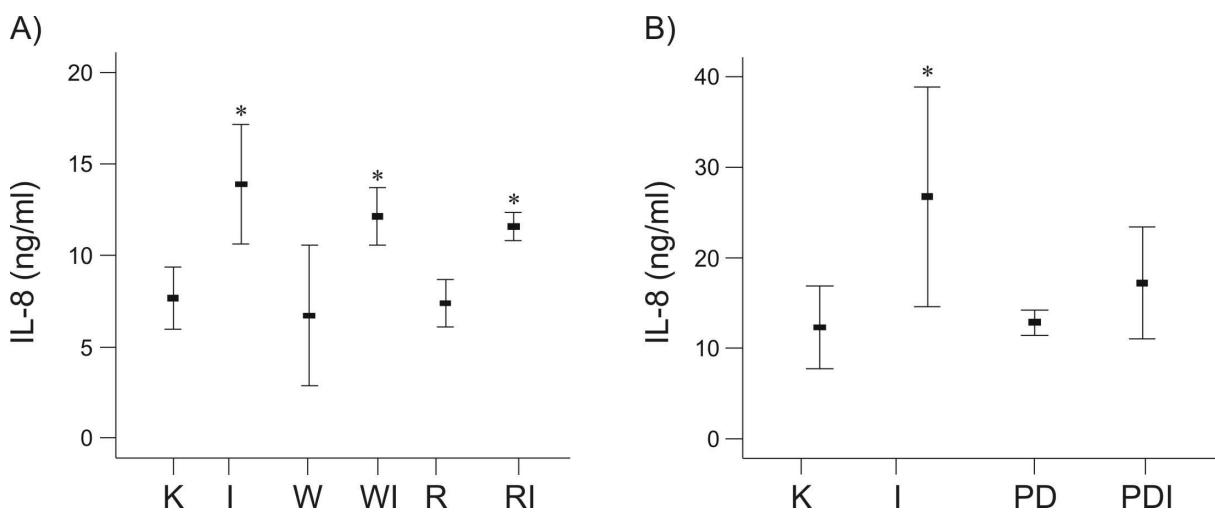


Abbildung 7: Graphische Darstellung der IL-8 Konzentrationen in den Überständen in vitro stimulierter primärer Monozyten (unstimulierte Kontrollen = K).
 (A) Monozyten stimuliert mit Insulin (I), Wortmannin (W), Insulin und Wortmannin (WI) bzw. mit Rapamycin (R) sowie Insulin und Rapamycin (RI).
 (B) Monozyten stimuliert mit Insulin (I), PD98059 (PD), sowie mit Insulin und PD98059 (PDI).

3.2.1.2 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf das Zytokin IL-6 in Monozyten ex vivo und in vitro

Nach oraler Glukosebelastung ergab sich keine Änderung in der IL-6 Genexpression in Monozyten ex vivo. Während die relative mRNA Menge nüchtern bei $0,37 \pm 0,47$ lag, ergab sich 2 h nach oraler Glukosebelastung ein Wert von $0,64 \pm 0,50$. Die LightCycler Werte wurden gegen einen Housekeeper (β -Aktin) normalisiert.

Bei der in vitro Stimulation von Monozyten mit Glukose bzw. Insulin für jeweils 2 h (Spender wie bei IL-8 in vitro Versuchen) konnte mittels ELISA keine signifikante Änderung der IL-6 Konzentration in den Überständen festgestellt werden: Ausgehend von einem Kontrollwert von 100 % wurde 2 h nach Insulinstimulation ein Wert von $112 \pm 31\%$ bestimmt ($p = 0,13$).

Auch die relative mRNA Expression in den in vitro stimulierten Monozyten blieb konstant: Im Vergleich zum Kontrollwert von $1,8 \pm 0,9$ wiesen die mit Insulin behandelten Monozyten einen Wert von $2,3 \pm 0,7$ auf ($p = 0,5$). Auch diese Werte wurden gegen einen Housekeeper (β -Aktin) normalisiert.

3.2.1.3 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf die Superoxide Dismutase 2 (SOD2) in Monozyten ex vivo und in vitro

Auch die SOD2 mRNA wurde durch Real-Time RT-PCR quantifiziert. Bei einem 0 h Wert von $5,5 \pm 2,6$ ergab sich ein 2 h Wert von $7,6 \pm 2,5$ und somit ein signifikanter Anstieg der SOD2 mRNA in Monozyten von Personen 2 h nach oraler Glukoseaufnahme ($p = 0,02$) (Abbildung 8 A). Auch diese Werte wurden gegen einen Housekeeper (β -Aktin) normalisiert.

Das Protein SOD2 wurde durch Immunoblots in acht verschiedenen Spendern untersucht. Im Gegensatz zur mRNA konnte kein signifikanter Anstieg der SOD2 in den Proteinproben bzw. den Monozyten der OGTT-Teilnehmer festgestellt werden (Abbildung 8 B).

Bei in vitro Versuchen mit THP-1 Zellen und Monozyten wurde durch Insulin- bzw. Glukosestimulation weder die SOD2 mRNA, noch das Protein induziert (Abbildung 8 C).

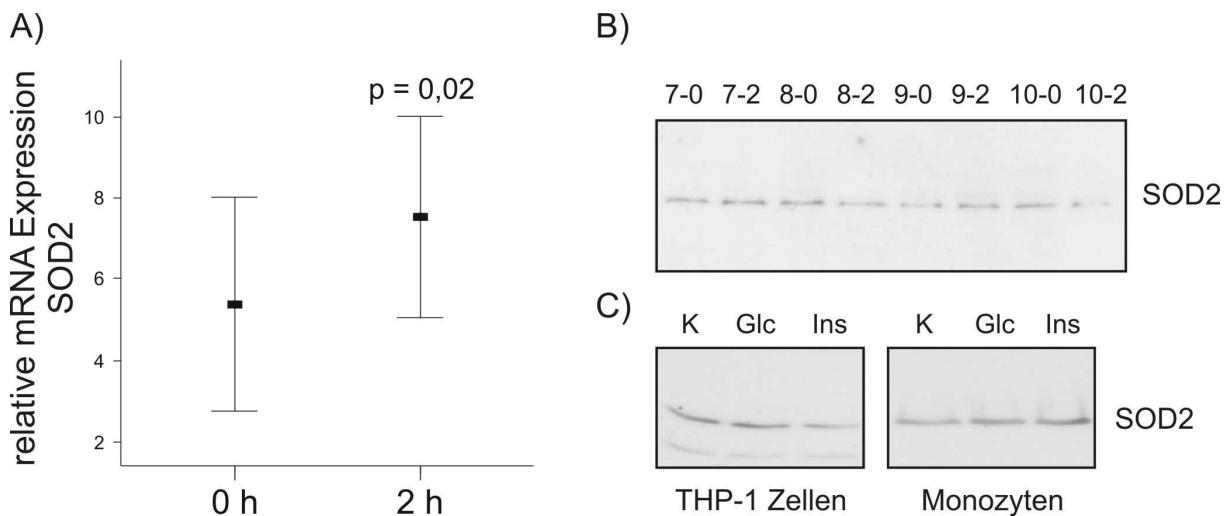


Abbildung 8: (A) Graphische Darstellung der relativen mRNA Expression von SOD2 in Monozyten von Spendern vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.
 (B) und (C) Western Blots mit Anti-SOD 2 Antikörper.
 (B) Monozyten von Spendern (Probanden 7 bis 10) vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.
 (C) in vitro Stimulation von THP-1 Zellen bzw. Monozyten mit Glukose (Glc) und Insulin (Ins) (K = unstimuliert).

3.2.1.4 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Resistin

3.2.1.4.1 Analyse der Monozyten ex vivo

Die Resistin mRNA in Monozyten von Spendern vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung wurde mittels LightCycler bestimmt. Bei einem relativen 0 h Wert von $1,53 \pm 0,40$ ergab sich ein 2 h Wert von $1,42 \pm 0,53$ ($p = 0,13$). Alle Werte wurden gegen einen Housekeeper (β -Aktin) normalisiert. Die Resistin mRNA wurde folglich durch orale Glukoseaufnahme nicht signifikant beeinflusst.

Die Resistinkonzentration in den Proteinproben wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Nüchtern betrug die Resistinkonzentration im Monozyten $14,5 \pm 4.8$ ng/mg Gesamtprotein, während sie 2 h nach der Glukoseaufnahme signifikant auf $19,6 \pm 6,4$ ng/mg anstieg ($p = 0,001$) (Abbildung 9 A).

3.2.1.4.2 In vitro Untersuchungen

Um zu untersuchen, ob der erhöhte Insulinspiegel für den intrazellulären Resistinanstieg verantwortlich ist, wurden weitere Versuche mit THP-1 Zellen durchgeführt. Es erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Insulin in 10 % FCS über 2 h. Während die mRNA durch Insulin nicht beeinflusst wurde (nicht gezeigt), stieg

die intrazelluläre Resistinkonzentration von $69,9 \pm 7$ pg/mg auf 111 ± 19 pg/mg in mit Insulin stimulierten Zellen an ($p = 0,01$). Die Resistinkonzentration in den Überständen der Kontrollen, als auch die in den Überständen der stimulierten Zellen blieb konstant. Daraufhin wurden primäre Monozyten von drei verschiedenen Spendern über 2 h mit Glukose und/oder Insulin inkubiert. Weder die Stimulation mit Insulin ($1\mu\text{M}$), noch mit Glukose (50mM) oder beidem führte zu einem Anstieg der Resistinfreisetzung nach 2 h.

Daher wurden in weiteren in vitro Versuchen THP-1 Zellen jeweils 3 bzw. 6 h mit Insulin bzw. TNF- α (10 ng/ml) als Positivkontrolle stimuliert. Die Resistinkonzentrationen in Zellen und Überständen wurden anschließend mittels ELISA bestimmt. Während die 3 h Inkubation ähnliche Ergebnisse lieferte wie die Stimulation mit Insulin über 2 h (s. oben), stieg die Resistinkonzentration nach 6 h in den Überständen der Insulin stimulierten Zellen stark an: Bei einem Kontrollwert von $2,4 \pm 1$ pg/mg ergab sich für die Insulin stimulierten Zellen ein 6 h Wert von $5,7 \pm 0,4$ pg/mg ($p = 0,001$ verglichen mit den unstimulierten Kontrollen), für die mit TNF- α stimulierten Zellen sogar ein 6 h Wert von $9 \pm 0,2$ pg/mg ($p = 0,00005$ verglichen mit den unstimulierten Kontrollen) (Abbildung 9 B). Die intrazelluläre Resistinkonzentration war nach 6 h in Kontrollen und stimulierten Zellen (Insulin und TNF- α) gleich.

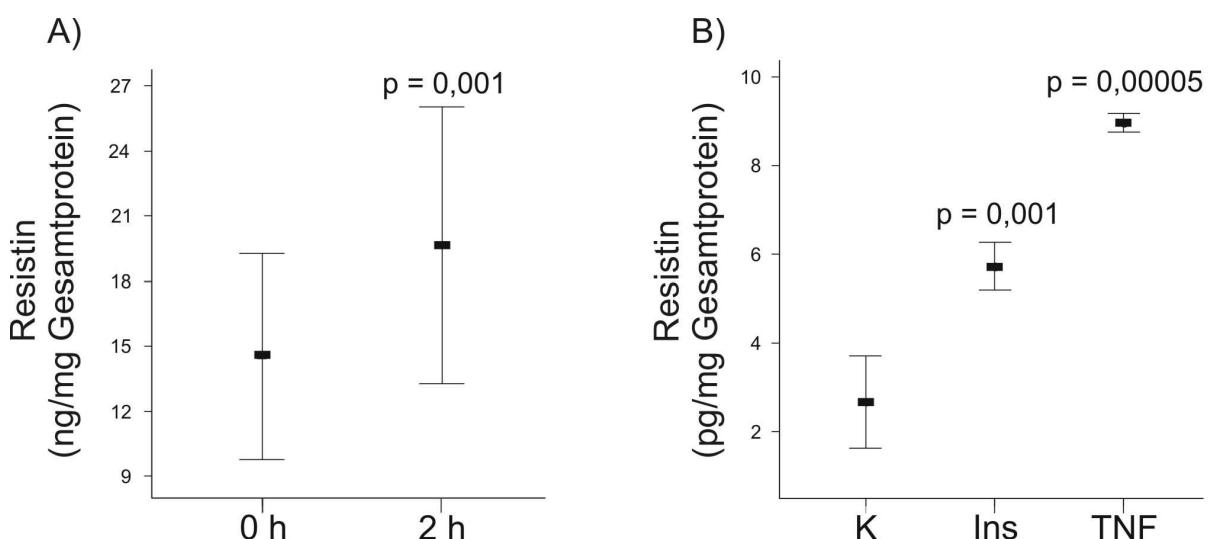


Abbildung 9: (A) Graphische Darstellung der Resistinkonzentration in Monozyten von Spendern vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.
(B) Graphische Darstellung der Resistinkonzentration in Überständen von THP-1 Zellen nach 6 h (K = unstimulierte Kontrollen, Ins = mit Insulin stimuliert, TNF = mit TNF- α stimuliert).

