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

Einfluss von Adiponektin auf die monozytäre Expression von IL-6, Resistin und Aktivin A

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Schober

2009

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD. Dr. Christa Büchler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
Tag der mündlichen Prüfung:	12.März 2010

1 EINLEITUNG 1

1.1 Das Metabolische Syndrom und damit assoziierte Erkrankungen 1

1.1.1 Definition und Prävalenz des Metabolischen Syndroms 1

1.1.2 Adipositas 1

1.1.3 Der Diabetes Mellitus Typ 2 5

1.1.4 Gefäßerkrankungen im Rahmen des Metabolischen Syndroms 7

1.2 Adiponektin als Mitglied der Adipokinfamilie 10

1.2.1 Struktur und Funktion von Adiponektin 11

1.2.2 Die Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 11

1.2.3 Die Rolle des Adiponektins in der Pathogenese des Diabetes Mellitus Typ 2 und der Arteriosklerose 12

1.3 Aufgabenstellung 14

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Material 15

2.1.1 Geräte 15

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 16

2.1.3 Chemikalien 17

2.1.4 Antikörper 18

2.1.5 Kit-Systeme 19

2.1.6 Puffer und Lösungen 19

2.1.7 Primer für LightCycler-Analysen 23

2.1.8 Rekombinantes Adiponektin 24

2.2 Methoden 25

2.2.1 Erstellen einer EDTA-Plasma-Bank männlicher Typ 2 Diabetiker und geeigneter Kontrollen 25

2.2.2 Isolierung humaner peripherer Monozyten aus Vollblut 25

2.2.3 Herstellen von autologem Serum 27

2.2.4 Arbeiten mit cDNA/RNA 27

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen 30

2.2.6 Stimulierung von primären Monozyten 36

2.2.7 Statistik 37

2.2.8 Erstellen eines Fragebogens zur genaueren Charakterisierung der Stoffwechsellage der Probanden 37

3 ERGEBNISSE 38

3.1 AdipoR1- und AdipoR2-mRNA in Monozyten von Typ 2 Diabetikern und Kontrollen und Regulation der Rezeptoren durch Adiponektin 38

3.1.1 Bestimmung der mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in den Monozyten von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 38

3.1.2 Der Einfluß von Adiponektin auf die monozytäre AdipoR1- und AdipoR2-Expression 40

3.2 Basale und Adiponektin-regulierte Sekretion von IL-6 in den drei Kollektiven 41

3.2.1 Die basale IL-6-Sekretion primärer Blutmonozyten von Typ 2 Diabetikern und geeigneten Kontrollen und deren Korrelation zu anthropometrischen und biometrischen Daten der Spender ... 41

3.2.2 Einfluß von HMW- und LMW-Adiponektin auf die monozytäre IL-6-Sekretion 43

3.3 Die Serumspiegel der Adiponektinisoformen und von IL-6 bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 44

3.4 Die Verifizierung der durch GeneChip Analysen identifizierten HMW-Adiponektin-regulierten Gene 48

3.4.1 Der Einfluss von HMW-Adiponektin auf die Expression und Sekretion von Aktivin A und Follistatin durch primäre Monozyten 48

3.4.2 Der Einfluß des HMW-Adiponektins auf die Resistin-Expression und -Sekretion pimärer Monozyten 50

3.5 Bestimmung von Leptin, Resistin, Adiponektin, Aktivin A und Follistatin im Plasma eines Typ 2 Diabetiker-Kollektivs und geeigneten Kontrollen 52

3.5.1 Auswahl der Probanden 52

3.5.2 Der Leptinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 53

3.5.3 Der Resistinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 54

3.5.4 Der Adiponektinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 55

3.5.5 Der Aktivin-A-Spiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 56

3.5.6 Der Follistatinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 56

4 DISKUSSION 58

4.1 Erhöhte mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in den Monozyten von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen ... 58

4.2 Adiponektin erhöht die Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in primären Monozyten in vitro 59

4.3 Erhöhte IL-6-Sekretion bei primären Monozyten von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Probanden im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden 59

4.4 Die monozytäre IL-6-Sekretion nimmt nach Inkubation mit LMW-Adiponektin ab 60

4.5 Serumspiegel von Adiponektin und dessen Isoformen bei Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 61

4.6 Adiponektin erhöht die Aktivin-A-Expression und -Sekretion in primären Monozyten .. 62

4.7 Monozyten exprimieren kein Follistatin 63

4.8 Inkubation mit Adiponektin erhöht die Resistin-Sekretion und -Expression in primären Monozyten 63

4.9 Plasmaspiegel verschiedener Adipokine bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen 64

4.9.1 Erhöhte Leptinplasmaspiegel bei Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen 64

4.9.2 Erhöhte Resistinspiegel bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen 65

4.9.3 Keine signifikanten Unterschiede des Plasmaadiponektins bei Typ 2 Diabetikern und Kontrollen 65

5 ZUSAMMENFASSUNG 67

6 LITERATURVERZEICHNIS 69

7 EIGENE PUBLIKATIONEN 73

Abkürzungsverzeichnis

AdipoR1	Adiponektinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
AK	Antikörper
AMPK	AMP-activated protein kinase
APPL	Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing
APS	Ammoniumpersulfat
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CG1	Control group 1, übergewichtige Kontrollen
CG2	Control group 2, normalgewichtige Kontrollen
CP	Crossing Point
CRP	C-reaktives Protein
CSF1	Colony-stimulating-factor-1
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HDL	High-density Lipoprotein
HMW	High-molecular-weight
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IDF	International Diabetes Federation
IGT	Impaired Glucose tolerance
IKK	Inhibitor der NF-κB Kinase
IL-1ß	Interleukin 1ß
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRC	Insulin requiring for control
IRS	Insulin requiring for survival
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein
LMW	Low-molecular-weight
LPS	Lipopolysaccharid
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MMW	Medium-molecular-weight
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
MyD88	Adaptorprotein myeloischer Differenzierungsfaktor 88
NF-kB	Nuclear Factor κ B
NIR	Non-insulin requiring
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PAI 1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit

PPAR-α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	ReverseTranskriptase- Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
T2D	Typ 2 Diabetiker
TEMED	N, N, N´, N´, - Tetramethylethylendiamin
TGFß	Transforming growth factor ß
TLR 4	Toll-like Rezeptor 4
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WHO	World Health Organization
WHR	Waist-to-Hip-Ratio

1 Einleitung

1.1 Das Metabolische Syndrom und damit assoziierte Erkrankungen

1.1.1 Definition und Prävalenz des Metabolischen Syndroms

Unter dem Metabolischen Syndrom versteht man eine Kombination von Risikofaktoren, die für den Einzelnen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergehen. Einigen konnte man sich dabei auf vier Hauptrisikofaktoren, die in ihrer genauen Abgrenzung aber in den Definitionen der unterschiedlichen Vereinigungen variieren. Sowohl die World Health Organization (WHO), die European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) als auch die International Diabetes Federation (IDF) sehen Glukoseintoleranz, Adipositas, Bluthochdruck und Dyslipidämie mit erhöhtem Triglyzeridspiegel und erniedrigtem Serumspiegel von HDL-Cholesterin als die vier Hauptkomponenten des Metabolischen Syndroms. Uneins dagegen ist man sich sowohl bezüglich der Zugehörigkeit der Insulinresistenz zum Symptomkomplex als auch bei der genauen Definition der Adipositas. Die IDF beispielsweise macht sich allein den Bauchumfang als Kriterium der Adipositas zu Nutzen, während die WHO sich auf die Waist-to-Hip-Ratio (WHR) beruft. Diese Unterschiede in der Definition erschweren es, eine Aussage bezüglich der Prävalenz des Metabolischen Syndroms zu machen. Laut einer Studie der WHO (n = 9140) steigt die Prävalenz in einer europäischen Population mit dem Alter an und hat ihren Gipfel von 32% in der Altersgruppe der 60 bis 69 Jahre alten Männer [1].

1.1.2 Adipositas

1.1.2.1 Definition und Einteilung

Zur Berechnung der Adipositas dient in erster Linie der sogenannte Body Mass Index (BMI). Dabei wird das Gewicht in Kilogramm durch die Körpergröße in Meter zum Quadrat dividiert. Laut Definition umfasst Normalgewicht einen BMI von 18,5 bis 24,9 während man bei einem BMI von 25,0 bis 29,9 von Übergewicht spricht. Adipositas wird in drei Schweregrade unterteilt: Grad I entspricht einem BMI von 30,0 bis 34,9,

Grad II von 35,0 bis 39,9 und ab einem BMI von 40,0 spricht man von Adipositas Grad III beziehungsweise Adipositas per magna oder morbider Adipositas [2].
Diese Abschätzung des Ernährungszustandes mit Hilfe des BMI hat sich zwar als leicht zu berechnende Größe in der Praxis bewährt, wurde aber im Rahmen der Erforschung der Pathogenese des Metabolischen Syndroms immer mehr in den Hintergrund gedrängt. Wie bereits erwähnt nehmen sowohl die IDF als auch die WHO den Bauchumfang beziehungsweise die WHR zu Hilfe um Adipositas als Kriterium des Metabolischen Syndroms zu definieren. Grund dafür ist, dass der BMI nicht die individuelle Fettverteilung zwischen viszeralem und subkutanen Fett berücksichtigt, es sich aber herausgestellt hat, dass gerade die Menge an intraabdominellen Fett stärker als das Gesamtkörpergewicht mit einem erhöhten Risiko für vaskuläre Erkrankungen korreliert. [3]
Die IDF hat deshalb als alleiniges Maß den Bauchumfang, gemessen in der Mitte zwischen Rippenbogen und Hüftschaufeln, eingeführt. Für die westliche Bevölkerung gibt sie hierbei für Frauen einen Grenzwert von $<$ 80 cm und für Männer < 94 cm Bauchumfang als unbedenklich bezüglich der Entwicklung einer stammbetonten Fettsucht und damit einer Komponente des Metabolischen Syndroms an.

1.1.2.2 Das Fettgewebe als Entzündungsmediator und Teil des angeborenen Immunsytems

Verschiedene Versuche sowohl mit tierischem als auch menschlichem Proben haben gezeigt, dass eine Zu- beziehungsweise Abnahme des weißen Fettgewebes zu Veränderungen sowohl in dessen endokriner als auch in dessen metabolischer Funktion führt [3]. Schon 1985 berichteten Nanji et al. über eine positive Korrelation zwischen Körpermasse und peripherer Leukozytenzahl [4].
Später haben eine Vielzahl von Studien herausgefunden, dass ein erhöhter BMI mit einem Anstieg systemisch zirkulierender inflammatorischer Proteine wie etwa dem C-reaktiven Protein (CRP), Interleukin 6 (IL-6), Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1), P-Selektin, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) Fibrinogen, Angiotensinogen und Serumamyloid A3 einhergeht. Dass Adipozyten beziehungsweise weitere Zellen des Fettgewebes wie etwa Makrophagen all diese Proteine produzieren können, legt nahe, dass eine erhöhte Fettmasse an deren systemischen Anstieg beteiligt ist. Vermutet wird hierbei ein Zusammenspiel von

Fettgewebe, Leber und weiteren an Entzündungsprozessen beteiligten Zellpopulationen [5].

Gegen die früher vertretene These, dass alleine die Leber für die angeborene Immunität und die Bereitstellung von Akut-Phase-Proteinen zuständig ist, sprechen laut Berg A. und Scherer P. schon ontologische Gründe[5]. Die Aufteilung des bei Insekten vorhandenen Fettkörpers, der für die angeborene Immunantwort und die Fettspeicherung zuständig war, auf Leber und Fettgewebe kann beim Vertebraten nach deren Meinung nicht als radikale Trennung beider Funktionen angesehen werden. Beweisend hierfür sei zum einen die Fähigkeit des Adipozyten Akut-Phase-Proteine zu exprimieren wie auch das Vorhandensein von Rezeptoren, wie dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4), der ein Reagieren auf bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) ermöglicht. Die Fähigkeit des TLR4 sowohl durch LPS als auch durch gesättigte Fettsäuren aktiviert zu werden, stellt eine Verbindung zwischen entzündlichem Geschehen und dem Metabolismus dar [5]. Für diese Verbindung spricht auch eine Studie von Tsukumo DH et al., die zeigt, dass Mäuse mit einer TLR4 Defizienz sowohl vor einer ernährungsbedingten Adipositas als auch einer Insulinresistenz geschützt sind [6].