3.2.2 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels

3.2.2.1 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf das Apolipoprotein E (ApoE) in Monozyten ex vivo und in vitro

Im LightCycler konnte eine signifikante Induktion der ApoE mRNA in primären Monozyten 2 h nach oraler Glukosebelastung der Probanden gemessen werden. Dem 0 h Wert von $3,0 \pm 1,8$ stand ein 2 h Wert von $5,0 \pm 4,2$ gegenüber ($p = 0,03$). Diese Werte wurden mit einem Housekeeper (β -Aktin) zuvor normalisiert.

Der ApoE Gehalt in den OGTT-Proteinproben wurde mittels Western Blotting detektiert. Es konnte kein signikanter Unterschied zwischen 0 h und 2 h festgestellt werden.

Auch bei einer in vitro Stimulation humaner Monozyten schienen weder Insulin, noch Glukose oder beide Substanzen gemeinsam über einen Zeitraum von 2 h die Proteinmenge an ApoE signifikant zu beeinflussen (nicht gezeigt).

3.2.2.2 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Flotillin-1 in Monozyten ex vivo und in vitro

Die Flotillin-1 Menge in den Proteinproben wurde durch Immunoblots analysiert. Während bei vier der zehn Probanden die intrazelluläre Menge an Flotillin-1 abnahm (Probanden 7, 8, 10 und 16), nahm sie bei fünf Probanden zu (Probanden 9 und 17 bis 20). Bei einem Spender konnte kein Flotillin-1 detektiert werden (Proband 15) (Abbildung 10).

Die Messung der Genexpression der Flotillin-1 mRNA erfolgte mittels Real-Time RT-PCR. Alle Werte wurden mit einem Housekeeper (β -Aktin) normalisiert. Der relative Nüchternwert von $7,2 \pm 2,1$ fiel 2 h nach oraler Glukosebelastung bei 9 Probanden auf $6,1 \pm 1,6$ signifikant ab ($p = 0,003$) (Abbildung 11). Einzig bei Proband 3 wurde die Flotillin-1 Genexpression nach 2 h leicht induziert. Schließt man auch diese Werte in die Berechnung ein, zeigt sich ebenfalls eine signifikante Suppression der Flotillin-1 mRNA ($p = 0,019$).

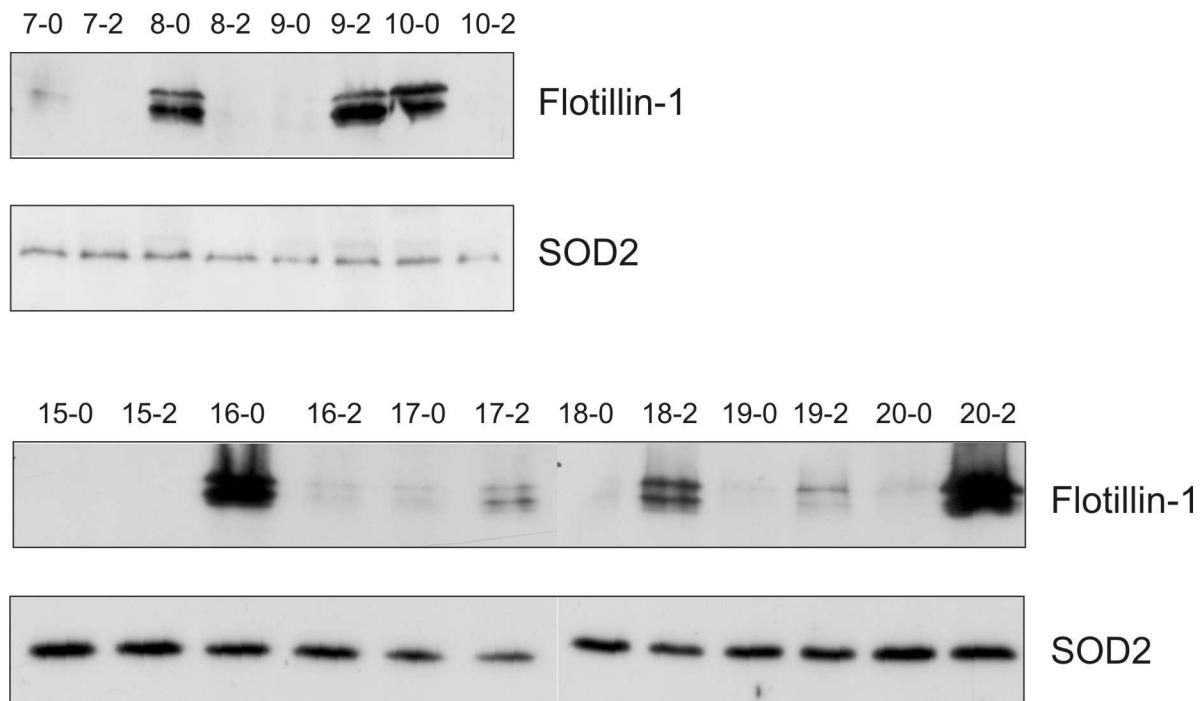


Abbildung 10: Western Blots mit Anti-Flotillin-1 Antikörper und Anti-SOD2 Antikörper zur Ladungskontrolle. Monozyten von den Probanden 7 bis 10 und 15 bis 20 jeweils vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

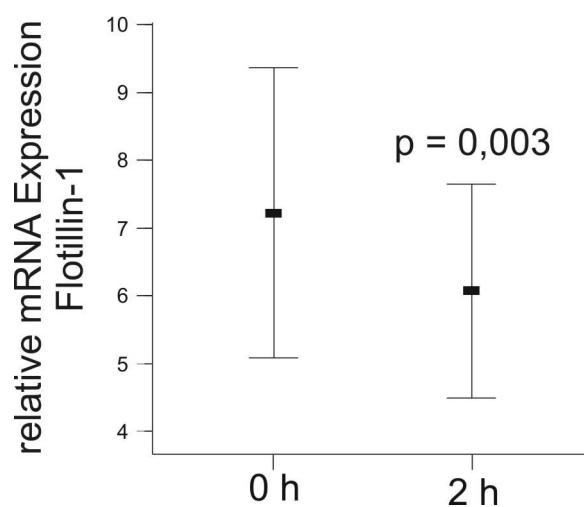


Abbildung 11: Graphische Darstellung der relativen Flotillin-1 mRNA Expression in Monozyten von Spendern vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

Bei der in vitro Stimulation primärer Monozyten mit Glukose und/oder Insulin über 2 h konnte hinsichtlich der intrazellulären Proteinkonzentration im Western Blot kein Unterschied detektiert werden.

THP-1 Zellen wurden ebenfalls mit Glukose und Insulin stimuliert und anschließend die Proteinmenge mittels Immuno Blot bzw. die mRNA mittels LightCycler analysiert. Die mRNA Expression sank hier nach 1 bzw. 2 h leicht ab (jeweils $p = 0,02$), während die Proteinkonzentration konstant blieb.

3.2.2.3 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf die Adiponektin Rezeptoren 1 (AdipoR1) und 2 (AdipoR2) in Monozyten ex vivo und in vitro

Die AdipoR1 bzw. die AdipoR2 mRNA aus den Monozyten der OGTT-Teilnehmer wurde ebenfalls mittels LightCycler vermessen. Hinsichtlich der AdipoR1 Expression ergab sich ein leichter Anstieg des 0h Wertes von $0,90 \pm 0,15$ auf $1,01 \pm 0,20$ 2 h nach Glukosebelastung ($p = 0,03$). Die AdipoR2 Genexpression wurde durch die orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst. Einem 0 h Wert von $0,88 \pm 0,23$ stand ein 2 h Wert von $0,90 \pm 0,22$ gegenüber ($p = 0,38$) (Abbildung 12).

Daraufhin wurde die AdipoR1 Genexpression in vitro untersucht: THP-1 Zellen wurden über 2 h mit Insulin stimuliert. Anschließend folgte eine Analyse sowohl der relativen mRNA- als auch der Proteinmengen. Es ergaben sich jedoch in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den stimulierten Zellen.

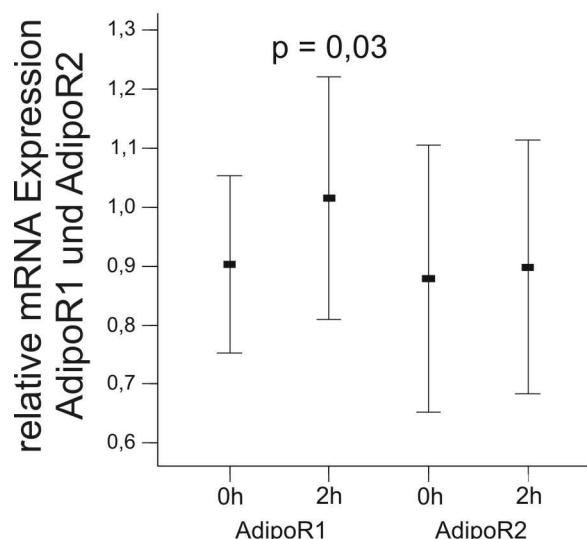


Abbildung 12: Graphische Darstellung der relativen mRNA Expression von AdipoR1 und R2 in Monozyten von Spendern vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

3.2.3 Der Einfluss oraler Glukosebelastung auf die mRNA Expression weiterer Gene im humanen Monozyten

Die folgende Tabelle listet weitere LightCycler-Daten auf. Diese beziehen sich ausschließlich auf mRNA, die im Rahmen des OGTT aus primären Monozyten gewonnen wurde. Somit wurden jeweils zehn Proben untersucht. Da diese Gene weder auf Proteinebene, noch durch in vitro Versuche weiter analysiert wurden, werden deren mRNA Daten hier kurz zusammengefasst. Wie oben schon beschrieben, wurden auch diese Werte jeweils mit dem Housekeeper β -Aktin normalisiert.

Untersuchtes Gen	Wert 0 h	Wert 2 h	t-test
Lipidstoffwechsel			
ABCA 1	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,03	p = 0,005
Adipophilin	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02	p = 0,36
CD36	1,52 ± 0,53	1,45 ± 0,42	p = 0,19
SDHC	0,27 ± 0,05	0,24 ± 0,04	p = 0,04
Chemokine			
CCL2 (10^{-3})	0,97 ± 0,33	1,06 ± 0,73	p = 0,32
CCL4 (10^{-1})	0,36 ± 0,39	0,11 ± 0,12	p = 0,03
CCL5	0,16 ± 0,06	0,13 ± 0,05	p = 0,09
Insulinsignalweg			
PTEN	0,50 ± 0,11	0,59 ± 0,12	p = 0,03
Sonstige			
Annexin A4	0,94 ± 0,10	0,90 ± 0,14	p = 0,16
Calumenin	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,02	p = 0,48
CD86	10,6 ± 2,07	10,2 ± 2,19	p = 0,31
Centaurin	1,64 ± 0,21	1,69 ± 0,15	p = 0,26

3.3 Die Plasmakonzentrationen von Adipokinen und Zytokinen während eines OGTT

3.3.1 Die Plasmakonzentration von Leptin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Bei den 20 Probanden zeigte sich im OGTT eine signifikante Reduktion der Leptinkonzentration im Plasma ($p = 0,0003$) (Abbildung 13). Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA.

Während die Leptinkonzentration nüchtern bei $3,0 \pm 2,8$ ng/ml lag, betrug sie 2 h nach Glukoseaufnahme nur noch $2,5 \pm 2,5$ ng/ml (Abbildung 13). Bei den weiblichen Probanden betrug die Leptinkonzentration nüchtern $6,7 \pm 2,1$ ng/ml, nach 2 h $5,7 \pm 1,9$ ng/ml und war somit nach 2 h signifikant niedriger ($p = 0,0006$). Auch bei den männlichen Studienteilnehmern konnte dieser Effekt gezeigt werden: Während der Leptinspiegel nüchtern noch bei $1,3 \pm 0,5$ ng/ml lag, sank er nach 2 h signifikant auf $1,1 \pm 0,6$ ng/ml ab ($p = 0,0005$). Außerdem konnte durch diese Messung bestätigt werden, dass der Plasmaleptinspiegel bei Frauen höher ist als bei Männern ($p < 0,0001$).

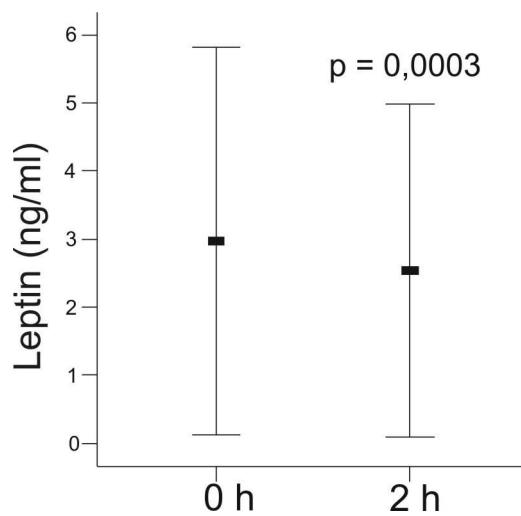


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Leptinkonzentration im Plasma der 20 Probanden vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

3.3.2 Die Plasmakonzentration von Adiponektin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass sich der Adiponektinspiegel im Plasma bei jungen, gesunden Probanden während eines OGTT nicht signifikant verändert ($p = 0,27$): Der Nüchternwert lag bei $13,5 \pm 8,5 \mu\text{g/ml}$, der Messwert nach 2h bei $13,1 \pm 6,7 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 14 A). Jedoch fand sich hinsichtlich der Adiponektinspiegel von Männern und Frauen ein signifikanter Unterschied: Während die Plasmakonzentration nüchtern bei Frauen $21,3 \pm 11,8 \mu\text{g/ml}$ betrug, lag sie bei Männern mit $10,1 \pm 3,4 \mu\text{g/ml}$ deutlich niedriger. Neben diesen Adiponektingesamtkonzentrationen, die mit ELISA-Technik bestimmt wurden, konnten mit Immunoblot auch die HMW-Adiponektinmengen analysiert werden. Die Plasmaproben wurden in SDS-Probenpuffer durch SDS-PAGE aufgetrennt. Bei SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol findet keine Reduktion der Disulfidbrücken des Adiponektins statt und das HMW-Adiponektin wurde detektiert. Andererseits wurden mit SDS-Probenpuffer, der β -Mercaptoethanol enthielt, die Disulfidbrücken im HMW-Adiponektin gespalten, woraufhin eine Detektion von Adiponektinuntereinheiten erfolgen konnte (Dimere, ca. 70 kDa (LMW)). Die Menge beider Adiponektinformen (HMW und LMW) blieb vor und nach Glukoseaufnahme jeweils unverändert (Abbildung 14 B).

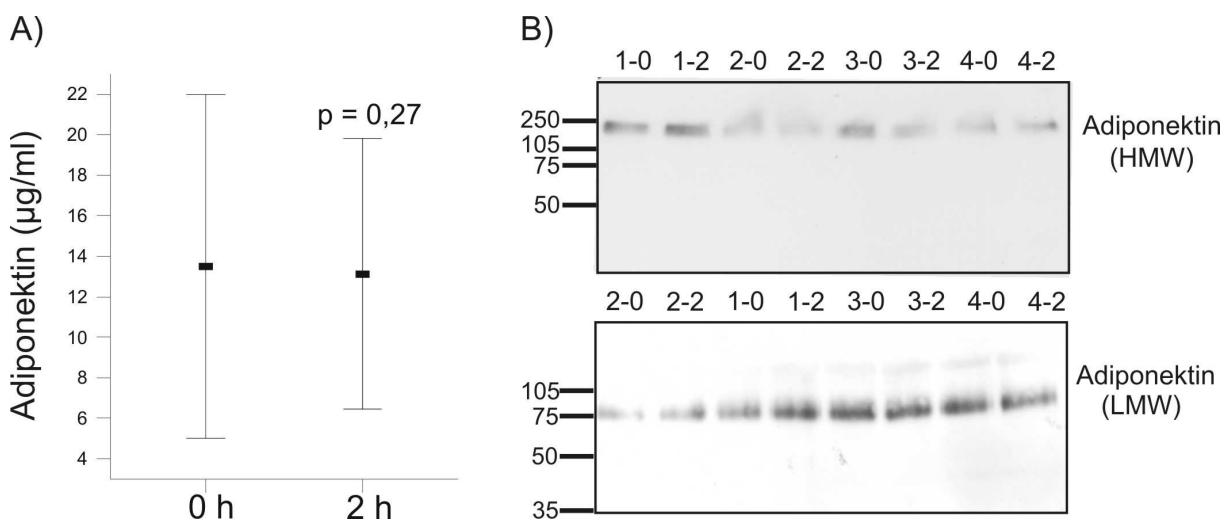


Abbildung 14: (A) Graphische Darstellung der Adiponektinkonzentration im Plasma vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.
(B) Western Blot mit Anti-Adiponektin Antikörper. Dargestellt ist jeweils die HMW- bzw. die LMW-Form des Adiponektins (Probanden 1 bis 4; 0 h und 2 h).

3.3.3 Die Plasmakonzentration von CORS-26 vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Die Detektion von CORS-26 im Plasma erfolgte mit Immunoblots und CORS-26 Antikörpern. Die Spezifität dieser Antikörper wurde mit Hilfe von rekombinantem Adiponektin und rekombinantem CORS-26, beides aus Insektenzellen [46, 49], im Immunoblot sichergestellt: Es wurden jeweils 100 ng beider Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Silberfärbung des Gels zeigte, dass jeweils gleiche Mengen Protein aufgetragen worden waren (Abbildung 15 A). Die Membranen wurden schließlich entweder mit Adiponektin- oder mit CORS-26 Antikörpern inkubiert, wobei jeweils ein spezifisches Signal entstand (Abbildung 15 A). Im Plasma der OGTT-Teilnehmer konnten relativ große Mengen an CORS-26 detektiert werden.

Wie das Adiponektin wurde auch das CORS-26 sowohl im reduzierten Zustand (mit β -Mercaptoethanol) als auch im nicht reduzierten Zustand (ohne β -Mercaptoethanol) analysiert: Nicht reduziert konnte das CORS-26 als HMW-CORS-26 von ca. 180 bis 250 kDa in allen Plasmaproben nachgewiesen werden. Durch die Spaltung der Disulfidbrücken wurde das HMW-CORS-26 in Untereinheiten zu je ca. 50 kDa umgewandelt, die ebenfalls in allen Plasmaproben nachgewiesen werden konnten. In beiden Fällen waren die Mengen an CORS-26 vor und nach Glukoseaufnahme etwa gleich (Abbildung 15 B). Der CORS-26 Plasmaspiegel war bei manchen Probanden niedriger, was jedoch nicht mit dem Geschlecht assoziiert war.

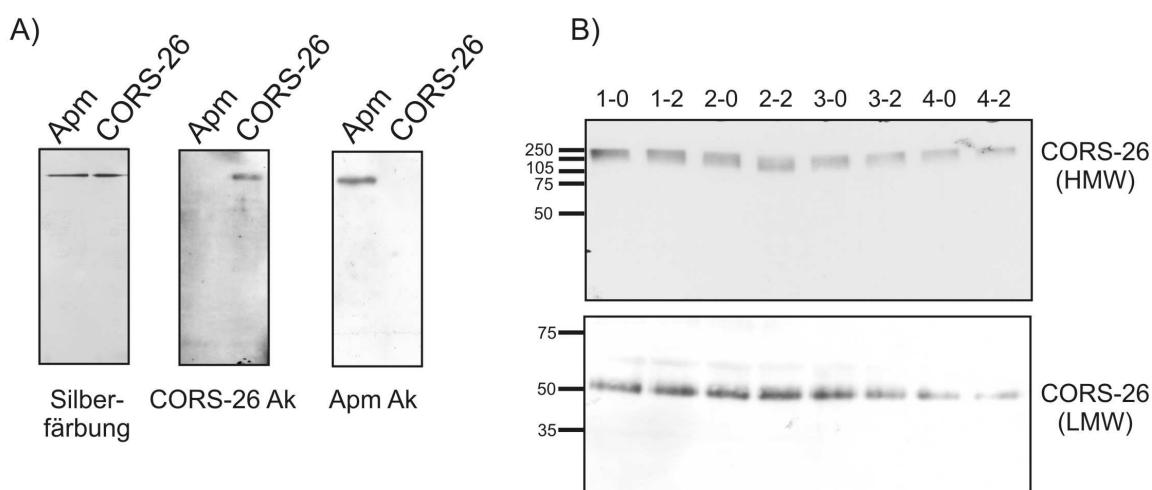


Abbildung 15: (A) Western Blots mit Anti-Adiponektin- und Anti-CORS-26 Ak zur Kontrolle der Spezifität der Ak. Die Silberfärbung diente als Beladungskontrolle. (B) Western Blots mit Anti-CORS-26 Ak. Dargestellt ist jeweils die HMW- bzw. die LMW-Form des CORS-26 (Probanden 1 bis 4; 0 h und 2 h).

3.3.4 Die Plasmakonzentration von Resistin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Der Resistinplasmaspiegel blieb während des OGTT konstant: Nüchtern betrug er $1,77 \pm 0,57$ ng/ml, 2 h nach Glukoseaufnahme $1,77 \pm 0,59$ ng/ml ($p = 0,47$) (Abbildung 16). Bei getrennter Betrachtung von Frauen und Männern verhielt sich die Resistinkonzentration im Plasma ähnlich und blieb konstant. Auch die basale Resistinkonzentration im Plasma wies keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern auf (nicht gezeigt).

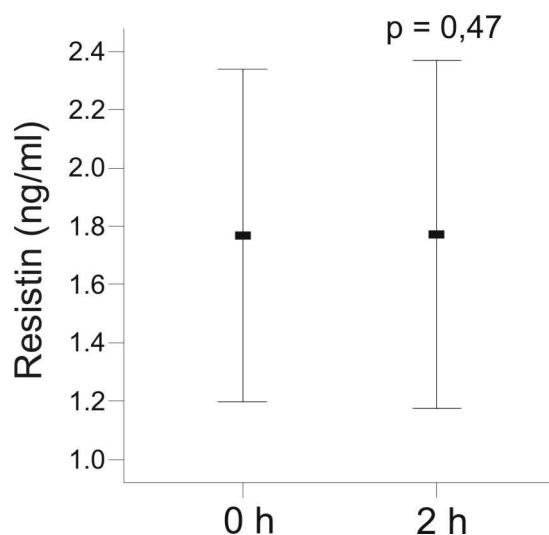


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Resistinkonzentration im Plasma vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

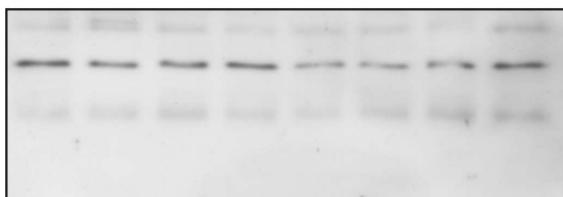
3.3.5 Die Plasmakonzentration von Omentin vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Im Western Blot ließ sich bei jedem Probanden im Plasma eine relativ große Menge an Omentin mit einer Größe von 30 kDa detektieren. Hinsichtlich der Menge waren jedoch keine Unterschiede vor und nach Glukoseaufnahme festzustellen (Abbildung 17 A). Mit einer Verdünnungsreihe konnte gezeigt werden, dass im Immunoblot ein 15%iger Unterschied zweier Probenmengen detektiert werden kann.

Wie bei CORS-26 lassen sich auch bei den Omentinkonzentrationen Unterschiede zwischen den Probanden feststellen. Mit Hilfe der OptiQuanti Software konnte gezeigt werden, dass sich die Omentinplasmaspiegel bis zu einem 54-fachen unterscheiden. Jedoch war auch hier keine Assoziation zum Geschlecht erkennbar (Abbildung 17 B).