1.1.2.3 Die Rolle der Blutmonozyten in der Adipositas

Neben Adipozyten enthält das Fettgewebe auch Fibroblasten, Präadipozyten, Gewebsmakrophagen und Bestandteile des vaskulären Systems [5]. CD14 und CD31 positive Makrophagen machen ca. 10 Prozent der Zellen im Fettgewebe aus. Die Zahl der Makrophagen korreliert sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen positiv mit der Fettgewebsmasse und der Größe der Adipozyten. So konnten Weisberg SP et al. zeigen, dass es durch eine Diät-induzierte Gewichtszunahme zu einer massiven Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe kommt [3]. Der Anteil der Makrophagen im Fettgewebe kann von 10 auf bis zu 60 Prozent steigen [5]. Da sowohl Adipozyten als auch Gewebsmakrophagen zur Phagozytose fähig sind und freie Fettsäuren speichern können, wurde initial vermutet, dass die Vermehrung der Gewebsmakrophagen bei Adipositas durch eine Differenzierung von Präadipozyten zu Makrophagen erklärt werden kann. Weisberg SP et al. wiesen in einem Tierversuch mit Mäusen anhand von chimären Knochenmarksmakrophagen nach, dass die Vermehrung der Makrophagen im Fettgewebe auf das Einwandern von Vorläuferzellen der Knochenmarksmakrophagen zurückzuführen ist [3]. Die

Ursachen für ein vermehrtes Einwandern von Makrophagen vor allem in omentales Fettgewebe haben Harman-Boehm et al. versucht genauer zu beleuchten. So konnten sie eine stärkere Zunahme der Fettgewebsmakrophagen im omentalen im Vergleich zum subkutanen Fett beobachten. Parallel dazu fanden sie einen Anstieg der mRNA von Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP1), ein Chemoattraktant spezifisch für Monozyten und Makrophagen, und der mRNA von Colony-Stimulating-Factor-1 (CSF1), dem wichtigsten Regulator der Makrophagendifferenzierung und –entwicklung. Beide Proteine werden von Adipozyten sezerniert und scheinen somit eine mögliche Erklärung für ein vermehrtes Einwandern von Monozyten in das Fettgewebe und ihre dortige Differenzierung zu Gewebsmakrophagen zu liefern [7].

Wie bereits erwähnt sind Adipozyten in der Lage eine Reihe verschiedener Zytokine und inflammatorischer Proteine freizusetzen. Makrophagen und Adipozyten scheinen synergistisch die inflammatorische Aktivität der jeweils anderen Zelle zu erhöhen. So steigerten nicht aktivierte Makrophagen, die mit einem konditionierten Adipozyten-Medium inkubiert wurden, ihre IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-α) Sekretion massiv [5].

Auch konnte eine positive Korrelation zwischen den systemischen TNF-α und IL-6 Spiegeln und der Adipositas beziehungsweise der Insulinresistenz festgestellt werden. Auffällig ist ferner, dass Makrophagen im Fettgewebe häufig zu mehrkernigen Riesenzellen verschmelzen, wie sie häufig auch an Orten chronischer Entzündungsreaktionen zu finden sind [8].

Generell scheinen Makrophagen im Fettgewebe aktiviert zu sein und mit den Adipozyten gemeinsam eine leichte systemische Entzündungsreaktion zu bewirken. Für diese These spricht auch die Beobachtung, dass die Reduktion des Fettgewebes durch Diät oder Liposuktion einhergeht mit der Verminderung systemischer Entzündungsmarker wie IL-6, CRP, PAI 1, TNF-α, P-Selectin, VCAM-1 und IL-8. Dies wurde sowohl bei Männern als auch bei Frauen unabhängig vom Alter und BMI dokumentiert [5].

1.1.3 Der Diabetes Mellitus Typ 2

1.1.3.1 Pathogenese des Typ 2 Diabetes Mellitus

Pathogenetisch spielen beim Typ 2 Diabetes Mellitus zwei Störungen eine Rolle. Zum einen kann eine Dysfunktion der postprandialen Insulinsekretion mit einer damit verbundenen postprandialen Hyperglykämie im Vordergrund stehen, zum anderen kann eine Insulinresistenz im peripheren insulinabhängigen Gewebe, wie etwa der Skelettmuskulatur, dominierend sein. Häufig finden sich Mischformen aus beiden Störungen [2].

Der Begriff der Insulinresistenz wurde zum ersten Mal 1936 in Bezug auf Patienten gebraucht, die einer sehr hohen Insulindosis bedurften. 50 Jahre später tauchte der Terminus erneut auf als Gerald Reaven 1988 Insulinresistenz zusammen mit Hyperinsulinämie, Glukoseintoleranz, erhöhten Triglyzeriden, erniedrigtem HDL-Cholesterin und Bluthochdruck als Syndrom X definierte [1].

Die Mehrzahl der Typ 2 Diabetes Mellitus Erkrankungen entwickeln sich auf dem Boden des Metabolischen Syndroms. Hierbei kommt es durch eine Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe zu erhöhten Insulinspiegeln. Diese wiederum bewirken ein verstärktes Hungergefühl und legen somit den Grundstein zur Entwicklung einer Adipositas. Gleichzeitig führt ein dauerhaft erhöhter Insulinspiegel zur Herunterregulation von Insulinrezeptoren im peripheren Gewebe, was wiederum zu einer Erhöhung des Insulinspiegels und somit zu einem Circulus vitiosus führt. [2].

1.1.3.2 Diagnostische Kriterien und Klassifikationen des Diabetes Mellitus Typ 2

1997 wurden letztmals während des Amerikanischen Diabeteskongresses in Boston neue Kriterien zur Diagnose eines Diabetes Mellitus Typ 2 vorgestellt und 1999 auch von der „Internationalen Diabetes Federation (Europäische Region)“ wie folgt publiziert:

Von einem Diabetes Mellitus Typ 2 spricht man hiernach bei Vorliegen einer der drei folgenden Kriterien [9]:

1. Vorliegen einer Plasmaglukose von ≥ 126 mg/dl nach fehlender Kalorienzufuhr für wenigstens acht Stunden.
2. Vorliegen einer 2 h Plasmaglukose ≥ 200 mg/dl während eines oralen Glukosetoleranztests (OGTT) durchgeführt nach WHO-Richtlinien mit 75 g Glukose, aufgelöst in Wasser.
3. Symptome des Typ 2 Diabetes und Vorliegen einer Plasmaglukose > 200 mg/dl gemessen zu einem beliebigen Zeitpunkt. Die klassischen Symptome des Diabetes sind hierbei: Polyurie, Polydypsie und sonst nicht zu erklärender Gewichtsverlust.

Eine neue Klassifikation des Diabetes nach dem klinischen Schweregrad wurde im Jahr 2000 von der WHO erarbeitet. Hiernach werden Patienten mit Diabetes in vier Gruppen unterteilt: [2]

1. IGT: Impaired Glucose tolerance = Patienten mit gestörter Glukosetoleranz
2. NIR: Non-insulin requiring = nicht-Insulin-abhängige Diabetiker
3. IRC: Insulin requiring for control = Typ 2 Diabetiker, die orale Antidiabetika und Insulin benötigen
4. IRS: Insulin requiring for survival = Typ 1- und Typ 2-Diabetiker ohne eigene Insulinproduktion

1.1.3.3 Insulinresistenz im Rahmen einer systemischen Entzündung

Als ersten gelang es Hotamisligil et al. und Karasik et al. zu zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin TNF-α eine Insulinresistenz bewirken kann [10; 11]. Die Erkenntnis, dass Adipozyten eine Substanz sezernieren, die zu einer systemischen Reaktion führen kann, induzierte zahlreiche Studien, die sich auch mit der Erforschung der systemischen Effekte anderer von Adipozyten sezernierter Proteine beschäftigten. Diese Proteine werden als Adipokine bezeichnet, als Beispiele sind unter anderem Leptin, Adiponektin, IL-6, und MCP1 zu nennen [8].
Wie bereits oben beschrieben ist die Adipositas zum Teil bedingt durch das vermehrte Einwandern von Makrophagen in das Fettgewebe mit der Induktion vieler Zytokine und somit einer subakuten systemischen Entzündungsreaktion assoziiert. Vieles deutet darauf hin, dass diese Entzündungsreaktion Ausgangspunkt für die

Entwicklung der Insulinresistenz und somit des Typ 2 Diabetes Mellitus sein könnte. Zur Entstehung dieser Theorie beigetragen hat auch die schon vor über hundert Jahren gewonnene Erkenntnis, dass durch die Anwendung von Salizylaten bei Patienten mit einem mild ausgeprägten Diabetes Mellitus Typ 2 die Glukosurie deutlich abnahm. Salizylate inhibieren sowohl die Inhibitor of NF-κB Kinase (IKKβ) wie auch direkt den Transkriptionsfaktor NF-κB, die im Adipozyten und Makrophagen zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Mediatoren führen [8]. Zusammen mit der Erkenntnis, dass gesättigte Fettsäuren an TLR4 binden und über diesen den NF-κB Signalweg induzieren, kann man vermuten, dass ausgehend von Adipositas bzw. einer systemischen Entzündungsreaktion über diesen Mechanismus eine Insulinresistenz und somit der Typ 2 Diabetes Mellitus entstehen könnte. Auch die Erkenntnis, dass eine gesteigerte Fettakkumulation in Skelettmuskulatur und Leber, den so genannten ektopen Fettdepots, die Entstehung einer Insulinresistenz fördert, spricht für eine Dysfunktion des Fettgewebes bei der Pathogenese der Insulinresistenz [12].

1.1.4 Gefäßerkrankungen im Rahmen des Metabolischen Syndroms

1.1.4.1 Prävalenz und Pathogenese

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) als häufige Manifestationsform der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien und die dadurch ausgelöste Myokardischämie ist in den Industrieländern heute die häufigste Todesursache. Die Lebenszeitprävalenz an einer KHK zu erkranken beträgt in Deutschland für Männer 30% und für Frauen 25%. Andere wichtige Manifestationen der Arteriosklerose sind die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), das Auftreten von Aortenaneurysmen und Stenosen der Arteria carotis und damit verbundene ischämische Schlaganfälle [9].

Das Vorliegen eines Metabolischen Syndroms mit den Komponenten einer arteriellen Hypertonie, einer Low-density Lipoproteine-Cholesterin (LDL) Erhöhung und einer High-density Lipoproteine-Cholesterin (HDL) Erniedrigung zählt laut der Leitlinien der International Atherosclerosis Society zusammen mit Nikotinabusus, einer positiven Familienanamnese und dem Vorliegen eines Diabetes Mellitus zu den Hauptrisikofaktoren [2].

Das Auftreten einer Arteriosklerose der Gefäßwand entsteht zunächst aus einer Schädigung des Intimaendothels. Das Intimaendothel spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Als Ursachen für eine Endothelschädigung hat man bis heute lokale Entzündungsreaktionen, eine Gewebshypoxie, das Auftreten von übermäßigen Scheerkräften, das Vorliegen einer Hyperglykämie, Nikotinabusus und erhöhtes Fibrinogenvorkommen ausmachen können. Durch die Schädigung des Endothels kommt es zu einer Störung der vaskulären Homöostase und zur Entstehung eines pothrombotischen und proinflammatorischen Zustands der Endothelzellen. Kennzeichnend dafür sind eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation, eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine, eine verstärkte Sekretion chemotaktischer Substanzen mit Wirkung auf Leukozyten und einer Hyperadhäsivität des Endothels besonders für Monozyten [13].

Dieser als endotheliale Dysfunktion bezeichneter Zustand stellt den noch reversiblen Beginn der Bildung atheromatöser Plaques dar. In der sich anschließenden inflammatorischen Phase adhärieren die Monozyten am Gefäßendothel, durchwandern es und differenzieren zu Makrophagen. Durch die vermehrte Aufnahme von Lipiden werden sie dann zu sogenannten Schaumzellen, die man im Verbund als „Fatty Streaks“ bezeichnet. Diese „Fatty Streaks“ und die vermehrt einwandernden Zellen bewirken eine Proliferation und Transformation der glatten Gefäßmuskelzellen. Sie verlieren ihre kontraktilen Eigenschaften und sezernieren große Mengen an Kollagen und Glykoproteinen, aus welchen sich eine fibröse Kappe über den „Fatty Streaks“ bildet. Diese als Intermediärläsion bezeichnete fibrösfettige Plaque stellt zunächst als eine Art Narbengewebe die Funktionalität der Gefäßwand wieder her. In der Folge kann es jedoch zu Einrissen dieser Plaques kommen. Die durch den Einriss freiliegenden kollagenen Fasern aktivieren Thrombozyten und fördern somit die Thrombenbildung. Diese Thromben können sich lösen und im nachfolgenden Stromgebiet Gefäßverschlüsse, also ischämische Infarkte, bewirken [9].

1.1.4.2 Die Entstehung von Arteriosklerose im Rahmen einer systemischen Entzündung

Die schon lange vor der Manifestation einer Myokardischämie auftretenden systemischen Entzündungsreaktion hat man lange Zeit als Reaktion des Körpers auf eine vermehrte Atherombildung interpretiert. Die Erkenntnis, dass Patienten mit einem vorbestehenden Entzündungsgeschehen schon in jungem Alter ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankung haben, hat diese Kausalität jedoch in Frage gestellt. [5]. Wie schon bei der Pathogenese der Insulinresistenz beschrieben und in Abbildung 1 zusammenfassend dargestellt, wird auch hier vermutet, dass diese systemische Entzündungsreaktion das fehlende Glied zwischen Adipositas und den damit verbundenen Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes Mellitus, Hypercholesterinämie, Hyperkoagulabilität und Thrombozytenfehlfunktion sein könnte [8]. Studien konnten außerdem zeigen, dass viele der an der Entzündungsreaktion beteiligten Mediatoren auch an den Mechanismen, die zur Gefäßwandschädigung und zur Bildung atheromatöser Plaques führen, mitwirken. Wie bereits erwähnt sind die Adipozyten an der Sekretion beziehungsweise an der Induktion der Bildung dieser Mediatoren, wie etwa IL-6 und TNF-α, maßgeblich beteiligt [5].

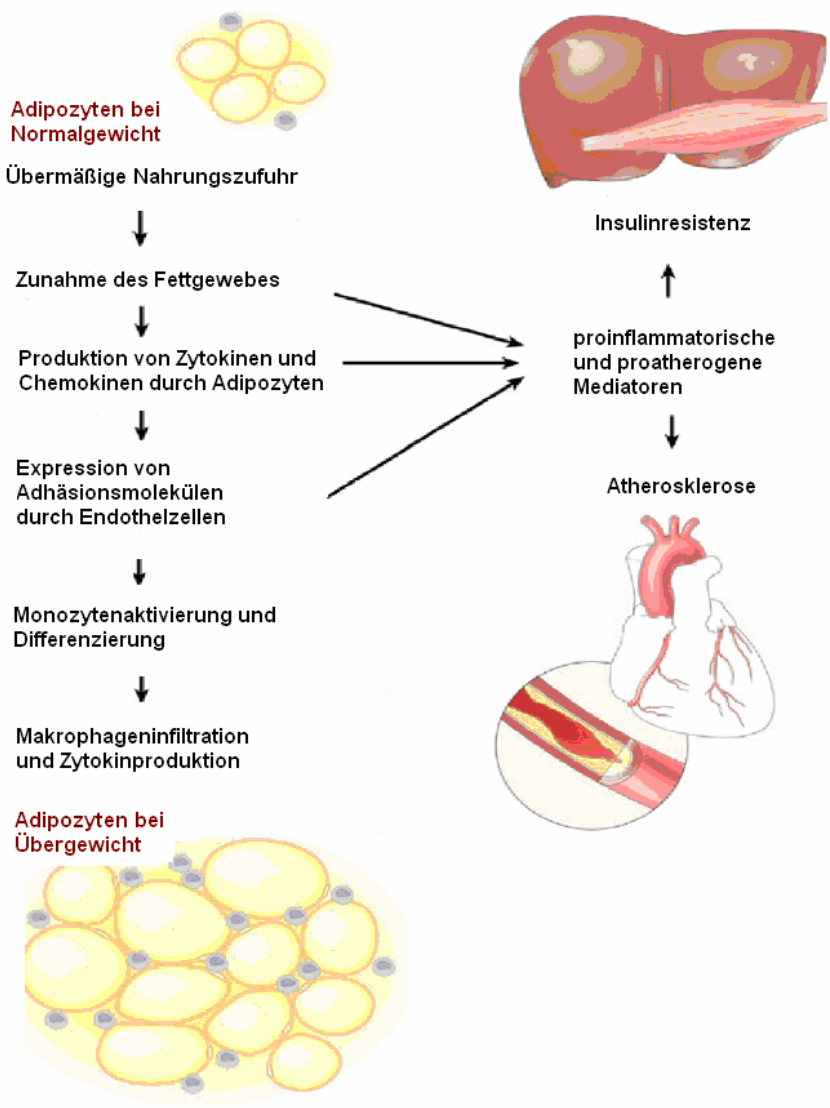


Abb. 1: Die Pathogenese der Arteriosklerose und der Insulinresistenz durch vermehrte Nahrungsaufnahme. (verändert nach [8])

1.2 Adiponektin als Mitglied der Adipokinfamilie

Als erstes Adipokin fand Leptin, das 1994 kloniert wurde, große Aufmerksamkeit. Mäuse mit Mutationen des Leptingens waren adipös, bedingt durch vermehrte Nahrungsaufnahme. Die Rolle von Leptin in der Regulation des Appetits wurde in vielen Artikeln gezeigt. Beim Menschen jedoch korreliert der zirkulierenden Leptinserumspiegel positiv mit dem Körperfettanteil und es konnte eine Leptinresistenz in übergewichtigen Probanden nachgewiesen werden. Die anfängliche Hoffnung, Leptin könnte somit einen neuen Therapieansatz zur Behandlung der Adipositas mit sich bringen, hat sich letztendlich nicht bewahrheitet [14].

1.2.1 Struktur und Funktion von Adiponektin

Mittlerweile hat sich das Interesse vieler Forschungsgruppen auf ein anderes Mitglied der Adipokinfamilie gerichtet, dem Adiponektin.

Bei dem Adipokin Adiponektin handelt es sich um ein 247 Aminosäure langes Protein mit vier unterschiedlichen Regionen: einer amino-terminalen Signalsequenz, einer variablen Region, einer Kollagendomäne und einer carboxy-terminalen globulären Domäne. Posttranslational kommt es zur Ausbildung von Adiponektinmultimeren. Wie in Abbildung 2 dargestellt, kann man zwischen trimerem niedrigmolekularem (LMW = low-molecular-weight) hexamerem (MMW = medium-molecular-weight) und hochmolekularem (HMW = high-molecular-weight) Adiponketin unterscheiden. An der Bildung und Stabilität der Multimere scheinen Disulfid-Brücken maßgeblich beteiligt zu sein [15].

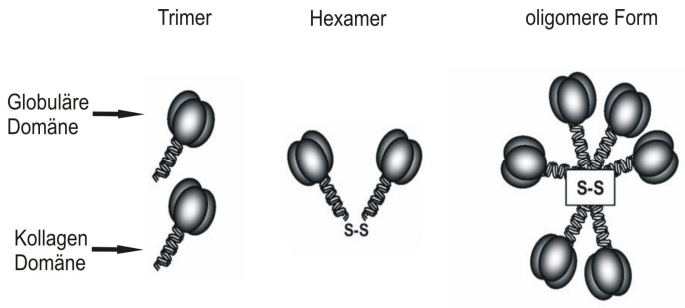


Abb. 2: Adiponektinisoformen [16]

1.2.2 Die Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2

2003 gelang es der Arbeitgruppe um Kadowaki zwei Adiponektinrezeptoren, AdipoR1 und AdipoR2, zu identifizieren. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um eine neue Familie von Membranrezeptoren, die zwar wie die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sieben Transmembran-Domänen besitzen, deren C-terminales Ende jedoch extrazellulär und deren N-terminales Ende im Zytoplasma lokalisiert ist [17]. Das N-terminale Ende der Adiponektinrezeptoren interagiert ferner auf zytoplasmatischer Seite mit dem Adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phophotyrosine-binding domain, and leucine zipper containing (APPL). Die Interaktion zwischen AdipoR1 und dem APPL-Protein wird durch die Bindung von Adiponektin an das extramembranale C-terminale Ende verstärkt [18].

Beide Rezeptoren werden in verschiedenen humanen Geweben, wie im Muskel-, dem Fettgewebe der Leber und dem Pankreas, exprimiert. Während AdipoR2 bei Mäusen vor allem in der Leber gefunden wurde, ist AdipoR1 in der Skelettmuskulatur lokalisiert. Die mRNA Expression beider Rezeptoren ist in den Geweben von insulinresistenten, fettleibigen Mäusen vermindert [19].

Die Forschungsgruppe um Kadowaki konnte im Mausmodell die Spezifität dieser beiden Rezeptoren für Adiponektin in vivo beweisen. Mit Hilfe von transgenen knock-out Mäusen und Mäusen mit einer adenoviral erhöhten Expression von AdipoR1 und AdipoR2 wurde die Signaltransduktion des Adiponektins in der Leber und deren Auswirkung in vivo genauer beleuchtet. Man fand heraus, dass die Bindung von Adiponektin an AdipoR1 in der Leber die AMP-activated protein kinase (AMPK) aktiviert und damit eine verminderte Expression von Enzymen der Glukoneogenese und der Lipogenese bewirkt.

Über den Rezeptor AdipoR2 wird die Expression des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR-α) und dessen Zielgene, wie der Acyl-CoA-Oxidase, gesteigert, was zu einer Reduktion der Triglyzeridspeicher in der Leber führt. AdipoR1-, AdipoR2-, und AdipoR1/AdipoR2-Knock-out Mäuse zeigten eine verminderte Glukosetoleranz. Das Fehlen beider Rezeptoren verstärkte die Insulinresistenz und bedingte eine gesteigerte systemische Entzündungsreaktion [20].

1.2.3 Die Rolle des Adiponektins in der Pathogenese des Diabetes Mellitus Typ 2 und der Arteriosklerose

Bei Adiponektin handelt es sich um das Adipokin mit den höchsten Serumspiegeln [14]. Während sich die Leptinkonzentrationen im Serum im Bereich von Nanogramm pro Milliliter bewegen, konnten bei Adiponektin Spiegel zwischen 2 und 20 µg/ml gemessen werden [15].

Auch wenn die Adipozyten für die Synthese des Adiponektins zuständig sind, steigt der Adiponektinspiegel bei einer Vermehrung des Fettgewebes nicht an, sondern es zeigt sich eine Tendenz zu erniedrigten Serumspiegeln bei Adipositas [14].

Erniedrigte Adiponektinspiegel im Serum sind außerdem mit einem vermehrten Auftreten von Diabetes Mellitus Typ 2, Metabolischem Syndrom, Dyslipidämie, Lipodystrophie und im Rahmen einer Arteriosklerose auftretenden kardiovaskulären Erkrankungen vergesellschaftet [15].

Bereits mehrere Studien haben gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen Plasma-Adiponektinspiegeln und der Insulinsensitivität sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen gibt [15]. Ob diese Korrelation auf Grund einer genetischen Prädisposition zu Stande kommt, oder ob eine erhöhte Insulinresistenz per se oder gar eine Hyperglykämie eine Erniedrigung des Adiponektinspiegels mit sich bringt, ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt [21].

Ein erniedrigtes Plasma-Adiponektin ist auch mit dem Auftreten von koronaren Gefäßerkrankungen verbunden. So konnte eine positive Korrelation des Plasma-Adiponektinspiegels mit dem Plasma HDL-Cholesterin und eine negative Korrelation mit Triglyzeriden, LDL-Cholesterin, CRP, und PAI-1 gefunden werden. Adiponektin vermag ferner die durch TNF-α und Leptin induzierte Expression von Adhesionsmolekülen des Endothels wie Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und VCAM-1 zu inhibieren. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das erhöhte Auftreten von Artheriosklerose bei erniedrigtem Adiponektinspiegel sein [14].

Auch hier ist aber der genaue Zusammenhang zwischen erniedrigtem Adiponketinspiegel und der Pathogenese der KHK unklar.

1.3 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Adiponektin auf primäre humane Blutmonozyten untersucht werden. Primäre Monozyten wurden von Probanden, die verschiedene metabolische Stoffwechsellagen repräsentierten, isoliert. Dabei handelte es sich um drei Kollektive: Zum einen Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus und zum anderen um dazu passende übergewichtige und normalgewichtige Kontrollen.

Zunächst sollte die mRNA-Expression der Adiponektin-Rezeptoren, AdipoR1 und AdipoR2, in den primären Monozyten der drei Kollektive verglichen werden und die Auswirkung einer Inkubation mit Adiponektin auf die Adiponektin-Rezeptoren Expression untersucht werden. Anschließend wurde der Effekt einer Inkubation mit Adiponektin auf die Sekretion und Expression des multifunktionellen Zytokins IL-6 durch primäre Monozyten untersucht und getestet ob die monozytäre IL-6-Freisetzung mit den Adiponektin-Isoformen im Serum der Probanden korreliert. Ferner wurde die Regulation der Expression und Sekretion der Entzündungsmediatoren Aktivin A und Resistin nach Inkubation mit Adiponektin analysiert.

Um zu untersuchen ob die systemischen Konzentrationen dieser Entzündungsmediatoren eine Korrelation zum zirkulierenden Adiponektin zeigen bzw. in einem der drei Kollektive verändert sind, sollte anschließend eine Plasmabank von Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus und geeigneten normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen erstellt und die Konzentrationen von Adiponektin, Resistin und Aktivin A bestimmt werden.