A)

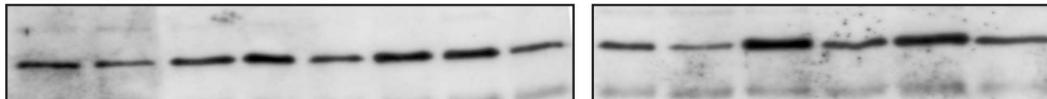
1-0 1-2 2-0 2-2 3-0 3-2 4-0 4-2



Omentin

B)

M4 M8 F9 F10 M11 F12 M13 M14 M15 M16 F17 M18 M19 M20



Omentin

Abbildung 17: (A) Western Blot mit Anti-Omentin Antikörper (Probanden 1 bis 4; Plasma vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung).

(B) Western Blots mit Anti-Omentin Antikörper. Plasmaproben von Spendern unterschiedlichen Geschlechts (M = Männer, F = Frauen).

3.3.6 Die Plasmakonzentration von ApoE vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Die Plasmakonzentration von ApoE sank ausgehend von einem Nüchternwert von 532 ± 58 ng/ml auf 518 ± 66 ng/ml ($p = 0,047$) (Abbildung 18 A). Während bei den weiblichen Probanden keine Abnahme des ApoE Plasmaspiegels zu beobachten war, nahm die ApoE Konzentration im Plasma bei den männlichen Probanden signifikant ab. Sie sank von 535 ± 63 ng/ml auf 513 ± 67 ng/ml ($p = 0,017$) (Abbildung 18 B).

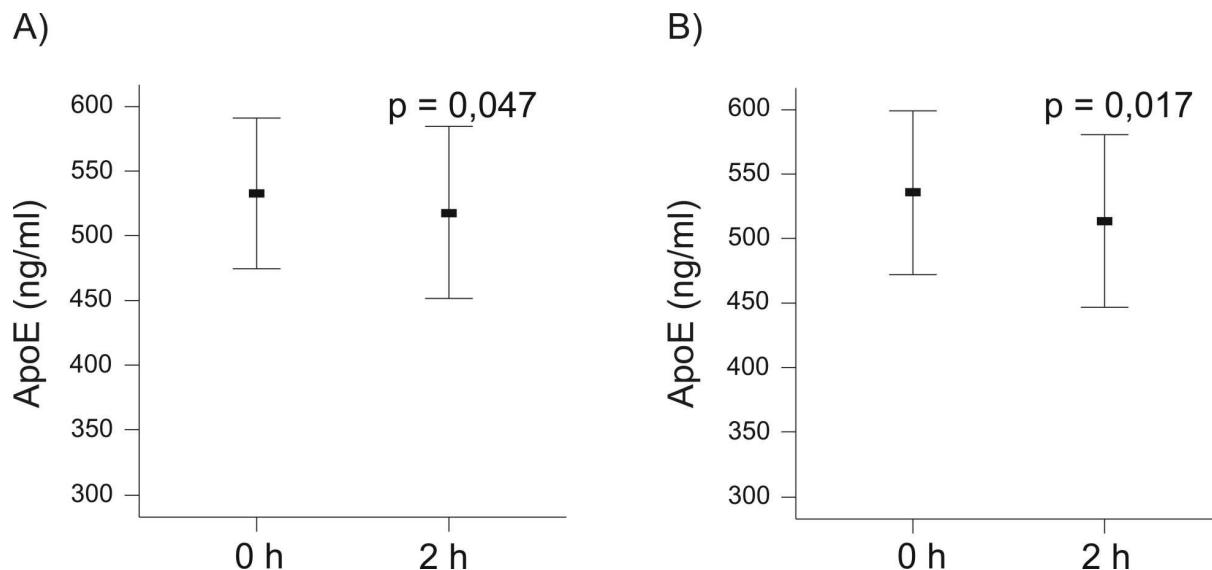


Abbildung 18: Graphische Darstellung der ApoE Konzentrationen im Plasma vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung.
(A) Spender 1-20.
(B) Männliche Probanden.

3.3.7 Die Plasmakonzentration von IL-8 vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Die IL-8 Plasmakonzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich ein verminderter Plasmaspiegel nach oraler Glukosebelastung: Während die IL-8 Konzentration im Plasma nüchtern $7,62 \pm 1,69$ pg/ml betrug, sank sie 2 h nach Glukosegabe auf $5,97 \pm 2,45$ pg/ml ab ($p = 0,005$) (Abbildung 19). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und den weiblichen Probanden festgestellt werden.

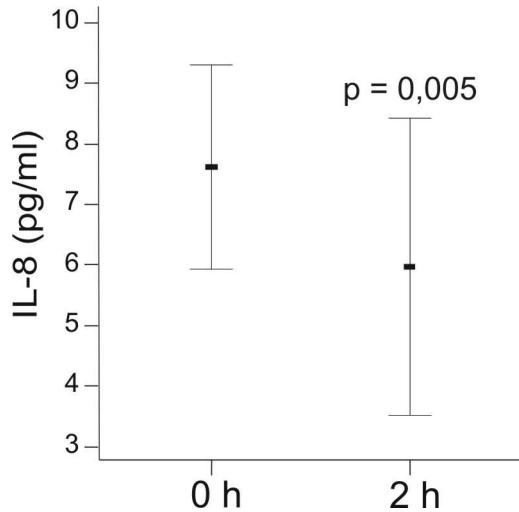


Abbildung 19: Graphische Darstellung der IL-8 Konzentration im Plasma vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

3.3.8 Die Plasmakonzentration von IL-6 vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung

Da die IL-6-Konzentration im Plasma sehr niedrig ist, wurde zur Bestimmung dieser ein hochsensitiver ELISA verwendet. Der IL-6 Plasmaspiegel sank 2 h nach oraler Glukosegabe bei 16 Spendern ab, während er bei 4 Spendern konstant blieb: Für alle 20 Spender ergab sich neben einem 0 h Wert von $0,60 \pm 0,68$ pg/ml ein 2 h Wert von $0,45 \pm 0,68$ pg/ml ($p = 0,003$) (Abbildung 20).

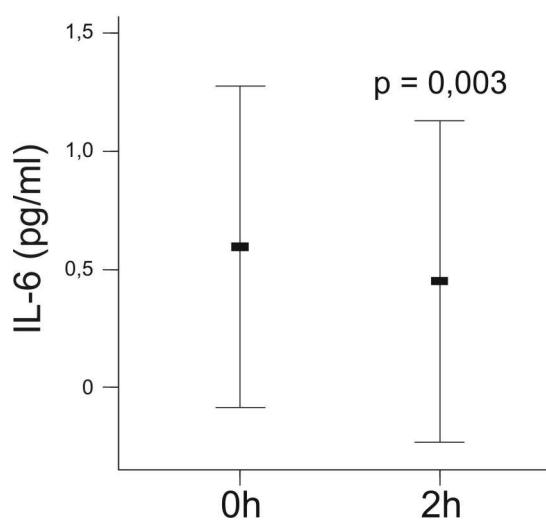


Abbildung 20: Graphische Darstellung der IL-6 Konzentration im Plasma vor (0 h) und 2 h nach oraler Glukosebelastung.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von oraler Glukosebelastung auf monozytäre NF-κB regulierte Gene

Humane Blutmonozyten werden bei oraler Glukoseaufnahme aktiviert, woraufhin die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ansteigt und NF-κB vermehrt in den Zellkern transloziert wird [38, 41]. Daher wurden in dieser Arbeit die Genexpressionen der NF-κB regulierten Gene IL-6, IL-8, SOD2 und Resistin in Monozyten von jungen, insulinsensitiven Probanden vor und 2 h nach einer oralen Glukosebelastung untersucht.

Die Insulinsensitivität konnte anhand des HOMA-Indexes quantifiziert werden. Die HOMA-Indices aller Spender lagen unter 1, was bei keinem der Teilnehmer eine Insulinresistenz oder eine verminderte Insulinsekretion vermuten lässt.

4.1.1 Das Zytokin IL-6 wird durch orale Glukosebelastung im Plasma reduziert, während die Sekretion in Monozyten nicht verändert wird

Die mRNA Expression von IL-6 wurde 2 h nach oraler Glukosebelastung in Monozyten nicht beeinflusst. Dies konnte durch in vitro Versuche bestätigt werden, in denen weder die Stimulation mit Glukose, noch mit Insulin die IL-6 mRNA Expression und die IL-6 Sekretion in Monozyten induzierte bzw. supprimierte.

Hingegen sank die IL-6 Plasmakonzentration 2 h nach oraler Glukosebelastung signifikant ab. Die Reduktion an proinflammatorischem IL-6 im Plasma 2 h nach oraler Glukoseaufnahme könnte die These unterstützen, dass Insulin antiinflammatorische Effekte aufweist [42]. Die mRNA von IL-6 wird aber nicht reguliert, was gegen einen Einfluss von Glukose oder Insulin auf NF-κB spricht. Die Reduktion des IL-6 im Plasma ist jedoch nicht auf eine veränderte Synthese in den Monozyten zurückzuführen.

Denkbar wären eine verringerte Synthese bzw. ein erhöhter Abbau des Plasma IL-6. Da jedoch IL-6 von vielen Geweben freigesetzt wird, ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, genauere Aussagen zu machen.

4.1.2 Orale Glukoseaufnahme induziert die SOD2 mRNA, während das intrazelluläre Protein nicht reguliert wird

Während die SOD2 Genexpression in Monozyten im OGTT induziert wurde, blieb die SOD2 Proteinkonzentration 2 h nach oraler Glukoseaufnahme unverändert. Auch die Stimulation primärer Monozyten oder THP-1 Zellen mit Glukose und Insulin in vitro über 2 h führte zu keiner Veränderung der intrazellulären Konzentration von SOD2.

Postprandiale Hyperglykämien führen nachweislich zu einer vermehrten Produktion an ROS in der Zelle [60], was wiederum die SOD2 stimuliert, die die Zelle vor oxidativem Stress schützt [61]. In dieser Arbeit konnte somit bestätigt werden, dass die Genexpression an SOD2 durch orale Glukosebelastung bzw. postprandiale Hyperglykämien induziert wird, wobei dies nicht zu einer Induktion des Proteins führt.

4.1.3 Das Chemokin IL-8

4.1.3.1 Insulin stimuliert das Chemokin IL-8 (CXCL8) in humanen Monozyten über den MAP-Kinase-Signalweg

Die IL-8 mRNA Expression in Monozyten insulinsensitiver Probanden wurde 2 h nach oraler Glukoseaufnahme induziert. Die intrazelluläre IL-8 Konzentration primärer Monozyten war jedoch nach 2 h im OGTT unverändert. Um die verschiedenen Effekte von Glukose und Insulin differenzieren zu können, wurden Monozyten in vitro mit Glukose und/oder Insulin stimuliert. Während unter Glukosestimulation keine Veränderungen eintraten, wurde nach einer 2-stündigen Inkubation mit Insulin sowohl die IL-8 mRNA als auch die IL-8 Sekretion in die Überstände induziert.

Chronisch erhöhte Glukosespiegel von bis zu 25 mM erhöhen beim Diabetiker die IL-8 Konzentration im Plasma und die Monozytenadhäsion an Endothelzellen [62, 63]. Jedoch liegen bisher noch keine Studien über den Einfluss oraler Glukoseaufnahme auf IL-8 im Monozyten vor. In dieser Arbeit wurden die Monozyten für in vitro Untersuchungen mit 5 mM Glukose stimuliert, was dem Blutzuckerspiegel insulinsensitiver Probanden entspricht [64]. Nach einer Inkubation über 2 h konnte keine veränderte IL-8 Konzentration festgestellt werden. Hingegen induzierte Insulin, das antiinflammatorisch wirken sollte [65], die IL-8 Sekretion humaner Monozyten in vitro.

Neben der oben erwähnten Monozytenadhäsion an Endothelzellen induziert IL-8 auch die Chemotaxis von Neutrophilen zum Entzündungsherd [66]. In jungen, insulinsensitiven Probanden erhöhte sich 2 h nach oraler Glukoseaufnahme die Anzahl neutrophiler Granulozyten um 28 % [67].