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
Drucker für Geldokumentation DGP UP-D890	Sony
Eismaschine ZBE 150	Ziegra
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Geldokumentation	MWG-Biotech
Inkubationsschrank 37°, 5% CO_2	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler S150	Stuart
LightCycler® Real-Time RT-RCR mit Zubehör	Roche
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
MidiMACS™ Separator quadro	Miltenyi Biotec
Mikroskop und Zubehör	Nikon
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
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 0,1 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon®
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
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Safety-Multifly- Set	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
S- Monovette 4 ml (1,6 mg EDTA/ ml Blut)	Sarstedt
Steriflip® (50 ml, 0,22 µm 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
Zellkulturplatten (6-Loch) Flat Bottom Cell+	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

Acrylamidlösung (40%)	BIORAD
Ammoniumpersulfat (APS) (10%)	BIORAD
Bicinchoninsäure	Sigma
Bisacrylamidlöung (2%)	BIORAD
Bromphenolblau	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol
$CaCl_2$	Fluka
Chloroform	Merck
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
DNA-Leiter, 1 kb	Invitrogen
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
FCS	Biochrom
Full Range Rainbow^{TM} Proteinstandard	Amersham Biosciences
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Igepal	Sigma
Kupfer(II)sulfat	Sigma
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
B-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck

Natriumchlorid	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
PBS	Gibco
2-Propanol	Merck
RPMI 1640	PAN
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
Softasept® N	Braun
TEMED	Merck
Thromborel® S	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-β-Actin monoklonaler Antikörper	Sigma
Anti- Human Adiponektin Rezeptor 1 polyklonaler Antikörper	Pineda Antikörperservice
Anti- Human Adiponektin Rezeptor 2 polyklonaler Antikörper	IBL

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

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

2.1.5 Kit-Systeme

Adiponectin (Multimeric) EIA	Alpco Diagnostics
DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Resistin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Leptin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Aktivin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human IL-6	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Bioscience
Human Adiponectin ELISA	Mediagnost
Human IL-8 ELISA Set	BD Bioscience
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Quantikine® ELISA Human Follistatin	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_2O

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 Herstellung 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_2O

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 Lämmli), 2-fach:

Glyzerin (87 %)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
ß-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH_2O

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_2O

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_2O	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_2O	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_2O	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_2O

Wettransfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH_2O

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	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

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

2.1.6.2.4 Lösungen für Adiponektin-, Leptin- , Resistin-und AktivinA- 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 aufbewahrt.

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_2O

Verdünnung der Antikörper:

Die Capture AK wurden laut Protokoll in PBS, die Detection AK in Reagent Diluent verdünnt.

Verdünnung des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Das HRP-Streptavidin-Konjugat wurde laut Packungsangabe in Reagent 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	2,0	ml
	ad 0,5	l PBS

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

2.1.7 Primer für LightCycler-Analysen

Die Primer für die LightCycler Expressionsanalysen wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, 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 wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte verifiziert.

Oligonukleotid	**Sequenz (5' → 3')**
ß-Actin	
B-Actin_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG
B-Actin_rev	CGCACGATTTCCCTCTCAGCTC
AdipoR1	
AdipoR1_uni	GGGGAATTCTCTTCCCACAAAGGATCTGTGGTG
AdipoR1_rev	GGGCTGCAGTTAAGTTTCTGTATGAATGCGGAAGAT
AdipoR2	
AdipoR2_uni	GGGGAATTCAACAGACCAACAGAAAACCGATTG
AdipoR2_rev	GGGCTGCAGCTAAATGTTGCCTGTTTCTGTGTGTAT
Aktivin A	
AktivinA_uni	CTGGCATGTCTTCCCTGTCT
AktivinA_rev	GCATGAGGAAAGGTCTGTGC
Follistatin	
Follistatin_uni	TGGGAATGATGGAGTCACCT
Follistatin_rev	GCACTGGATATCTTCACAGGACT

2.1.8 Rekombinantes Adiponektin

Zur Stimulation der primären Monozyten wurde zum einen hochmolekulares Adiponektin der Firma R&D Systems und zum anderen in der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Insektenzellen hergestelltes trimeres Adiponektin verwendet. Zur Herstellung des niedermolekularen, trimeren Adiponektins wurde die cDNA von Adiponektin mit Hilfe von Baculoviren in H5-Insektenzellen eingeschleust, von diesen exprimiert und anschließend aus den Überständen gereinigt [22].

2.2 Methoden

2.2.1 Erstellen einer EDTA-Plasma-Bank männlicher Typ 2 Diabetiker und geeigneter Kontrollen

Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission geprüft und stimmt mit den Vorgaben der Deklaration von Helsinki (1997) überein. Jeder Proband wurde über das Projekt aufgeklärt und unterschrieb eine Einverständniserklärung.

Erstellt wurden drei Kollektive, die sich folgendermaßen zusammensetzen: Typ 2 Diabetiker (n=31), Kontrollen mit einer Waist-to-hip-ratio (WHR) unter 1 (n=18) und Kontrollen mit einer (WHR) über 1 (n=15). Im Folgenden wird das Kollektiv der Probanden mit einer WHR < 1 als normalgewichtige Kontrollgruppe und das der Probanden mit einer WHR > 1 als übergewichtige Kontrollgruppe bezeichnet.

Das Durchschnittsalter der Typ 2 Diabetiker liegt bei 66,7 Jahren mit einer Standardabweichung von 8,9 Jahren. Das mittlere Alter der normalgewichtigen Kontrollen beträgt 56,9 Jahre mit einer Standardabweichung von 11,6 Jahren. Die übergewichtigen Kontrollen haben ein mittleres Alter von 59,1 Jahren mit einer Standardabweichung von 10,9 Jahren.

Diesen insgesamt 64 Probanden wurden jeweils 4 ml EDTA-Plasma mit S-Monovetten der Firma Sarstedt abgenommen. Anschließend wurde das Plasma in der Zentrifuge bei 3900 rpm für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der vom Blutkuchen abgenommene Plasmaüberstand wurde aliquotiert und getrennt vom Blutkuchen bei -20°C zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2 Isolierung humaner peripherer Monozyten aus Vollblut

Ein bereits in der Arbeitsgruppe angelegtes Kollektiv von Monozyten isoliert aus dem Vollblut von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen, wurde erweitert. Das Kollektiv besteht nun aus den Monozyten von 13 männlichen Typ 2 Diabetikern, 13 normalgewichtigen (WHR < 1) und 13 übergewichtigen (WHR > 1) Kontrollen. Zur Gewinnung der Monozyten wurden den Probanden jeweils circa 50 ml Vollblut mit Hilfe von Vacutainern abgenommen.

Die mit jeweils 8 ml Vollblut gefüllten Vacutainer 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 Vacutainer bei 2900 rpm für 25 min bei RT zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt und das Polyestergel in den Vacutainern wurden die Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte separiert: Schwere Bestandteile, v. a. aber Erythrozyten, wurden am Boden des Röhrchens zurückgehalten, während leichtere Bestandteile, wie etwa das Plasma und mononukleäre Zellen sich nun über der Gelschicht befanden. Die Vacutainer 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 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 Vacutainer) resuspendiert und mit CD14-Beads (40 µl pro 6 Vacutainer) 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 von Monozyten exprimiert wird, binden.

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) und der Überstand verworfen.
Ein 10 µl Aliquot wurde verwendet, um die Zellzahl in der Neubauer Zellzählkammer zu ermitteln. Die Ausbeute lag bei ca. 1 - 1,5 Millionen Monozyten pro Vaccutainer. Die Zellen wurden in RPMI Medium mit 10 % autologem Serum (3 Mio/Loch) in 6-Loch Platten kultiviert.
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.

2.2.3 Herstellen von autologem Serum

Für die Durchführung von in vitro Experimenten mit Monozyten wurde autologes Serum benötigt, das aus Plasma hergestellt wurde. Das Plasma wurde während der Monozyten-Isolation gewonnen (s. oben).
Vorab wurde PBS auf 4°C gekühlt. Außerdem wurde Thromborel in 10 ml Wasser gelöst und für mindestens 30 Minuten bei 37°C gelagert.
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 Dialyseschlauch 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.

2.2.4 Arbeiten mit cDNA/RNA

2.2.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolation von RNA aus Monozyten erfolgte nach der Trizol-Methode: Die Monozyten in 300 µl Trizol wurden aufgetaut, mit jeweils 1/5 Volumen Chloroform versetzt (60 µl) und das Gefäß 4 bis 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.

2.2.4.2 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 in primären Monozyten bestimmt werden. Dazu wurde die RNA der Zellen in einzelsträngige cDNA überführt, welche für die 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 für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsmix (Roche)	2,0	µl
$MgCl_2$, 25 mM	2,4	µl
universe Primer, 5 pmol/µl	1,0	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1,0	µl
ddH_2O	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, so dass die Reaktion in der Tiefe der Glaskapillaren ablaufen konnte. Anschließend wurden die Proben im Light Cycler für 10 min auf 95°C erhitzt.

Dabei wurde die Taq-Polymerase aktiviert, die die Amplifizierung der jeweiligen genspezifischen DNA einleitete. Es wurden insgesamt 40 bis 45 Amplifizierungszyklen durchgeführt, 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 Menge an DNA 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).

Für jede Probe wurde ein spezifischer Crossing Point (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 einer Standardkurve: Hierzu wurde jeweils eine 1:1-Verdünnungsreihe der betreffenden cDNA hergestellt (Monozyten-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-Menge eines sog Housekeeping Gens (hier β-Actin) bestimmt, das durch die jeweilige Stimulation nicht reguliert wurde. Der Quotient aus den cDNA-Konzentrationen des Zielgens und des β-Actins ergibt einen zum Houskeeping Gen normalisierten Wert, der hinsichtlich Qualitäts- und Quantitätsunterschiede in der Probenvorbereitung korrigiert ist.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde nach der Amplifikationsphase durch eine Schmelzkurve überprüft: Dazu wurde die cDNA langsam (0,1°C/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, unter Umständen über mehrere Stufen. Eine schematische Darstellung des PCR Zyklus bei Verwendung von SYBR Green zeigt Abbildung 3.

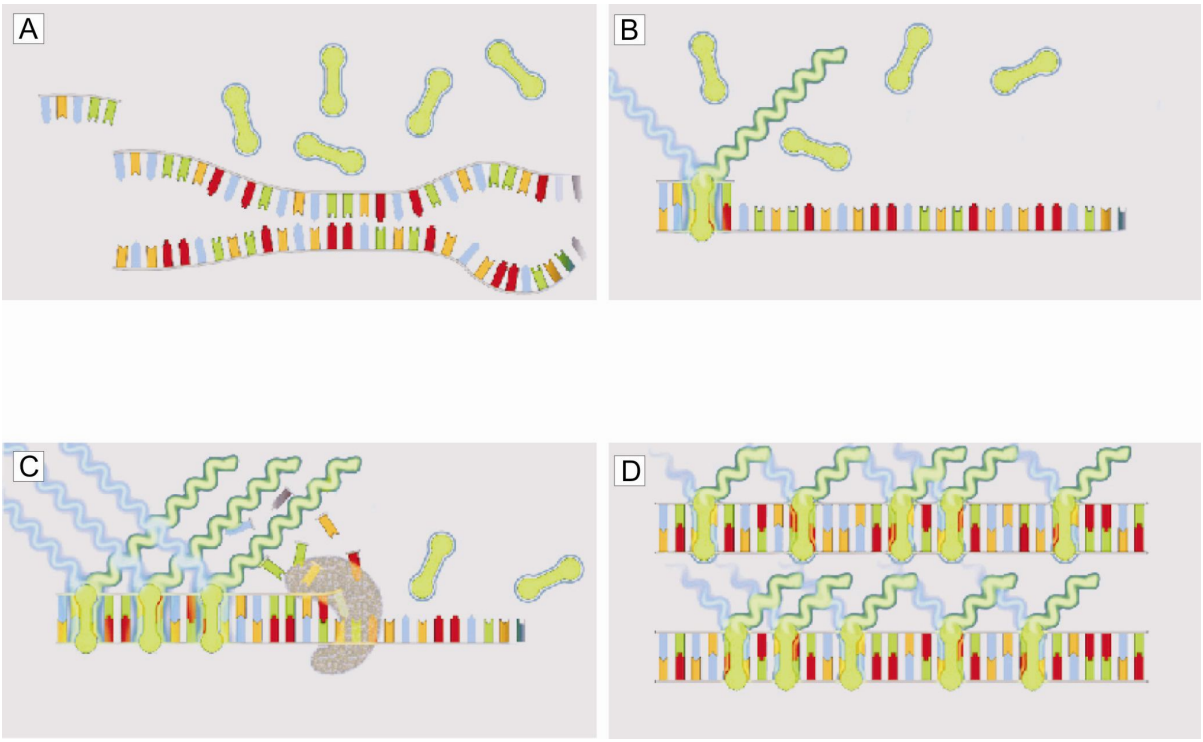


Abb. 3: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR Green I (A) Denaturierung, (B) Annealing, (C) Elongation, (D) PCR Produkt

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen wurde zuerst der Überstand abgenommen. Anschließend folgte ein Waschschritt der am Boden adhärenten Monozyten mit PBS. Die primären Monozyten wurden dann 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 in 40 µl vorgekühlten RIPA-Zelllysepuffer 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.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA) Methode. 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 von Bicinchoninsäure und 4%iger Kupfer-II-Sulfatlösung im Verhältnis 1:50. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nun reduzieren die Proteine die Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{1+}-Ionen, die wiederum mit der Bicinchoninsäure einen violetten BCA-Cu^{1+}-Komplex bilden. Schließlich kann die Extinktion bei 562 nm bestimmt werden und über eine BSA-Standardkurve auf die Proteinmenge geschlossen werden, die proportional zur Produktbildung ist.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierzu wurden die Proteine mit einem 2 x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 10 min bei 60°C erhitzt. Das β-Mercaptoethanol des Puffers löste die Disulfidbrücken die Proteine; zudem lagert sich das negativ geladene SDS des Probenpuffers gleichmäßig an die aufgefalteten Proteine an und überdeckt so die Eigenladung. Auf diese Weise 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 Oberfäche des Gels mit Wasser überschichtet wurde, um eine glatte Begrenzung zu erhalten. Anschließend konnte auf das Trenngel ein 5%iges Sammelgel gegossen werden, in das durch eine Kamm Taschen geformt wurden. In diese Taschen konnte die Proteinlösung pipettiert werden. Im Sammelgel 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.