Um den Signalweg zu identifizieren, über den Insulin IL-8 und dessen Sekretion induziert, wurden primäre Monozyten mit Insulin und verschiedenen Inhibitoren des Insulinsignalwegs stimuliert. Während sowohl unter dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin als auch unter dem mTOR-Inhibitor Rapamycin die durch Insulin stimulierte IL-8 Induktion anhielt, hob der MEK-Inhibitor PD98059 diese auf. In Monozyten insulinsensitiver Probanden stimuliert demnach Insulin das Chemokin IL-8 über den MAP-Kinase-Signalweg.

4.1.3.2 Die orale Glukoseaufnahme reduziert die IL-8 Plasmakonzentration in insulinsensitiven Probanden

Obwohl die intrazelluläre IL-8 Konzentration in Monozyten nach oraler Glukosebelastung anstieg und die IL-8 Sekretion humaner Monozyten durch Insulin in vitro stimuliert wurde, fand man im OGTT nach 2 h erniedrigte IL-8 Plasmawerte. Dies stimmt mit der Studie von Oostrom et al. überein, in der die IL-8 Konzentrationen 1 h nach Glukoseaufnahme zwar ansteigen, 2 h danach jedoch wieder abnehmen [67].

Jedoch konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass in übergewichtigen Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT), deren systemische IL-8 Konzentrationen im Vergleich zu Normalgewichtigen bereits erhöht sind, nach oraler Glukosebelastung das IL-8 im Plasma weiter ansteigt [64, 68]. Auch bei insulinsensitiven Probanden steigt die IL-8 Sekretion postprandial an, jedoch geringer als bei Patienten mit herabgesetzter Glukosetoleranz (IGT). Diese IL-8 Induktion durch postprandial erhöhtes Insulin bei Patienten mit IGT könnte über den MAP-Kinase-Weg ablaufen, der bei eben diesen Patienten noch nicht gestört ist [69]. Sowohl eine Insulin stimulierte Synthese als auch ein verminderter Abbau von IL-8 könnten zum postprandialen Anstieg der IL-8 Plasmakonzentration führen. Jedoch kann dadurch noch nicht erklärt werden, wodurch der Unterschied zwischen den verschiedenen Studien zustande kommt: Während von Straczkowski et al. eine Induktion der postprandialen IL-8 Sekretion bei insulinsensitiven Probanden publiziert wird, sinkt die IL-8 Plasmakonzentration in dieser Arbeit bei jungen, gesunden Spendern 2 h nach oraler Glukoseaufnahme ab. Eine mögliche Ursache für diese

unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den anthropometrischen Daten der „insulinsensitiven Spendergruppen“ liegen: Während bei Straczkowski et al. das Durchschnittsalter der glukosetoleranten Probanden 41 ± 12 Jahre betrug und deren Ernährungszustand gemäß einem BMI von 34 ± 3 bereits als adipös einzustufen war, waren die Spender in dieser Arbeit mit einem Altersdurchschnitt von 22 ± 1 wesentlich jünger und lagen mit einem BMI von $22,5 \pm 2$ im Normbereich. Da IL-8 positiv mit dem Alter und dem BMI korreliert, könnten die unterschiedlichen anthropometrischen Daten zumindest teilweise die Diskrepanz zwischen den verschiedenen postprandialen IL-8 Konzentrationen erklären.

Darüber hinaus konnte auch in dieser Arbeit bei zwei der 20 Probanden ein postprandialer Anstieg der IL-8 Plasmakonzentration beobachtet werden, welcher jedoch nicht begründet werden kann, da sich diese Probanden hinsichtlich Alter, BMI und Insulinsensitivität nicht vom Rest des Spenderkollektivs unterschieden.

4.1.4 Orale Glukoseaufnahme stimuliert intrazelluläres Resistin in humanen Monozyten, während die Plasmakonzentration unverändert bleibt

Die Aktivierung von NF-κB durch Endotoxine und TNF führt zu einer Induktion der Genexpression und der Sekretion von Resistin in humanen Monozyten [70].

2 h nach oraler Glukosebelastung insulinsensitiver Probanden konnte eine erhöhte intrazelluläre Resistinkonzentration im Monozyten festgestellt werden. Durch eine Insulinstimulation von THP-1 Zellen in vitro wurde ebenfalls eine Induktion des intrazellulären Resistins hervorgerufen, was vermuten lässt, dass Insulin der Grund für den intrazellulären Resistinanstieg im Monozyten ist. Es fiel jedoch auf, dass die intrazelluläre Resistinkonzentration in THP-1 Zellen wesentlich niedriger war als die im humanen Monozyten.

Hyperresistinämie erhöht bei Mäusen sowohl die Blutzucker- als auch die Insulinspiegel, während man unter Resistinmangel niedrige Glukosekonzentrationen im Plasma findet [51]. Des Weiteren führen erhöhte Resistinspiegel in Mäusen zu Dyslipidämie, wozu ein erhöhtes Gesamtcholesterin, erhöhte Triglyzeride und verminderte HDL-Konzentrationen zählen [71]. Obwohl diese Ergebnisse zeigen, dass Resistin auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel von Nagetieren störend einwirkt, bleibt seine Rolle beim Menschen weiterhin unklar. Bisher konnte noch kein Zusammenhang zwischen dem zirkulierenden Resistin und der humanen Glukosehomöostase hergestellt werden. Die systemischen Resistinkonzentrationen

gesunder Kontrollen erwiesen sich sogar signifikant höher als die von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I bzw. Typ II [72]. Jedoch zeigen Patienten im frühen Stadium der Koronaren Herzkrankheit (KHK) erhöhte systemische Resistinspiegel auf [73]. Die proatherogenen Eigenschaften des Resistins wurden auch von Xu W. et al. nachgewiesen: So nehmen Makrophagen unter Hyperresistinämie mehr modifiziertes LDL auf (oxLDL) und exprimieren zugleich vermehrt CD36 mRNA [74]. In dieser Arbeit konnte 2 h nach oraler Glukosebelastung keine veränderte CD36 Genexpression im Monozyten festgestellt werden, obwohl die intrazelluläre Resistinkonzentration im OGTT anstieg.

Während 2 h nach oraler Glukoseaufnahme die intrazelluläre Resistinkonzentration in Monozyten gesunder Spender durch Insulin anstieg, wurde die mRNA Expression nicht induziert. Es liegt daher nahe, dass sich Insulin positiv auf die Resistinsynthese und/oder –stabilität auswirkt. Darüber hinaus könnte eine verminderte Sekretion zu erhöhten intrazellulären Resistinkonzentrationen führen, was jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte: Weder die Resistinkonzentration im Plasma der OGTT-Teilnehmer, noch die in den Überständen Insulin stimulierter THP-1 Zellen bzw. Monozyten sank nach 2 h ab, sondern blieb vielmehr konstant. Auch in Patientinnen mit PCOS konnte 2 h nach oraler Glukosebelastung keine veränderte Resistinkonzentration im Plasma beobachtet werden [75].

4.2 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels

4.2.1 Das Adipozytokin Adiponektin und seine Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2

4.2.1.1 Orale Glukosebelastung induziert die AdipoR1 Genexpression im Monozyten, während die AdipoR2 mRNA unverändert bleibt

Adiponektin ist ein antidiabetisch und antiatherogen wirksames Hormon, das von Adipozyten synthetisiert wird. Es greift an den Adiponektinrezeptoren 1 und 2 an (AdipoR1 und R2) und erhöht so die Fettsäureoxidation und die Glukoseaufnahme in peripherem Gewebe [76], indem es die S6K1 vermittelte Serin-Phosphorylierung am IRS-1 hemmt und somit den Insulinsignalweg induziert [77].

Die mRNA Expression der beiden Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und R2 steigt bei Mäusen nach 48-stündiger Nahrungskarenz in Skelettmuskel- und Leberzellen an und wird nach erneuter Nahrungsaufnahme inhibiert. Auch in vitro fällt die Genexpression nach Insulinstimulation ab. Dies weist darauf hin, dass der postprandiale Adiponektineffekt auf der Rezeptorebene reguliert wird [76].

In dieser Arbeit wurde die Genexpression der Adiponektinrezeptoren 1 und 2 im Monozyten 2 h nach oraler Glukosebelastung analysiert: Während die AdipoR1 mRNA 2 h nach Glukoseaufnahme induziert wurde, blieb die AdipoR2 mRNA unverändert. In vitro konnte hingegen bei THP-1 Zellen durch Insulin und/oder Glukose bei keinem der Rezeptoren eine Induktion der Genexpression beobachtet werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Expression der AdipoR1 mRNA im Makrophagen im Gegensatz zur AdipoR2 mRNA erhöht ist [78]. Dies erklärt jedoch noch nicht, weshalb nach oraler Glukosebelastung nur die AdipoR1 mRNA, nicht aber die AdipoR2 mRNA induziert wird. Es sollten weitere Versuche ex vivo erfolgen, auch auf Proteinebene, die dies nochmals aufgreifen.

4.2.1.2 Die Adiponektinkonzentration im Plasma wird durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst

Während das Adiponektin im Plasma bei Patientinnen mit polyzystischen Ovarien (PCO) im OGTT 2 h nach Glukoseaufnahme signifikant ansteigt [75], bleibt es sowohl bei gesunden, bei glukoseintoleranten Patienten und auch bei Typ II Diabetikern 2 h nach Glukoseaufnahme gleich [75, 79]. In dieser Arbeit wurde das Plasmaadiponektin und dessen Verlauf im OGTT bei jungen, insulinsensitiven Probanden bestimmt, wobei auch hier 2 h nach Glukosegabe keine signifikante Konzentrationsänderung des Adiponektins im Plasma zu beobachten war.

Jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den basalen Adiponektinspiegeln von Männern und Frauen: Die durchschnittliche Adiponektinkonzentration im Plasma vor Glukoseaufnahme war bei den weiblichen Spenderinnen etwa doppelt so hoch als bei den männlichen Probanden. Dieses Ergebnis ist mit anderen Studien vereinbar, in denen dieser geschlechtsspezifische Unterschied bereits gezeigt wurde [80]. Da Adiponektin sowohl antidiabetische als auch antiatherogene und antiinflammatorische Effekte aufweist [75], leitet sich daher womöglich auch das erhöhte Risiko von Männern ab, an Diabetes und Arteriosklerose zu erkranken.

4.2.2 Orale Glukoseaufnahme supprimiert die Flotillin-1 Genexpression und beeinflusst die Flotillin-1 Proteinmenge in humanen Monozyten

Es wurde schon lange vermutet, dass an der Insulin stimulierten Glukoseaufnahme über GLUT4 in die Zelle auch verschiedene Lipide beteiligt sind [81]. Von Baumann et al. wird ein zum PI3-Kinase-Weg alternativer Signalweg beschrieben, an dem unter anderem Flotillin-1 und Lipid Rafts beteiligt sein sollen [5] (s. auch Abbildung 1) und über den GLUT4 ebenfalls insulinabhängig transloziert wird.

Außerdem konnten Lipid Rafts und Flotillin-1 bereits auf monozytären Zelllinien (THP-1 Zellen) nachgewiesen werden [82]. Da jedoch bisher noch keine Daten über den Einfluss oraler Glukoseaufnahme auf die Flotillin-1 Expression im humanen Monozyten publiziert wurden, griff man dies in der vorliegenden Arbeit auf.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Flotillin-1 in humanen Monozyten 2 h nach Glukoseaufnahme reduziert ist. Hingegen verringerte sich die Flotillin-1 Proteinmenge nur bei vier der zehn Spender. Bei fünf

Probanden konnte 2 h nach oraler Glukosebelastung eine größere Proteinmenge an intrazellulärem Flotillin-1 detektiert werden, während bei einem Spender kein Flotillin-1 nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse werfen einige Fragen auf und sind nur zum Teil mit bereits existenten Studien vereinbar: Fecchi et al. untersuchten die insulinabhängige Glukoseaufnahme in die Skelettmuskelzelle [83]. Hierbei wurde vermutet, dass die Glukoseaufnahme durch GLUT4 über zwei zeitlich voneinander getrennt ablaufende Signalwege reguliert wird: Dem PI3K-Weg (2 min nach Insulinstimulation) und dem Weg über Lipid Rafts und Flotillin-1 (5 min nach Insulinstimulation), wobei die intrazelluläre Flotillin-1 Menge vor und nach Insulinstimulation unverändert blieb. Insulin stimulierte die Translokation von Flotillin-1 von perinuklear zur Plasmamembran, woraus ein relativer Anstieg von Flotillin-1 an der Plasmamembran und somit am Wirkort resultierte. Außerdem wurden von Fecchi et al. nur Daten max. 20 min nach Insulinstimulation erhoben. Daher sollten weitere Untersuchungen folgen, die die Auswirkungen von Insulin auf Flotillin-1 nach 2 h sowohl in vitro als auch in vivo näher analysieren.