2.2.5.4 Western-Blotting

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

In dieser Arbeit nutzte man hierzu vor allem die Wetttransfer-Methode: Nach der SDS-PAGE wurden die Gele kurz in Wetttransferpuffer gelegt. Als Trägermembran diente eine PVDF-Membran, die zuerst zugeschnitten und somit an die Gelgröße angepasst wurde, kurz in Methanol gelegt und schließlich in Wetttransferpuffer äquilibriert wurde. Auch die Schwämmchen und die Whatman-Filterkartons wurden mit Wetttransferpuffer benetzt. Anschließend wurde der Blot aufgebaut: Die Basis bildete ein Schwämmchen, auf das zwei Filterpapiere in der Größe des Gels gelegt wurden. Darauf legte man in der Mitte 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 eine Klemme gelegt und so in eine Blotkammer eingespannt, dass die Membran zur Anode, das Gel zur Kathode zeigte. Die Kammer wurde nun vollständig mit Wetttransferpuffer 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 Meerrettichperoxidase mit ECL Plus Western Blotting Detection Reagent 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 Freisetzung von Chemilumineszenz, die wiederum durch eine Autoradiographie detektiert werden kann. Dazu wurde die Membran 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 zeigt das Prinzip der Proteindetektion auf der zuvor geblotteten Membran mit Hilfe eines ELISAs.

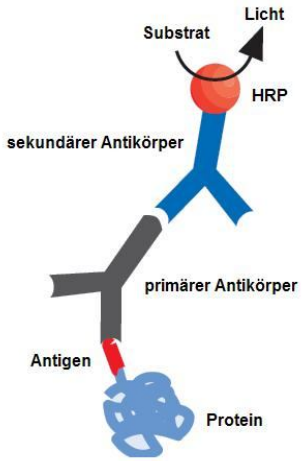


Abb. 4: ELISA in schematischer Darstellung (verändert aus Qiagen-a-HIS-Detection Protokoll)

2.2.5.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ähnlich wie beim Western-Blotting können auch beim ELISA Proteine durch eine Antikörper-gekoppelte Farbreaktion nachgewiesen werden. Man macht sich hierzu die Methode des sogenannten Sandwich-ELISAs zunutze, bei der das Protein zuerst

durch einen Capture AK immobilisiert und anschließend durch einen zweiten Antikörper, dem Detection AK, detektiert wird. Dieser zweite Antikörper ist biotinyliert und bindet das, im nachfolgenden Schritt zugesetzte Streptavidin, welches zusätzlich mit einer HRP gekoppelt ist. Die HRP setzt in einer Reaktion das zugegebene Substrat um. Diese Reaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt. Gleichzeitig findet ein Farbumschlag des Substrats statt, welches im Anschluss photometrisch nachgewiesen werden kann. Da das farbige Produkt proportional zur Proteinmenge gebunden wird, kann über eine Standardkurve der Proteingehalt bestimmt werden. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs zeigt Abbildung 5.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich ELISA-Kits der DuoSet® Reihe (R&D Systems) verwendet. Der Capture AK 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 Waschschritt wurde die Platte 2 h mit dem biotinylierten Detection AK 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 Waschschritt 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.

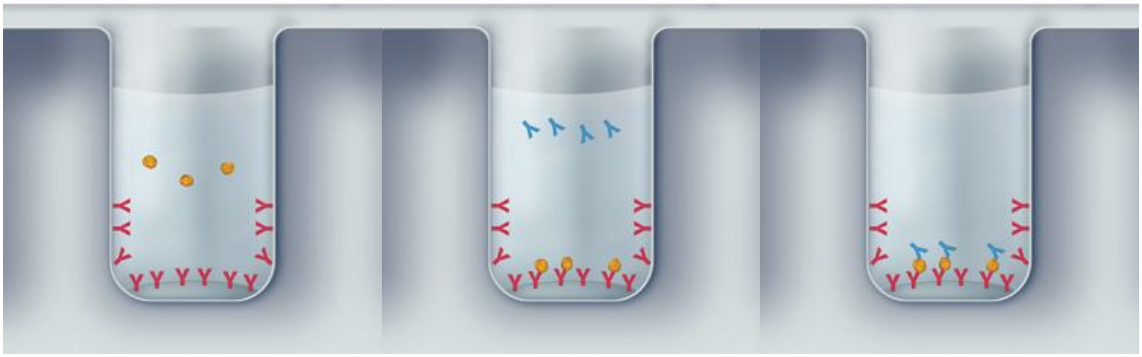
Abweichend von der DuoSet® Reihe (R&D Systems) wurden beim bereits mit Capture AK gecoateten Quantikine® Follistatin ELISA (R&D Systems) der Standard und die Serumproben mit im Kit enthaltenem Calibrator Diluent RD5L und bei zu messenden Überständen mit RD5-21 verdünnt. Inkubiert wurden die aufgetragenen Proben anschließend für drei Stunden bei 2-8°C. Detection Antikörper und

Streptavidin sind im Kit zusammen als Konjugat enthalten, welches bei 2-8°C inkubiert wurde. Abweichend vom Vorgehen bei der DuoSet® Reihe dauerte die folgende Inkubation der Substrat Lösung bei Serum- und Plasmaproben 30 Minuten.

Auch das Adiponektin-ELISA-Set der Firma Mediagnost enthielt eine bereits mit Capture AK gecoatete 96-well Platte. Der Adiponektinstandard war mit Konzentrationen von 100, 70, 30 und 10 ng/ml lyophilisiert im Set enthalten und wurden mit Verdünnungspuffer rekonstituiert. Die Plasma Proben wurden 1:500 in Verdünnungspuffer verdünnt und nach Auftragen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch dieses ELISA Set enthielt eine Kombinationslösung aus Detection-Antikörper und Meerrettich-Peroxidase, mit der die Platte für 30 Minuten inkubiert wurde. Es folgte eine Inkubation mit gebrauchsfertiger Substratlösung für 15 Minuten.

Bei der Durchführung des multimeren Adiponektin ELISAs der Firma Alpco Diagnostics wurden die Serumproben zunächst mit Proteasen versetzt um die einzelnen Isoformen differenziern zu könne. Für die Bestimmung des Gesamtadiponektins wurden 10 µl der Serumproben zunächst mit 100 µl Proteasepuffer und 400 µl Vorbehandlungspuffer versetzt. Für die Messung der gemeinsamen Konzentration von MMW-Apm und HMW-Apm wurden 10 µl Serum mit 100 µl einer Proteaselösung und 400 µl des Vorbehandlungspuffers behandelt. Zur Bestimmung des HMW-Apm wurden 10 µl Serum mit 100 µl einer zweiten Proteaselösung für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 400 µl Vorverdünnungspuffer versetzt. Die so vorbehandelten Proben wurden anschließend 1: 5151 verdünnt und auf eine mit Capture-AK gecoatete 96-well Platte aufgetragen. Das weitere Vorgehen entsprach dem der ELISA DuoSet® Kits.

Die Berechnung der einzelnen Isoformen erfolgte durch Subtraktion der verschiedenen mit Protease vorbehandelten Proben vom Gesamtadiponektin beziehungsweise der Kombination des HMW-Apms mit dem MMW-Apm.



A B C

Abb. 5: Schematische Darstellung des Prinzips eines Sandwich-ELISAs (verändert nach www.rndsystems.com/DAM_public/5633.jpg):
A: Das zu messende Protein bindet an den Capture-AK und wird dadurch immobilisiert
B: Ein mit einem Enzym gekoppelter Detection-AK bindet am Protein-AK-Komplex
C: Durch Zugabe eines Substrates kommt es zur Farbreaktion durch das am Detection-AK gekoppelte Enzym

2.2.6 Stimulierung von primären Monozyten

Zur Stimulierung der Zellen wurde jeweils drei Millionen Zellen pro Loch auf einer 6-Loch Platte ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium in 10% autologem Serum. Primäre Monozyten wurden entweder mit FCS oder autologem Serum inkubiert.

Die primären Monozyten wurden anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert; am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel und eine Stimulation mit 10 µg Adiponektin der Firma R&D Systems bzw. mit 2 µg des in der Arbeitgruppe hergestelltem rekombinanten trimeren Adiponektins.

Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Anschließend wurden die Zellen erneut im Brutschrank über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen abgenommen. Dazu wurden zunächst die Überstände kurz abzentrifugiert (3000 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 3000 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.

2.2.7 Statistik

Für nicht-normalverteilte Daten wurden der Median, der niedrigste und der höchste Wert angegeben. Der Mann Whitney U-Test oder der Wilcoxon Test wurden für die Berechnung von statistischen Unterschieden benutzt und ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant bewertet. Korrelationen wurden mit Hilfe der Pearson Korrelation berechnet. Als Software diente SPSS 12.0.

2.2.8 Erstellen eines Fragebogens zur genaueren Charakterisierung der Stoffwechsellage der Probanden

Es wurde ein Fragebogen erstellt, der von jedem teilnehmenden Probanden ausgefüllt werden musste. Mit diesem wurden anthropometrische Daten, die Krankengeschichte und die Familienanamnese erfasst. Des Weiteren wurde auch die derzeitige Medikation und ihre Dosierung erfragt. Einen Einblick in die metabolische Situation des Probanden zum Zeitpunkt der Blutabnahme ergab sich durch die Fragen nach der letzten Mahlzeit und dem zuletzt gemessenen Nüchternblutzucker. (Tabelle 1).

Name
Geburtsdatum
Tag und genauer Zeitpunkt der Blutabnahme
Nüchtern (ja/nein)
Letzte Mahlzeit
Gewicht (kg)
Größe (cm)
Bauchumfang (Höhe Nabel in cm)
Hüftumfang (cm)
Derzeitige Medikation
T2D-Erstdiagnose
Sekundärkomplikationen: KHK, Nephropathie, Retinopathie
Nationalität
Blutzucker aktuell
T2D bei Eltern, Geschwistern
Erbkrankheiten

Tab.1: Fragebogen für die Probanden

3 Ergebnisse

3.1 AdipoR1- und AdipoR2-mRNA in Monozyten von Typ 2 Diabetikern und Kontrollen und Regulation der Rezeptoren durch Adiponektin

3.1.1 Bestimmung der mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in den Monozyten von Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Aus den Monozyten männlicher Typ 2 Diabetiker (T2D), übergewichtiger Kontrollen (CG1) und normalgewichtiger Kontrollen (CG2) wurde mRNA gewonnen, um im LightCycler die mRNA-Konzentrationen von AdipoR1 und AdipoR2 zu bestimmen. Alle Werte wurden mit ß-Actin, dessen mRNA Menge in den verschiedenen Proben ähnlich exprimiert war, normalisiert.

Die AdipoR1 mRNA-Expression lag in der Gruppe T2D bei 2,47 (0,42 - 4,70). Bei den Kontrollen fand sich in der Gruppe CG1 eine mRNA-Expression von 1,11 (0,75 - 4,49) und von 0,63 (0,28 - 1,23) in der Gruppe CG2.