Durch Flotillin-1 siRNA konnte gezeigt werden, dass die GLUT4 Translokation über Lipid Rafts im Muskel unter Flotillin-1 Mangel reduziert ist [83]. Daher sollten auch in humanen Monozyten Untersuchungen mit Flotillin-1 siRNA durchgeführt werden, um die Rolle des Flotillin-1 in der Insulin stimulierten Glukoseaufnahme in den Monozyten besser einordnen zu können.

4.2.3 Orale Glukosebelastung induziert die ApoE mRNA im Monozyten und verringert die ApoE Plasmakonzentration

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein multifunktionales Protein, das von der Leber und anderen peripheren Zellen, u.a. den Makrophagen, produziert wird [84]. Es wirkt antiatherogen, indem es eine entscheidende Rolle im reversen Cholesterintransport, im Lipoproteinmetabolismus und in der Immunantwort spielt [84]. ApoE-Knockout-Mäuse ($\text{ApoE}^{-/-}$) weisen bereits nach 10 Wochen schwerwiegende arteriosklerotische Läsionen auf [85]. Andererseits reduziert die makrophagenspezifische ApoE Expression arteriosklerotische Herde in $\text{ApoE}^{-/-}$ Mäusen [86]. Die ApoE Expression aus Makrophagen wird durch verschiedene Faktoren reguliert, wozu auch das Insulin zählt: Insulin reduziert sowohl die ApoE mRNA als auch die ApoE Sekretion in humanen hepatozytären Zelllinien (HepG2) in vitro. Jedoch wurde der Einfluss von

Insulin auf die ApoE Expression und Sekretion bisher weder in Adipozyten noch in Monozyten analysiert.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss oraler Glukoseaufnahme auf die monozytäre ApoE Expression und die Plasmakonzentration an ApoE untersucht: Die Genexpression von ApoE wurde 2 h nach oraler Glukosebelastung induziert, während die intrazelluläre Proteinmenge sowohl in Monozyten ex vivo als auch in Monozyten in vitro nach Glukose- bzw. Insulinstimulation im Immunoblot unverändert blieb.

Die ApoE Plasmakonzentration sank 2 h nach oraler Glukosebelastung ab. Betrachtet man Männer und Frauen getrennt, so sinkt der ApoE Plasmaspiegel nur bei Männern, nicht aber bei den weiblichen Probanden.

Ob nun ApoE aus Monozyten, Adipozyten oder Hepatozyten diesen geschlechtsspezifischen Effekt im Plasma bedingt, muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

4.2.4 Orale Glukosebelastung induziert die Genexpression von ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)

Wie ApoE, so ist auch der ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) am reversen Cholesterintransport beteiligt: ABCA1 wird in der Leber und in Makrophagen exprimiert und spielt eine Rolle beim Transfer von Cholesterin und Phospholipiden von peripheren Zellen zum lipidarmen Apolipoprotein A1, was wiederum zur Bildung von HDL-Partikeln führt [87].

In dieser Arbeit wurde ABCA1 im Monozyten auf mRNA Ebene untersucht: 2 h nach oraler Glukosebelastung zeigte sich eine signifikante Induktion der ABCA1 Genexpression in humanen Monozyten. Insulin supprimiert hingegen die ABCA1 mRNA sowohl in primären Hepatozyten der Ratte als auch in HepG2- und THP-1-Zelllinien in vitro [87].

Es fällt auf, dass Insulin die Genexpression einiger am reversen Cholesterintransport beteiligter Mediatoren (ApoE, ABCA1) im Monozyten induziert, während es diese in der Leber supprimiert. Weitere ex vivo Versuche sollten durchgeführt werden, um die Regulation von ApoE und ABCA1 im Monozyten zu klären.

4.3 Der Einfluss von Glukose und Insulin auf die Plasmakonzentrationen weiterer Adipozytokine

4.3.1 Die Leptinkonzentration im Plasma sinkt 2 h nach oraler Glukosebelastung

Es existieren bereits Studien über die Plasmakonzentrationen des Leptins während eines OGTT, wobei sich diese Untersuchungen teilweise widersprechen und es sich außerdem um verschiedene Kollektive handelt: Während sich die Leptinkonzentration im Plasma bei normalgewichtigen Frauen im OGTT nicht verändert [88, 89], steigt sie bei übergewichtigen Frauen an [88, 89] oder bleibt gleich [90]. Bei insulinsensitiven Männern zeigt sich während des OGTT eine Reduktion des Leptins sowohl bei schlanken als auch bei übergewichtigen Probanden; bei insulinresistenten Probanden verändert sich die Leptinkonzentration im Plasma nicht [91].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Leptinplasmaspiegel 2 h nach oraler Glukosebelastung absinkt, was mit den Ergebnissen von Masuo et al. übereinstimmt [91]. Betrachtet man Männer und Frauen getrennt, so sank die Leptinkonzentration im Plasma 2 h nach Glukoseaufnahme in beiden Fällen ab, wobei die basale Leptinkonzentration bei Frauen signifikant höher war als bei Männern. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied entspricht den publizierten Daten von Flanagan et al., die ebenfalls aus einem jungen, gesunden Spenderkollektiv generiert wurden [92], oder auch den Ergebnissen von Kennedy et al. [93], die diesen Unterschied sowohl in normal-, als auch in übergewichtigen Probanden bestätigen.

Auch über die Beziehung zwischen Insulin, Insulinresistenz und Leptin wurden unterschiedliche Ergebnisse publiziert: So konnte man bei *in vitro* Versuchen sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Insulinsekretion durch Leptin beobachten [94]. Bei Hyperinsulinämie wurde die Leptinsekretion aus Adipozyten sowohl stimuliert als auch inhibiert [94, 95]. Auch die Auswirkungen auf die Insulinsensitivität wurden kontrovers diskutiert: Während Leptin die Insulinsensitivität erhöhen soll, soll es gleichzeitig eine Insulinresistenz hervorrufen können [94]. All diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die verschiedenen Patientenkollektive bzw. auf die verschiedenen Mausmodelle in den einzelnen Studien zurückzuführen sein.

Da Leptin jedoch nicht nur an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist, sollten diese sich widersprechenden Daten überprüft und durch zusätzliche in vivo Analysen genauer betrachtet werden. Es sollte nach weiteren Substanzen gesucht werden, die wie Insulin eine Rolle in der Regulation des Leptinspiegels zeigen.

4.3.2 Die CORS-26 Plasmakonzentration wird durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst

Obwohl CORS-26 im Plasma von Mäusen nicht nachgewiesen werden kann [96], konnte es in dieser Arbeit im humanen Plasma junger, insulinsensitiver Probanden mittels Immunoblot detektiert werden. Dabei lag das CORS-26, wie auch sein Strukturhomologes Adiponektin, in seiner HMW-Form vor, nach Denaturierung mit β -Mercaptoethanol in der LMW-Form.

Die CORS-26 Mengen im Plasma waren vor und 2 h nach oraler Glukosebelastung im Immunoblot etwa gleich, jedoch konnten durch dieses Verfahren lediglich Unterschiede ab 15 % detektiert werden. Deshalb sollte der Einfluss der oralen Glukoseaufnahme auf die CORS-26 Plasmakonzentration noch genauer, möglicherweise mittels passender ELISA-Kits, untersucht werden.

Auch zwischen den männlichen und weiblichen Spendern ergab sich kein Unterschied in der CORS-26 Plasmakonzentration.

4.3.3 Die Omentinkonzentration im Plasma wird durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst

Omentin wird v.a. vom viszeralen bzw. omentalen Fett sezerniert und konnte bereits mit Hilfe von Immunoblots im humanen Serum detektiert werden [52], wobei sich die Omentinkonzentrationen im Plasma zwischen den drei Spendern stark unterschieden [52]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die basale Omentinmenge durch orale Glukoseaufnahme nicht beeinflusst wurde, wobei die Plasmakonzentrationen an Omentin auch bei diesen Probanden einen bis zu 50-fachen Unterschied aufwiesen.

Bisher konnte gezeigt werden, dass Omentin die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in humane Adipozyten sowohl des subkutanen als auch des viszeralen Fettgewebes in vitro fördert [52]. Weitere Studien sollten folgen, in denen der Einfluss des Omentins auf die Glukoseaufnahme in vivo näher analysiert wird.

Die großen Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von Omentin zwischen den einzelnen schlanken Probanden erschweren weitere Untersuchungen, in denen die Beziehung zwischen Omentin und der Körperfettmasse analysiert werden soll. Erste Daten weisen bereits auf eine verminderte Omentinexpression in übergewichtigen Spendern hin [53]. Dass Frauen höhere Omentinkonzentrationen im Plasma aufweisen als Männer [53], konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch hier sollten weitere Untersuchungen mit sensitiveren Methoden durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen postprandialer Hyperglykämie und gesteigerter Insulinsekretion auf junge, schlanke Probanden analysiert werden. Hierzu zählen sowohl die systemischen Konzentrationen verschiedener Adipozytokine als auch die Gen- und Proteinexpressionen im Blutmonozyten. Letzteres beinhaltete sowohl NF- κ B regulierte Gene, Gene des Insulinsignalwegs als auch Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels.

Die Plasmakonzentrationen der beiden erst kürzlich identifizierten Adipozytokine CORS-26 und Omentin blieben 2 h nach oraler Glukosebelastung unverändert, was jedoch durch andere Methoden wie einem ELISA nochmals untersucht werden sollte. Andere Plasmakonzentrationen wiesen deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede auf: So waren die Plasmaspiegel an Leptin und Adiponektin bei Frauen signifikant höher als bei Männern, was Unterschiede in der Pathophysiologie von Diabetes und Arteriosklerose teilweise erklären könnte. Der ApoE Plasmaspiegel sank nur bei Männern 2 h nach Glukoseaufnahme ab, während er bei Frauen unverändert blieb.

Vermehrte Glukoseaufnahme in den Blutmonozyten führt zur Erhöhung der ROS und zu einer verstärkten NF- κ B Translokation in den Zellkern. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 2 h nach oraler Glukosebelastung die Genexpression gewisser NF- κ B regulierter Gene wie IL-8 und SOD2 anstieg, während diese bei IL-6 und Resistin unverändert blieb. Die intrazelluläre Proteinmenge dieser Gene verhielt sich im OGTT wie folgt: Die Proteine SOD2, IL-8 und IL-6 wurden nicht reguliert, während das intrazelluläre Resistin anstieg. Hingegen blieb die Resistinsekretion unverändert, was die Vermutung zulässt, dass durch orale Glukosebelastung bzw. Insulinexposition die Resistinstabilität bzw. -synthese gefördert wird, wodurch der intrazelluläre Resistinspiegel ansteigt. Des Weiteren sank sowohl die IL-8 als auch die IL-6 Plasmakonzentration 2 h nach oraler Glukosegabe ab, was auf einen antiinflammatorischen Effekt des Insulins hinweisen könnte. Da Blutmonozyten eine essentielle Rolle in der innaten Immunabwehr und der Arteriosklerose spielen, wurde der Einfluss oraler Glukoseaufnahme in diesen Zellen analysiert.

Da der Insulinsignalweg eng mit dem Lipidstoffwechsel in Verbindung steht, wurden einige dieser Gene untersucht. Adiponektin greift über seine Rezeptoren stimulierend am Insulinsignalweg an und es stellte sich heraus, dass die AdipoR1 mRNA induziert

wird, während die AdipoR2 mRNA unverändert blieb. Dies lässt eine größere Bedeutung von AdipoR1 im Monozyten vermuten. Auch die ApoE mRNA wurde durch orale Glukoseaufnahme im Monozyten induziert, während die ApoE Plasmakonzentration bei Männern sank. Zudem erfolgte eine Induktion der ABCA1 mRNA, was darauf hindeutet, dass orale Glukosebelastung bzw. Insulin den reversen Cholesterintransport im Monozyten fördert.