Während die mRNA-Expression von AdipoR1 in den Monozyten bei T2D und übergewichtigen Kontrollen ähnlich war, wurde in den Monozyten der normalgewichtigen Kontrollen signifikant weniger AdipoR1 mRNA detektiert. ($p = 0{,}001$ für T2D gegen CG2; $p = 0{,}001$ für CG1 gegen CG2; nicht signifikant für T2D gegen CG1). (Abbildung 6A)

Die mRNA-Expression des AdipoR2 zeigte, wie in Abbildung 6B dargestellt, ebenfalls eine höhere Expression in der Gruppe T2D mit 0,88 (0,34 - 2,07) und 0,96 (0,59 - 2,14) in der Gruppe CG1 im Vergleich zu einer signifikant niedrigeren Expression von 0,66 (0,24 - 1,14) in der Gruppe CG2. ($p = 0{,}036$ für T2D gegen CG2; $p = 0{,}008$ für CG1 gegen CG2).

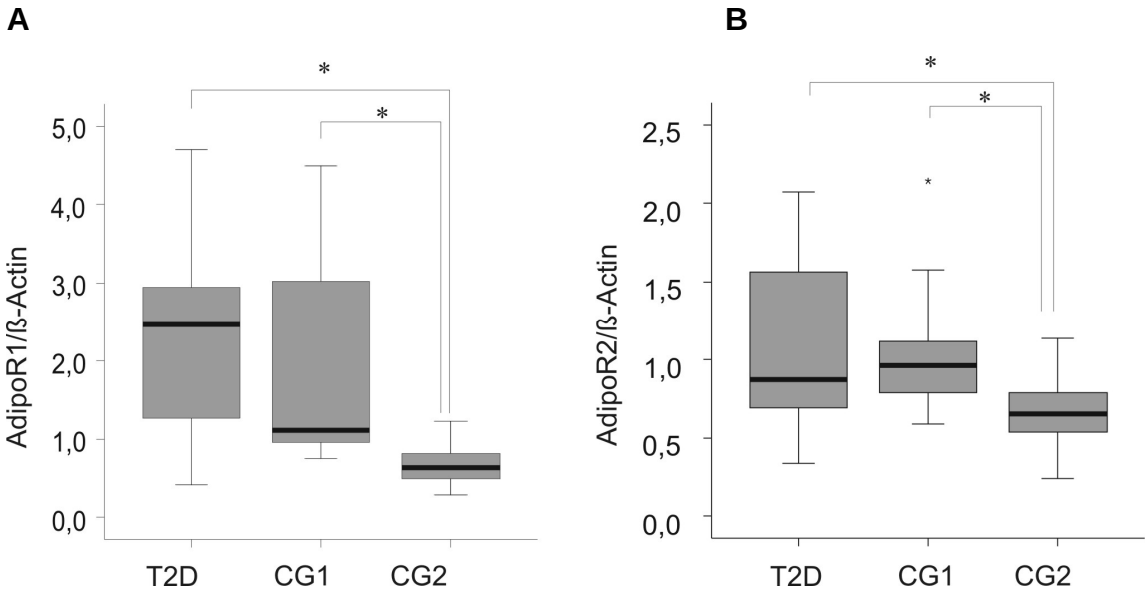


Abb. 6: mRNA-Expression von AdipoR1 (A) und AdipoR2 (B) in primären Monozyten von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2)

Ferner korrelierte die mit ß-Actin normalisierte AdipoR1-mRNA positiv mit der WHR der Probanden. (Abbildung 7)

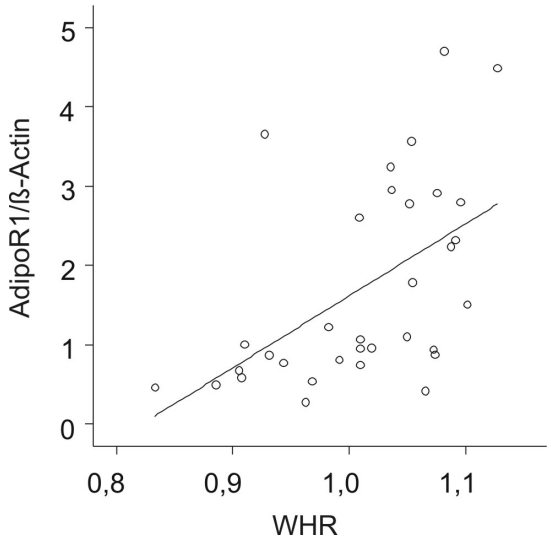


Abb. 7: Korrelation der monozytären AdipoR1-mRNA zur WHR ($r = 0,53$; $p < 0,05$)

3.1.2 Der Einfluß von Adiponektin auf die monozytäre AdipoR1- und AdipoR2-Expression

Die aus Vollblut isolierten Monozyten von gesunden Kontrollen wurden mit und ohne 10 µg/ml HMW-Apm für 24 h in mit 10% FCS versetztem Medium inkubiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 8: Durch die Inkubation mit HMW-Apm stieg die mRNA-Expression von AdipoR1 von 0,57 (0,28 - 0,87) auf 1,05 (0,75 - 1,45) in den Monozyten an (p = 0,001).

Auch die mRNA-Expression von AdipoR2 nahm mit 0,96 (0,25 - 1,26) in den mit Adiponektin stimulierten Zellen im Vergleich zu 0,65 (0,24 - 0,83) in den Kontroll-kultivierten Zellen signifikant zu (p = 0,007).

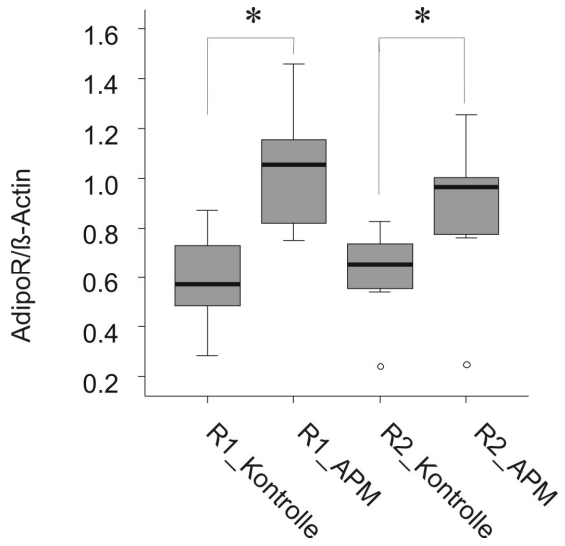


Abb. 8: mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in primären Monozyten nach Inkubation mit Apm bzw. mit PBS als Kontrolle

Der Anstieg von AdipoR1 und AdipoR2 auf Proteinebene zeigte sich im Immunoblot. Als Ladungskontrolle diente auch hier ß-Actin. (Abbildung 9)

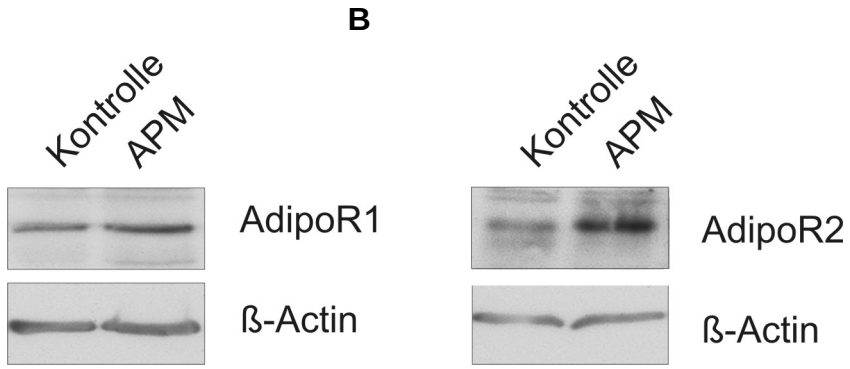


Abb. 9: AdipoR1 (A) und AdipoR2 (B) mit ß-Actin als Ladungskontrolle in Monozyten, die mit bzw. ohne Adiponektin für 24 Stunden kultiviert wurden

3.2 Basale und Adiponektin-regulierte Sekretion von IL-6 in den drei Kollektiven

3.2.1 Die basale IL-6-Sekretion primärer Blutmonozyten von Typ 2 Diabetikern und geeigneten Kontrollen und deren Korrelation zu anthropometrischen und biometrischen Daten der Spender

Um zunächst die basale IL-6-Sekretion der primären Blutmonozyten von T2D und geeigneten Kontrollen vergleichen zu können, wurden Blutmonozyten von 13 T2D-Patienten, 12 normalgewichtigen (CG2) und 13 übergewichtigen (CG1) Kontrollen isoliert. Mit Hilfe eines ELISAs wurde nach 24-stündiger Inkubation in mit 10% autologem Serum versetzten Medium die IL-6-Konzentration in den Überständen bestimmt. Wie Abbildung 12 zeigt, war die IL-6-Konzentration der Monozyten der T2D Patienten mit 471,0 pg/ml (56 – 5203) ähnlich zur CG1 Kontrollgruppe mit 691,0 pg/ml (10,8 – 5300). Die IL-6-Konzentration in den Überständen der CG2 Kontrollen dagegen war mit 82,4 pg/ml (2,5 – 557) signifikant niedriger im Vergleich zur T2D Gruppe ($p = 0,024$), wohingegen kein signifikanter Unterschied zur CG1 Gruppe gefunden wurde ($p = 0,05$) (Abbildung 10).

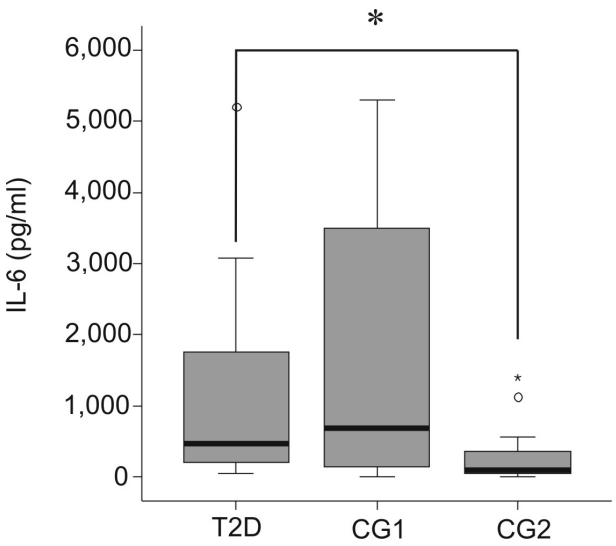


Abb. 10: IL-6 im Überstand primärer Monozyen von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen (CG2) Kontrollen

Die IL-6-Menge im Überstand der primären Monozyten wurde anschließend in Bezug zu anthropometrischen Größen und den Serumspiegeln von HDL-Cholesterin, Triglyzeriden und Gesamt-Cholesterin gesetzt. Hierbei diente der dekadische Logarithmus der IL-6-Werte zur Berechnung, da diese in den Überständen der Monozyten sehr unterschiedlich waren. Es konnte keinerlei Korrelation der IL-6-Konzentration im Überstand der primären Monozyten zu den Kenngrößen des Fettstoffwechsels gefunden werden. Es fand sich jedoch eine positive Korrelation zu den anthropometrischen Größen des BMI ($p < 0,0001$; $r = 0,541$), der WHR ($p = 0,003$; $r = 0,462$) und des Bauchumfangs ($p < 0,0001$; $r = 0,574$). Abbildung 11 zeigt die Korrelation der IL-6-Konzentration zum BMI.

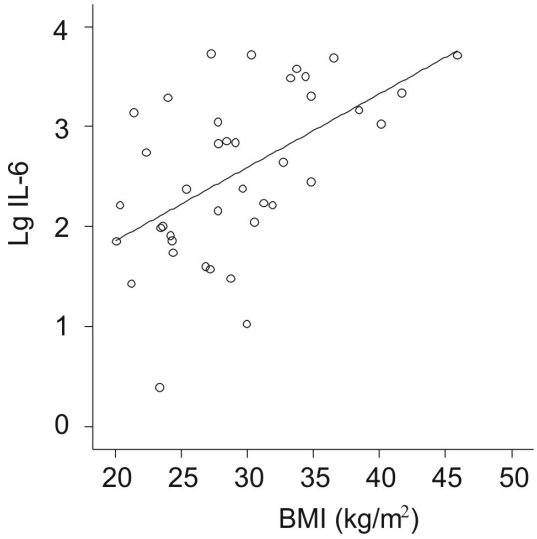


Abb. 11: Korrelation des BMI zum dekadischen Logarithmus der IL-6-Sekretion primärer Monozyten. ($p < 0{,}0001$; $r = 0{,}541$)

3.2.2 Einfluß von HMW- und LMW-Adiponektin auf die monozytäre IL-6-Sekretion

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass in Monozyten, die mit 10 µg/ml HMW-Adiponketin (HMW-Apm) stimuliert wurden, die IL-6-Sekretion zunahm. Nun wurde die IL-6-Expression in mit HMW-Apm inkubierten Monozyten mit der von Monozyten, die mit 1 µg/ml LMW-Adiponektin (LMW-Apm rekombinant hergestellt in H5-Insektenzellen) inkubiert wurden, verglichen. Dazu wurden die Monozyten von sechs übergewichtigen Spendern einmal mit 10 µg/ml HMW-Apm und einmal mit 1 µg/ml LMW-Apm beziehungsweise ohne Adiponektin für 24 h inkubiert. Anschließend wurde IL-6 in den Überständen der Monoztyen mit Hilfe eines IL-6 ELISAs gemessen. Erneut konnte gezeigt werden, dass relativ zu den Kontrollen, die auf 100% gesetzt wurden, die IL-6-Freisetzung unter Inkubation mit HMW-Apm auf das 3,9-fache (130 - 440%, $p = 0{,}002$) zunahm. Die Inkubation mit LMW-Apm dagegen zeigte einen Rückgang der IL-6-Sekretion auf 78% (56-110%, $p = 0{,}017$) (Abbildung 12).