Flotillin-1, ein Bestandteil membranständiger Lipid Rafts, ist an der Insulin stimulierten Glukoseaufnahme in die Muskelzelle beteiligt [83]. Während die Flotillin-1 mRNA 2 h nach oraler Glukosebelastung bei 9 der 10 Probanden supprimiert wurde, verhielt sich die intrazelluläre Proteinkonzentration an Flotillin-1 wie folgt: Während sie bei 5 Probanden abfiel, stieg sie bei 4 Spendern an. Bei einem Spender konnte kein Flotillin-1 detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Flotillin-1 auch im Monozyten an der Glukoseaufnahme beteiligt ist. Die Rolle des Flotillin-1 in der Insulin stimulierten Glukoseaufnahme scheint jedoch eine andere zu sein, als in der Skelettmuskelzelle und sollte durch weiterführende *in vitro* Untersuchungen identifiziert werden.

Da der humane Blutmonozyt an vielen Pathomechanismen wie der Entstehung der Insulinresistenz und der Arteriosklerose beteiligt ist und diese wiederum eng mit dem Insulinsignalweg und der Glukoseaufnahme in die Zelle in Verbindung stehen, könnten Proteinen wie Flotillin-1 in Zukunft eine entscheidende pharmakologische Bedeutung zukommen.

6 Publikationen

6.1 Erstautorenschaften

S. Wurm, M. Neumeier, J. Weigert, A. Schäffler, C. Buechler,

Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults,

Cardiovasc Diabetol. 6 (2007).

S. Wurm, M. Neumeier, J. Weigert, J. Wanninger, M. Gerl, A. Gindner, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler,

Insulin induces monocytic CXCL8 secretion by the mitogenic signalling pathway.

Cytokine. 44(1) (2008) 185-190.

6.2 Koautorenschaften

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, **S. Wurm**, A. Kopp, F. Schober, M. Filarsky, A. Schäffler, M. Zeitoun, C. Aslanidis, C. Buechler,

Reduced response to adiponectin despite higher abundance of Adiponectin receptor mRNAs in type 2 diabetic monocytes,

FEBS Lett 582 (2008) 1777-1782.

F. Schober, M. Neumeier, J. Weigert, **S. Wurm**, J. Wanninger, A. Schäffler, A. Dada, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, C. Buechler,

Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release,

Biochem Biophys Res Commun 361 (2007) 968-973.

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, F. Schober, D. Sporrer, M. Weber, A. Schramm, **S. Wurm**, F. Stögbauer, M. Filarsky, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler,

Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes,

Cytokine, im Druck.

7 Literaturverzeichnis

- [1] A. R. Saltiel, and C. R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414 (2001) 799-806.
- [2] J. T. Wong, P. T. Kim, J. W. Peacock, T. Y. Yau, A. L. Mui, S. W. Chung, V. Sossi, D. Doudet, D. Green, T. J. Ruth, R. Parsons, C. B. Verchere, and C. J. Ong, Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity, *Diabetologia* 50 (2007) 395-403.
- [3] C. Arenz, M. Thutewohl, O. Block, H. Waldmann, H. J. Altenbach, and A. Giannis, Manumycin A and its analogues are irreversible inhibitors of neutral sphingomyelinase, *Chembiochem* 2 (2001) 141-143.
- [4] G. Xu, W. Zhang, P. Bertram, X. F. Zheng, and H. McLeod, Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors, *Int J Oncol* 24 (2004) 893-900.
- [5] C. A. Baumann, V. Ribon, M. Kanzaki, D. C. Thurmond, S. Mora, S. Shigematsu, P. E. Bickel, J. E. Pessin, and A. R. Saltiel, CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport, *Nature* 407 (2000) 202-207.
- [6] L. A. Sargeant, M. S. Boyne, F. I. Bennett, T. E. Forrester, R. S. Cooper, and R. J. Wilks, Impaired glucose regulation in adults in Jamaica: who should have the oral glucose tolerance test?, *Rev Panam Salud Publica* 16 (2004) 35-42.
- [7] H. J. Woerle, W. P. Pimenta, C. Meyer, N. R. Gosmanov, E. Szoke, T. Szombathy, A. Mitrakou, and J. E. Gerich, Diagnostic and therapeutic implications of relationships between fasting, 2-hour postchallenge plasma glucose and hemoglobin a1c values, *Arch Intern Med* 164 (2004) 1627-1632.
- [8] V. Regitz-Zagrosek, E. Lehmkuhl, and M. O. Weickert, Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease, *Clin Res Cardiol* 95 (2006) 136-147.
- [9] E. Kylin, Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka "mie-Hyperurika" miesyndrom., *Zentralblatt fuer Innere Medizin* 44:105-27. (1923).
- [10] G. Crepaldi, and A. Tiengo, [Hyperlipoproteinemia and diabetes], *Minerva Med* 67 (1976) 290-300.
- [11] B. Balkau, and M. A. Charles, Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), *Diabet Med* 16 (1999) 442-443.
- [12] K. G. Alberti, and P. Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation, *Diabet Med* 15 (1998) 539-553.

-
- [13] Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III), *Jama* 285 (2001) 2486-2497.
- [14] D. Einhorn, G. M. Reaven, R. H. Cobin, E. Ford, O. P. Ganda, Y. Handelsman, R. Hellman, P. S. Jellinger, D. Kendall, R. M. Krauss, N. D. Neufeld, S. M. Petak, H. W. Rodbard, J. A. Seibel, D. A. Smith, and P. W. Wilson, American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome, *Endocr Pract* 9 (2003) 237-252.
- [15] B. Balkau, M. A. Charles, T. Drivsholm, K. Borch-Johnsen, N. Wareham, J. S. Yudkin, R. Morris, I. Zavaroni, R. van Dam, E. Feskins, R. Gabriel, M. Diet, P. Nilsson, and B. Hedblad, Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome, *Diabetes Metab* 28 (2002) 364-376.
- [16] A. H. Mokdad, B. A. Bowman, E. S. Ford, F. Vinicor, J. S. Marks, and J. P. Koplan, The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States, *Jama* 286 (2001) 1195-1200.
- [17] W. Koenig, [Epidemiology of coronary heart disease], *Z Kardiol* 87 Suppl 2 (1998) 3-7.
- [18] J. Liu, A. J. Hanley, T. K. Young, S. B. Harris, and B. Zinman, Characteristics and prevalence of the metabolic syndrome among three ethnic groups in Canada, *Int J Obes (Lond)* 30 (2006) 669-676.
- [19] Neuhauser, Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland: eine Sensitivitätsanalyse, Deutsche Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (gmds), 12. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Epidemiologie. Freiburg im Breisgau, 12.-15.09.2005. Düsseldorf, Köln: German Medical Science; 2005. Doc 05gmds416 (2005).
- [20] F. de Vegt, J. M. Dekker, C. D. Stehouwer, G. Nijpels, L. M. Bouter, and R. J. Heine, The 1997 American Diabetes Association criteria versus the 1985 World Health Organization criteria for the diagnosis of abnormal glucose tolerance: poor agreement in the Hoorn Study, *Diabetes Care* 21 (1998) 1686-1690.
- [21] A. Ceriello, Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat?, *Diabetes* 54 (2005) 1-7.
- [22] K. E. Wellen, and G. S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes, *J Clin Invest* 115 (2005) 1111-1119.
- [23] S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J Clin Invest* 112 (2003) 1796-1808.
- [24] A. Schaffler, J. Scholmerich, and C. Buchler, Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2 (2005) 273-280.

-
- [25] R. Ross, Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med* 340 (1999) 115-126.
- [26] M. Fasshauer, R. Paschke, and M. Stumvoll, Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease, *Biochimie* 86 (2004) 779-784.
- [27] S. Yla-Herttula, B. A. Lipton, M. E. Rosenfeld, T. Sarkioja, T. Yoshimura, E. J. Leonard, J. L. Witztum, and D. Steinberg, Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 5252-5256.
- [28] J. Plutzky, The vascular biology of atherosclerosis, *Am J Med* 115 Suppl 8A (2003) 55S-61S.
- [29] E. Bonora, and M. Muggeo, Postprandial blood glucose as a risk factor for cardiovascular disease in Type II diabetes: the epidemiological evidence, *Diabetologia* 44 (2001) 2107-2114.
- [30] I. M. Stratton, A. I. Adler, H. A. Neil, D. R. Matthews, S. E. Manley, C. A. Cull, D. Hadden, R. C. Turner, and R. R. Holman, Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study, *Bmj* 321 (2000) 405-412.
- [31] J. L. Wautier, E. Boulanger, and M. P. Wautier, Postprandial hyperglycemia alters inflammatory and hemostatic parameters, *Diabetes Metab* 32 Spec No2 (2006) 2S34-36.
- [32] A. Ceriello, E. Falletti, N. Bortolotti, E. Motz, A. Cavarape, A. Russo, F. Gonano, and E. Bartoli, Increased circulating intercellular adhesion molecule-1 levels in type II diabetic patients: the possible role of metabolic control and oxidative stress, *Metabolism* 45 (1996) 498-501.
- [33] A. Ceriello, N. Bortolotti, E. Motz, C. Pieri, M. Marra, L. Tonutti, S. Lizzio, F. Feletto, B. Catone, and C. Taboga, Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia, *Metabolism* 48 (1999) 1503-1508.
- [34] D. B. Kiemer Alexandra K., Mechanismen der Gefäßentzündung: reaktive Sauerstoffspezies als Schädigungs- oder Schutzmechanismus?, Universität des Saarlands.
- [35] R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 1 (2001) 135-145.
- [36] M. Karin, and Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu Rev Immunol* 18 (2000) 621-663.
- [37] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L. H. Glimcher, and G. S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science* 306 (2004) 457-461.

-
- [38] P. Mohanty, W. Hamouda, R. Garg, A. Aljada, H. Ghani, and P. Dandona, Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes, *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 2970-2973.
- [39] X. Li, and G. R. Stark, NFkappaB-dependent signaling pathways, *Exp Hematol* 30 (2002) 285-296.
- [40] F. Gonzalez, N. S. Rote, J. Minium, and J. P. Kirwan, Increased activation of nuclear factor kappaB triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 91 (2006) 1508-1512.
- [41] S. Dhindsa, D. Tripathy, P. Mohanty, H. Ghani, T. Syed, A. Aljada, and P. Dandona, Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells, *Metabolism* 53 (2004) 330-334.
- [42] P. Dandona, A. Aljada, P. Mohanty, H. Ghani, W. Hamouda, E. Assian, and S. Ahmad, Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 3257-3265.
- [43] M. Fasshauer, and R. Paschke, Regulation of adipocytokines and insulin resistance, *Diabetologia* 46 (2003) 1594-1603.
- [44] A. Koerner, J. Kratzsch, and W. Kiess, Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19 (2005) 525-546.
- [45] Y. Okamoto, S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and P. Libby, Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome, *Clin Sci (Lond)* 110 (2006) 267-278.
- [46] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, G. Wehrwein, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, C. Wrede, and C. Buechler, Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells, *J Leukoc Biol* 79 (2006) 803-808.
- [47] T. S. Tsao, H. E. Murrey, C. Hug, D. H. Lee, and H. F. Lodish, Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30), *J Biol Chem* 277 (2002) 29359-29362.
- [48] U. B. Pajvani, M. Hawkins, T. P. Combs, M. W. Rajala, T. Doepper, J. P. Berger, J. A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A. H. Xiang, K. M. Utzschneider, S. E. Kahn, J. M. Olefsky, T. A. Buchanan, and P. E. Scherer, Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity, *J Biol Chem* 279 (2004) 12152-12162.
- [49] J. Weigert, M. Neumeier, A. Schaffler, M. Fleck, J. Scholmerich, C. Schutz, and C. Buechler, The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells, *FEBS Lett* 579 (2005) 5565-5570.
- [50] C. M. Kusminski, P. G. McTernan, and S. Kumar, Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes, *Clin Sci (Lond)* 109 (2005) 243-256.