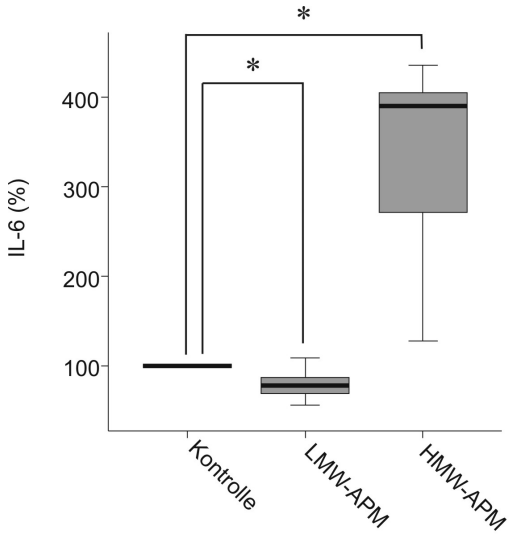


Abb. 12: IL-6 im Überstand primärer Monozyten nach Inkubation mit LMW-Apm und HMW-Apm in Prozent, ausgehend von der Kontrolle die als 100% gesetzt wurde

3.3 Die Serumspiegel der Adiponektinisoformen und von IL-6 bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Die Serumspiegel von Gesamt-Adiponektin, der drei verschiedenen Adiponektin-Isoformen, HMW, MMW und LMW und der Serum-IL-6-Spiegel wurden in dem Kollektiv der 13 Typ 2 Diabetiker (T2D), der 13 übergewichtigen (CG1) und 12 normalgewichtigen (CG2) Kontrollen gemessen.

Das Serumadiponektin war im Kollektiv der T2D Patienten 1562 ng/ml (577 - 3849), 2285 ng/ml (1161 – 4352) im CG1 Kollektiv und 2567 ng/ml (1000 - 5604) im CG2 Kollektiv. Ein signifikant erniedrigter Adiponektispiegel bei T2D konnte nicht festgestellt werden, doch zeichnete sich ein Trend zu höheren Serumwerten in den Kontrollgruppen, besonders bei den normalgewichtigen Probanden, ab.

Auch das HMW-Apm zeigte mit 578 ng/ml (58 - 3507) für T2D, 1147 ng/ml (279 - 3463) für CG1 und 767 ng/ml (386 - 2506) für CG2 keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven, aber eine Tendenz zu reduzierten HMW-Apm-Spiegeln bei T2D (Abbildung 13).

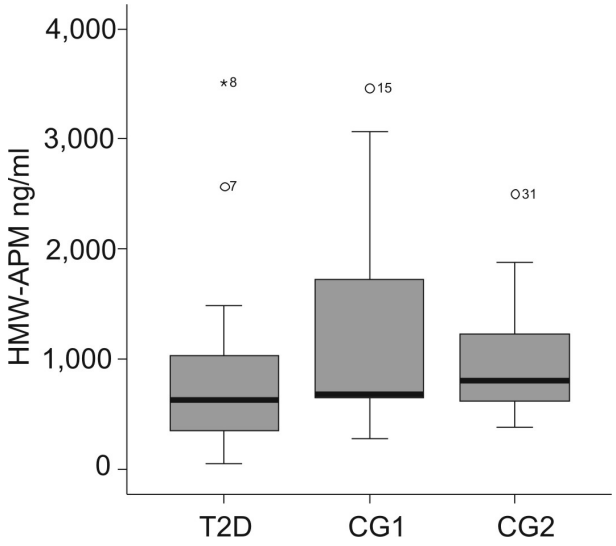


Abb. 13: Konzentration des HMW-Apm im Serum von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2)

Wie Abbildung 14 zeigt, war der MMW-Apm-Serumspiegel der Typ 2 Diabetiker bei 211 ng/ml (0 - 320), für die Kontrollgruppe CG1 lag er bei 354 ng/ml (0 - 2605) und für CG2 bei 490 ng/ml (87 - 912). (p = 0,02 für T2D gegen CG1; p = 0,0001 für T2D gegen CG2).

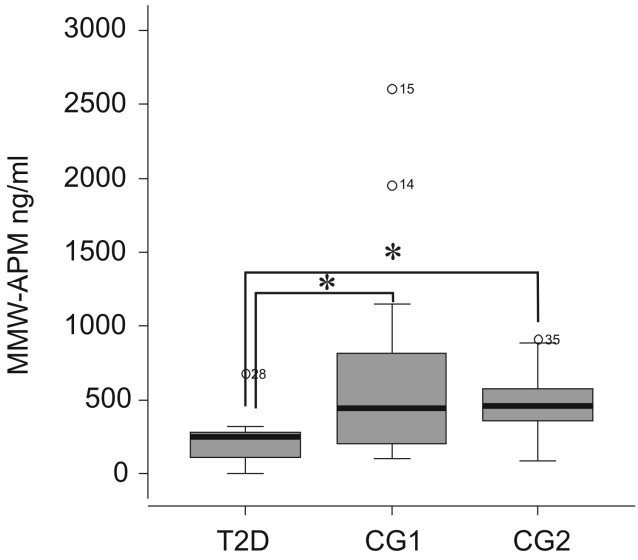


Abb. 14: Konzentration des MMW-Apm in ng/ml im Serum von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2)

Die niedermolekulare Form des Adiponektins wurde für T2D mit 727 ng/ml (407-1105), für CG1 mit 662 ng/ml (0 - 1260) und für CG2 mit 997 ng/ml (0 - 1418) im Serum bestimmt. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion des LMW-Apm bei Typ 2 Diabetikern (p = 0,04) und übergewichtigen Kontrollen (p = 0,03) im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden gezeigt werden (Abbildung 15).

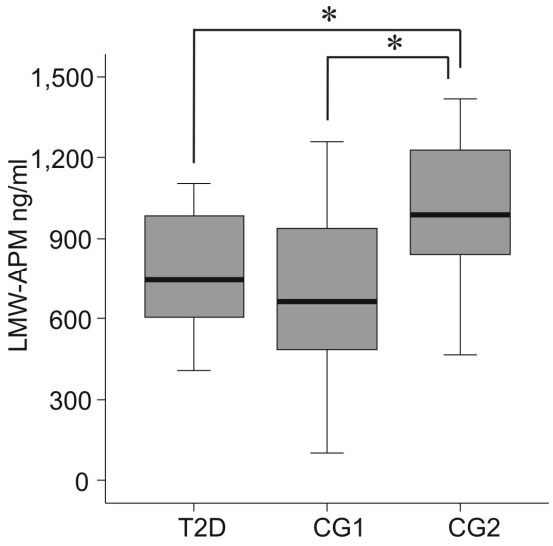


Abb. 15: Konzentration des LMW-Apm in ng/ml im Serum von Typ 2 Diabetikern (T2D), übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2)

Ferner korrelierte der LMW-Apm-Spiegel im Serum negativ mit dem Bauchumfang (p = 0,012), dem BMI (p = 0,014) und der WHR (p = 0,005). Wie in Abbildung 16 dargestellt, korrelierte die niedermolekulare Isoform des Adiponektins im Serum negativ mit dem von Monozyten freigesetzten IL-6 (p = 0,012 , r = -0,41).

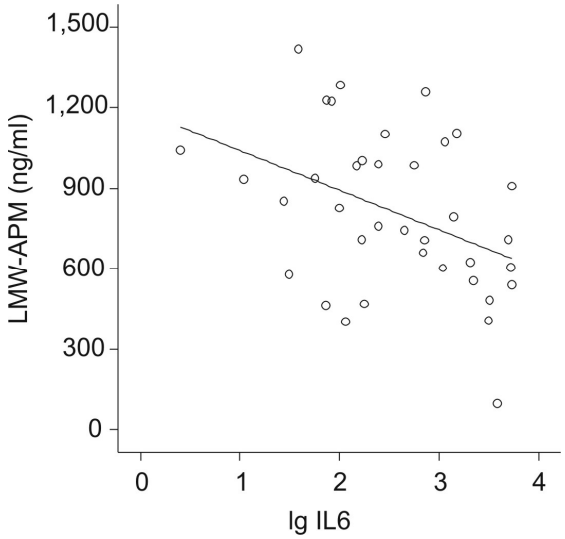


Abb. 16: Korrelation des LMW-APM in ng/ml zur basalen IL-6-Sekretion primärer Monozyten (p = 0,012, r = -0,41)

Aus der Bestimmung des Gesamtadiponektins und der einzelnen Isoformen mit Hilfe eines hochsensitiven ELISAs ergab sich, wie in Abbildung 17 gezeigt, eine Korrelation des Gesamt-Adiponektins mit der hochmolekularen Form (r = 0,923) und der MMW-Isoform (r = 0,692). Es ergab sich keine Korrelation des LMW-Apms zum Gesamtadiponektin.

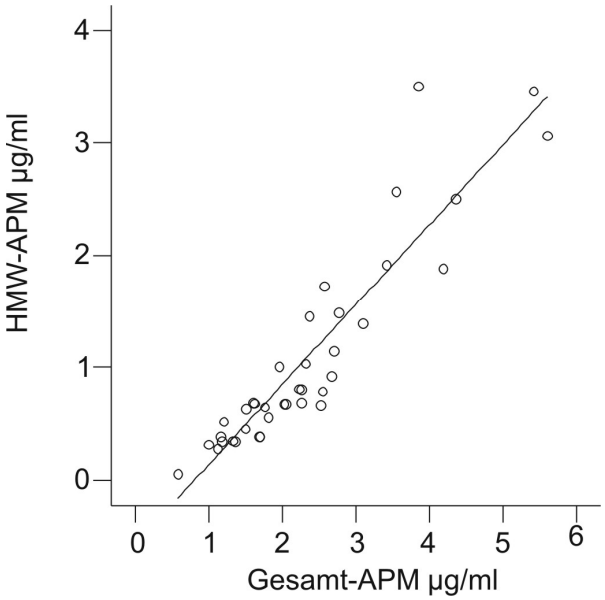


Abb. 17: Korrelation von Gesamt- Adiponektin zur Konzentration der HMW-Apm Isoform (r = 0,923)

Der Serumspiegel des IL-6 wurde mit einem hochsensitiven ELISA bestimmt und zeigte mit einem Mittelwert von 1,5 pg/ml (0,48 – 9,30) für T2D, 1,65 pg/ml (0,30 - 4,00) für CG1 und 0,46 pg/ml (0,03 - 2,00) für CG2 einen signifikant erniedrigten IL-6-Spiegel im Serum von normalgewichtigen Kontrollen gegenüber Typ 2 Diabetikern (p = 0,006) und übergewichtigen Kontrollen (p = 0,006) (Abbildung 18).

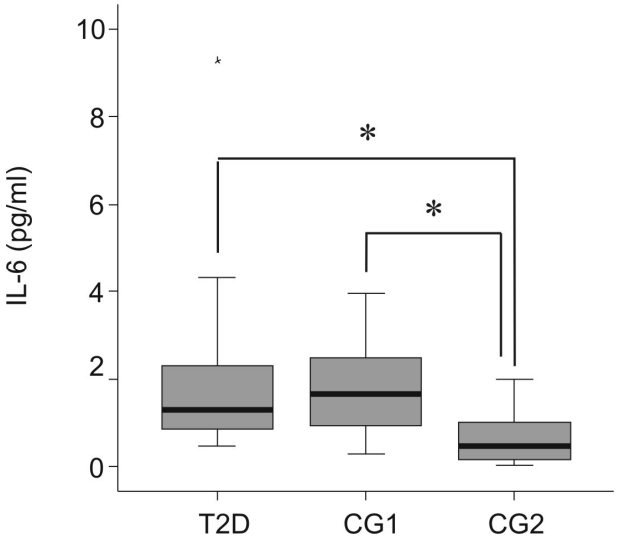


Abb. 18: Der systemische IL-6-Spiegel im Serum, gemessen bei Typ 2 Diabetikern (T2D), normalgewichtigen (CG2) und übergewichtigen (CG1) Kontrollen

3.4 Die Verifizierung der durch GeneChip Analysen identifizierten HMW-Adiponektin-regulierten Gene

Gesamt RNA wurde aus Monozyten, die mit beziehungsweise ohne HMW-Adiponektin für 24 h inkubiert worden waren, isoliert und mit Hilfe von GeneChips analysiert (Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik, Regensburg).
Die Auswertung der Daten ergab hierbei eine im Vergleich zu den Kontrollen vermehrte Expression von Aktivin A und Resistin.