- [51] R. R. Banerjee, S. M. Rangwala, J. S. Shapiro, A. S. Rich, B. Rhoades, Y. Qi, J. Wang, M. W. Rajala, A. Pocai, P. E. Scherer, C. M. Steppan, R. S. Ahima, S. Obici, L. Rossetti, and M. A. Lazar, Regulation of fasted blood glucose by resistin, *Science* 303 (2004) 1195-1198.
- [52] R. Z. Yang, M. J. Lee, H. Hu, J. Pray, H. B. Wu, B. C. Hansen, A. R. Shuldiner, S. K. Fried, J. C. McLenithan, and D. W. Gong, Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (2006) E1253-1261.
- [53] C. M. de Souza Batista, R. Z. Yang, M. J. Lee, N. M. Glynn, D. Z. Yu, J. Pray, K. Ndubuizu, S. Patil, A. Schwartz, M. Kligman, S. K. Fried, D. W. Gong, A. R. Shuldiner, T. I. Pollin, and J. C. McLenithan, Omentin Plasma Levels and Gene Expression are Decreased in Obesity, *Diabetes* (2007).
- [54] D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner, Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, *Diabetologia* 28 (1985) 412-419.
- [55] A. Kalra, S. Nair, and L. Rai, Association of obesity and insulin resistance with dyslipidemia in Indian women with polycystic ovarian syndrome, *Indian J Med Sci* 60 (2006) 447-453.
- [56] M. Endres, in, 2005.
- [57] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goede, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150 (1985) 76-85.
- [58] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 4350-4354.
- [59] Wikipedia, in, 2006.
- [60] H. Sies, W. Stahl, and A. Sevanian, Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress, *J Nutr* 135 (2005) 969-972.
- [61] G. N. Landis, and J. Tower, Superoxide dismutase evolution and life span regulation, *Mech Ageing Dev* 126 (2005) 365-379.
- [62] S. Srinivasan, M. Yeh, E. C. Danziger, M. E. Hatley, A. E. Riggan, N. Leitinger, J. A. Berliner, and C. C. Hedrick, Glucose regulates monocyte adhesion through endothelial production of interleukin-8, *Circ Res* 92 (2003) 371-377.
- [63] S. Srinivasan, D. T. Bolick, M. E. Hatley, R. Natarajan, K. B. Reilly, M. Yeh, C. Chrestensen, T. W. Sturgill, and C. C. Hedrick, Glucose regulates interleukin-8 production in aortic endothelial cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in diabetes, *J Biol Chem* 279 (2004) 31930-31936.

- [64] M. Straczkowski, I. Kowalska, A. Nikolajuk, S. Dzienis-Straczkowska, M. Szelachowska, and I. Kinalska, Plasma interleukin 8 concentrations in obese subjects with impaired glucose tolerance, *Cardiovasc Diabetol* 2 (2003) 5.
- [65] P. Dandona, A. Chaudhuri, H. Ghannim, and P. Mohanty, Anti-inflammatory effects of insulin and pro-inflammatory effects of glucose: relevance to the management of acute myocardial infarction and other acute coronary syndromes, *Rev Cardiovasc Med* 7 Suppl 2 (2006) S25-34.
- [66] D. G. Remick, Interleukin-8, *Crit Care Med* 33 (2005) S466-467.
- [67] A. J. van Oostrom, T. P. Sijmonsma, C. Verseyden, E. H. Jansen, E. J. de Koning, T. J. Rabelink, and M. Castro Cabezas, Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction, *J Lipid Res* 44 (2003) 576-583.
- [68] M. Straczkowski, S. Dzienis-Straczkowska, A. Stepien, I. Kowalska, M. Szelachowska, and I. Kinalska, Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system, *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 4602-4606.
- [69] Z. Y. Jiang, Y. W. Lin, A. Clemont, E. P. Feener, K. D. Hein, M. Igarashi, T. Yamauchi, M. F. White, and G. L. King, Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats, *J Clin Invest* 104 (1999) 447-457.
- [70] M. Lehrke, M. P. Reilly, S. C. Millington, N. Iqbal, D. J. Rader, and M. A. Lazar, An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans, *PLoS Med* 1 (2004) e45.
- [71] N. Sato, K. Kobayashi, T. Inoguchi, N. Sonoda, M. Imamura, N. Sekiguchi, N. Nakashima, and H. Nawata, Adenovirus-mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice, *Endocrinology* 146 (2005) 273-279.
- [72] A. Schaffler, C. Buchler, U. Muller-Ladner, H. Herfarth, A. Ehling, G. Paul, J. Scholmerich, and B. Zietz, Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Horm Metab Res* 36 (2004) 702-707.
- [73] M. S. Burnett, C. W. Lee, T. D. Kinnaird, E. Stabile, S. Durrani, M. K. Dullum, J. M. Devaney, C. Fishman, S. Stamou, D. Canos, S. Zbinden, L. C. Clavijo, G. J. Jang, J. A. Andrews, J. Zhu, and S. E. Epstein, The potential role of resistin in atherosclerosis, *Atherosclerosis* 182 (2005) 241-248.
- [74] W. Xu, L. Yu, W. Zhou, and M. Luo, Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 351 (2006) 376-382.
- [75] K. C. Lewandowski, K. Szosland, C. O'Callaghan, B. K. Tan, H. S. Randeva, and A. Lewinski, Adiponectin and resistin serum levels in women with polycystic ovary syndrome during oral glucose tolerance test: a significant reciprocal correlation between adiponectin and resistin independent of insulin resistance indices, *Mol Genet Metab* 85 (2005) 61-69.

- [76] A. Tsuchida, T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai, and T. Kadowaki, Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity, *J Biol Chem* 279 (2004) 30817-30822.
- [77] C. Wang, X. Mao, L. Wang, M. Liu, M. D. Wetzel, K. L. Guan, L. Q. Dong, and F. Liu, Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1, *J Biol Chem* 282 (2007) 7991-7996.
- [78] G. Chinetti, C. Zawadski, J. C. Fruchart, and B. Staels, Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR, *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2004) 151-158.
- [79] K. Osei, T. Gaillard, and D. Schuster, Plasma adiponectin levels in high risk African-Americans with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes, *Obes Res* 13 (2005) 179-185.
- [80] R. P. Dullaart, R. de Vries, A. van Tol, and W. J. Sluiter, Lower plasma adiponectin is a marker of increased intima-media thickness associated with type 2 diabetes mellitus and with male gender, *Eur J Endocrinol* 156 (2007) 387-394.
- [81] M. P. Czech, Lipid rafts and insulin action, *Nature* 407 (2000) 147-148.
- [82] N. Li, A. Mak, D. P. Richards, C. Naber, B. O. Keller, L. Li, and A. R. Shaw, Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation, *Proteomics* 3 (2003) 536-548.
- [83] K. Fecchi, D. Volonte, M. P. Hezel, K. Schmeck, and F. Galbiati, Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells, *Faseb J* 20 (2006) 705-707.
- [84] K. Greenow, N. J. Pearce, and D. P. Ramji, The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis, *J Mol Med* 83 (2005) 329-342.
- [85] A. S. Plump, J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setala, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, and J. L. Breslow, Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells, *Cell* 71 (1992) 343-353.
- [86] S. Bellosta, R. W. Mahley, D. A. Sanan, J. Murata, D. L. Newland, J. M. Taylor, and R. E. Pitas, Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice, *J Clin Invest* 96 (1995) 2170-2179.
- [87] M. Sporstol, S. A. Mousavi, W. Eskild, N. Roos, and T. Berg, ABCA1, ABCG1 and SR-BI: hormonal regulation in primary rat hepatocytes and human cell lines, *BMC Mol Biol* 8 (2007) 5.
- [88] M. Bougoulia, T. Tzotzas, H. Efthymiou, G. Koliakos, T. Konstantinidis, A. Triantos, and G. E. Krassas, Leptin concentrations during oral glucose tolerance test

-
- (OGTT) in obese and normal weight women, *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 (1999) 625-628.
- [89] F. Corica, A. Corsonello, R. Ientile, T. De Gregorio, A. Malara, A. Artemisia, and M. Buemi, Leptin and norepinephrine plasma concentrations during glucose loading in normotensive and hypertensive obese women, *Am J Hypertens* 14 (2001) 619-626.
- [90] M. Cakir, R. Sari, O. Tosun, and U. Karayalcin, Leptin response to oral glucose tolerance test in obese and nonobese premenopausal women, *Endocr Res* 31 (2005) 1-8.
- [91] K. Masuo, T. Katsuya, T. Ogihara, and M. L. Tuck, Acute hyperinsulinemia reduces plasma leptin levels in insulin-sensitive Japanese men, *Am J Hypertens* 18 (2005) 235-243.
- [92] D. E. Flanagan, J. C. Vaile, G. W. Petley, D. I. Phillips, I. F. Godsland, P. Owens, V. M. Moore, R. A. Cockington, and J. S. Robinson, Gender differences in the relationship between leptin, insulin resistance and the autonomic nervous system, *Regul Pept* 140 (2007) 37-42.
- [93] A. Kennedy, T. W. Gettys, P. Watson, P. Wallace, E. Ganaway, Q. Pan, and W. T. Garvey, The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure, *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997) 1293-1300.
- [94] R. B. Harris, Leptin--much more than a satiety signal, *Annu Rev Nutr* 20 (2000) 45-75.
- [95] G. J. Mick, X. Wang, C. Ling Fu, and K. L. McCormick, Inhibition of leptin secretion by insulin and metformin in cultured rat adipose tissue, *Biochim Biophys Acta* 1502 (2000) 426-432.
- [96] H. Akiyama, S. Furukawa, S. Wakisaka, and T. Maeda, Cartducin stimulates mesenchymal chondroprogenitor cell proliferation through both extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways, *Febs J* 273 (2006) 2257-2263.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Sylvia Jutta Elisabeth Wurm
Geburtsdatum 25.11.1982
Geburtsort Straubing
Familienstand ledig

Schulausbildung

1989-1993 Grundschule Straßkirchen
1993-2002 Veit-Höser-Gymnasium Bogen,
Abschluss: Abitur, Gesamtnote: 1,6

Hochschulausbildung

2002-2008 Studium der Humanmedizin an der
Universität Regensburg
Herbst 2004 Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote: gut (1,66)
Herbst 2008 Ärztliche Prüfung, Gesamtnote: sehr gut (1,5)

Promotion

2005-2008 Thema: „Einfluss von oraler Glukoseaufnahme auf die
monozytäre Genexpression“,
Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Christa Büchler,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I,
Universität Regensburg

Famulaturen

14.02.-28.03.2005 PD Dr. M. Reng und PD Dr. D. Daller,
Abteilung für Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Bogen
29.08.-12.09.2005 Prof. Dr. K. Taeger, Abteilung für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Regensburg
16.02.-19.03.2006 Dr. Jim Wills, Department of General Surgery,
Manning Base Hospital, Taree, Australien
12.02.-16.03.2007 Jörg Lichte, FA für Allgemeinmedizin,
Allgemeinärztliche Praxis, Hunderdorf bei Bogen

Praktisches Jahr

27.08.-16.12.2007 Prof. Dr. R. Wirsching, Abteilung für Chirurgie,
Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
17.12.07-02.03.08 Prof. Dr. J. Schölmerich,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I,
Prof. Dr. Riegger,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum Regensburg
25.02.-06.04.2008 Prof. Dr. M. Pfeifer, Abteilung für Pneumologie,
Klinik Donaustauf
07.04.-27.07.2008 Prof. Dr. K. Taeger, Abteilung für Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Regensburg
2007-2008 Sprecherin der Studentenschaft im praktischen Jahr

Beruflicher Werdegang

ab 01.01.2009 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom April 2005 bis April 2007 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg. Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich möchte ich mich an dieser Stelle für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit recht herzlich bedanken.

Frau Prof. Dr. Anja K. Bosserhoff danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Christa Büchler für die herzliche Aufnahme und Integration in Ihre Arbeitsgruppe, für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor, für die vielen Erklärungen und Diskussionen, für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für viele gesellige Stunden und für Vieles mehr.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle meinen Laborkollegen Markus, Johanna, Kerstin, Fabian, Franziska, Andrea, Josef, Natalie, Christl und Iris danken, die mich nicht nur durch ihr fachliches Wissen, sondern auch durch zahlreiche lustige und aufmunternde Stunden unterstützt haben.

Des Weiteren danke ich allen Probanden bzw. Blutspendern für ihre freiwillige Teilnahme an den jeweiligen Untersuchungen.

Ein Dankeschön gilt auch Herrn Karl Schneider, dem Vater meines Freundes, für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund Steve bedanken, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und auf die ich stets zählen kann. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Erklärung

"Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt".

Regensburg, 17.12.2008

(Sylvia Wurm)