3.4.1 Der Einfluss von HMW-Adiponektin auf die Expression und Sekretion von Aktivin A und Follistatin durch primäre Monozyten

Um die in der Auswertung der GeneChip Daten ersichtliche Zunahme des Aktivin A sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu verifizieren wurden von 13 männlichen Probanden im Alter zwischen 40 und 76 Jahren Monozyten aus dem

Vollblut isoliert und in mit 10% autologem Serum versetzten Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie für 24 Stunden mit 10 µg/ml HMW-Adiponektin beziehungsweise als Kontrolle mit PBS inkubiert. In den Überständen wurde Aktivin A mit Hilfe eines ELISA gemessen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 19.

Die Überstände der mit PBS kultivierten Zellen wiesen eine durchschnittliche Aktivin-A-Konzentration von 600 pg/ml (30 - 1657) auf. Die durchschnittliche Aktivin-A-Konzentration in den Überständen der mit HMW-Apm inkubierten Monozyten lag bei 1429 pg/ml (54 - 6693). Der Aktivin-A-Spiegel stieg nach der Inkubation mit HMW-Apm um einen mittleren Faktor von 2,93 an (p=0,001).

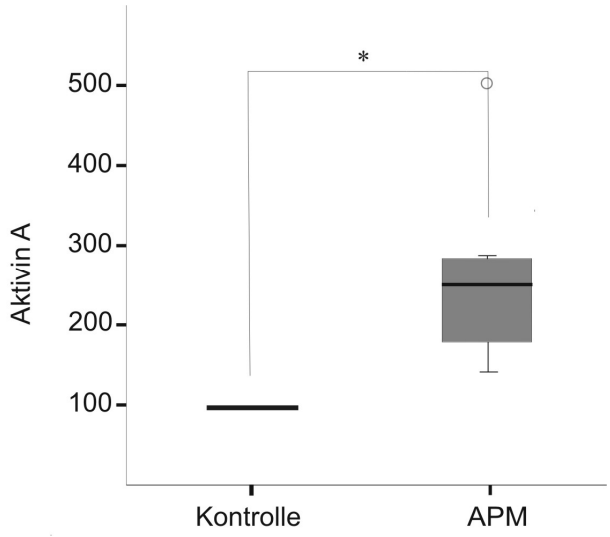


Abb. 19: AktivinA in den Überständen primärer Monozyten nach Inkubation mit HMW-Apm relativ zu Kontroll-kultivierten Monozyten (100%)

Die Zunahme der mRNA Expression von Aktivin A wurde durch Real-time RT-PCR bestimmt. Dazu wurden Monozyten von vier Probanden isoliert und mit HMW-Apm stimuliert beziehungsweise ohne Zusätze kultiviert. Zur Normalisierung wurde die ß-Actin-Expression gemessen.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, stieg die mittlere mRNA Konzentration von Aktivin A nach Adiponektinstimulation um den Faktor 3,6 (1,2 - 5,3) von 0,08 (0,02 - 0,16) auf 0,34 (0,07 - 0,85) an (p = 0,037).

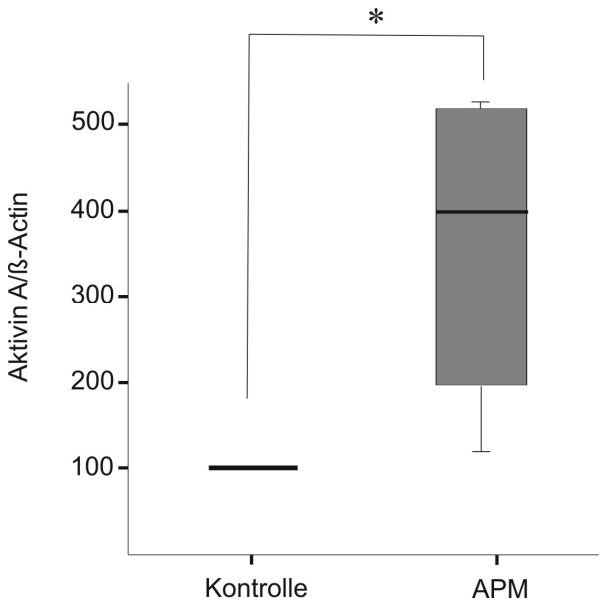


Abb. 20: Aktivin-A-mRNA-Expression in primären Monozyten nach Inkubation mit HMW-Apm relativ zu den Kontroll-inkubierten Monozyten (100%)

Follistatin ist ein natürlicher Antagonist von Aktivin A und sollte deshalb ebenfalls gemessen werden.

Ein hochsensitiver ELISA für Follistatin konnte weder in den Überständen der unstimulierten noch in den Überständen der mit HMW-Apm stimulierten Monozyten Follistatin detektieren.

Auf mRNA-Ebene bestätigte sich dieses Ergebnis, wobei Hepatozyten als positive Kontrolle dienten (nicht gezeigt).

3.4.2 Der Einfluß des HMW-Adiponektins auf die Resistin-Expression und -Sekretion pimärer Monozyten

Um den Einfluss einer HMW-Apm Inkubation auf die Sekretion von Resistin zu untersuchen wurde wie bei der Bestimmung der Aktivin A Sekretion vorgegangen. Verwendet wurden hierbei primäre Monozyten von acht Spendern des Kontrollkollektivs. Im Vergleich zur Resistin Sekretion der Kontroll-inkubierten Monozyten mit einer medianen Konzentration von 677,3 pg/ml (114,7 – 852,3) kam es nach Inkubation mit HMW-Apm zu einer Sekretionszunahme von Resistin um den mittleren Faktor von 4,8 auf 812,5 pg/ml (481,8 – 1324,0) (Abbildung 21).

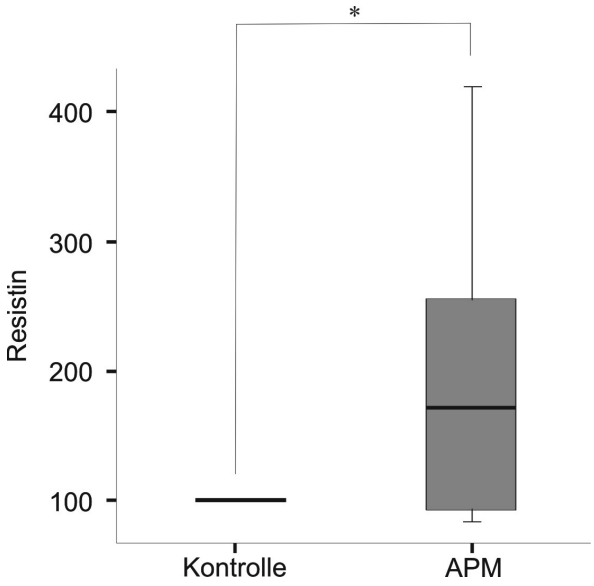


Abb. 21: Resistin in den Überständen primärer Monozyten nach Inkubation mit HMW-Apm relativ zu Kontroll-kultivierten Monozyten (100%)

Die Resistin-mRNA wurde mit LightCycler RT-PCR bestimmt. Hierbei ergab sich, wie in Abbildung 22 ersichtlich, eine signifikante Zunahme der Resistin-Expression um einen medianen Faktor von 3,7 (3,26 – 10,32) relativ zu den Kontroll-inkubierten Zellen von 46,2 (6,0 – 270,6) auf 177,8 (61,5 – 885,3) (p = 0,02).

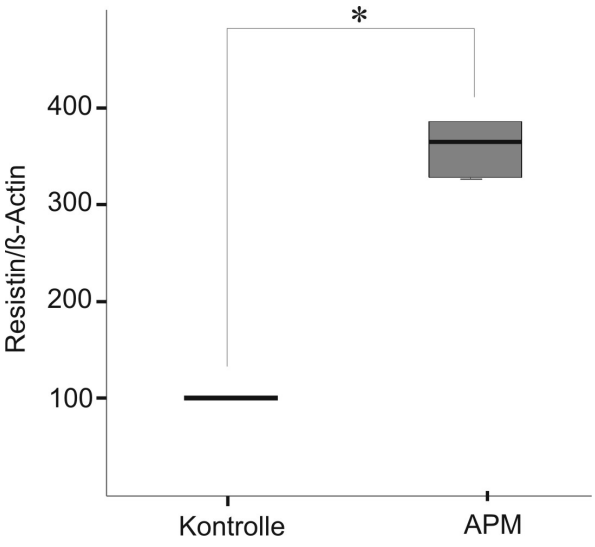


Abb. 22: Die Resistin-mRNA-Expression in primären Monozyten nach Inkubation mit HMW-Apm relativ zu den als Kontrolle inkubierten Monozyten (100%)

3.5 Bestimmung von Leptin, Resistin, Adiponektin, Aktivin A und Follistatin im Plasma eines Typ 2 Diabetiker-Kollektivs und geeigneten Kontrollen

Um eine Aussage über die systemischen Spiegel der bereits erwähnten Entzündungsmediatoren und Adipokine bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu geeigneten übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen treffen zu können wurde ein Plasmakollektiv männlicher Typ 2 Diabetiker und passender normalgewichtiger und übergewichtiger Kontrollen zusammengestellt. Die Probanden wurden anhand des im Methodenteils beschriebenen Fragebogens genauer charakterisiert.

3.5.1 Auswahl der Probanden

Ziel war es Plasma von männlichen Typ 2 Diabetikern (T2D) und geeigneten gesunden Kontrollen zu sammeln. Die Kontrollen wurden in normalgewichtige und übergewichtige Probanden unterteilt. Die Unterscheidung erfolgte anhand der Waist-to-hip ratio und anhand des BMIs. Kontrollen mit einer WHR ≥ 1 wurden als übergewichtige Kontrollen geführt (CG1), Probanden mit einer WHR < 1 als normalgewichtige Kontrollen (CG2). Zusätzlich wurde das Plasma der bereits vorhandenen Monozytenspender in das Kollektiv mitaufgenommen. Das Kollektiv bestand somit aus 43 T2D Patienten, 25 Probanden im Kollektiv CG1 und 36 Probanden im Kollektiv CG2.

Die für die Auswertung der gemessenen Plasmafaktoren wichtigen anthropometrischen und biochemischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	Probanden			p-Werte		
	T2D	CG1	CG2	T2D vs CG1	T2D vs CG2	CG1 vs CG2
N	43	25	36			
Alter (Jahre)	63,8 ± 10,6	57,0 ± 10,9	57,1 ± 9,4	**0,017**	**0,008**	0,846
BMI (kg/m²)	31,6 ± 5,5	29,6 ± 2,9	25,5 ± 3,1	0,158	**< 0,001**	**< 0,001**
WHR	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,04	0,9 ± 0,1	0,904	**< 0,001**	**< 0,001**
Bauchumfang	114,9± 12,6	111,0 ± 8,0	95,0 ± 10,4	0,221	**< 0,001**	**< 0,001**
Hüftumfang	109,3 ± 9,3	105,5 ± 6,0	102,3 ± 9,2	0,077	**0,001**	0,114

Tab.2: Anthropometrische Daten der Probanden, signifikante Unterschiede zwischen den Kollektiven sind hervorgehoben

3.5.2 Der Leptinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Der Leptinspiegel im Plasma wurde mit Hilfe eines hochsensitiven ELISAs bestimmt. Der Median der Leptinkonzentrationen lag in der Gruppe T2D bei 10,6 ng/ml (3,0 – 41,5), in der Gruppe CG1 bei 8,5 ng/ml (3,8 – 26,5) und in der Gruppe CG2 bei 4,7 ng/ml (1,6 – 21,3). Dies ergab, wie in Abbildung 23A dargestellt, einen signifikanten Unterschied sowohl bei T2D Patienten gegenüber CG1 und CG2, als auch zwischen den beiden Kontrollgruppen CG1 und CG2 (p jeweils < 0,001). Positive Korrelationen ergaben sich ferner zwischen dem Leptinplasmaspiegel und dem Gewicht der Probanden ($p < 0,001$), dem BMI ($p < 0,001$), dem Bauchumfang ($p < 0,001$) und der WHR ($p = 0,003$). Die Korrelation des Leptinspiegels zum BMI der Probanden zeigt Abbildung 23B.

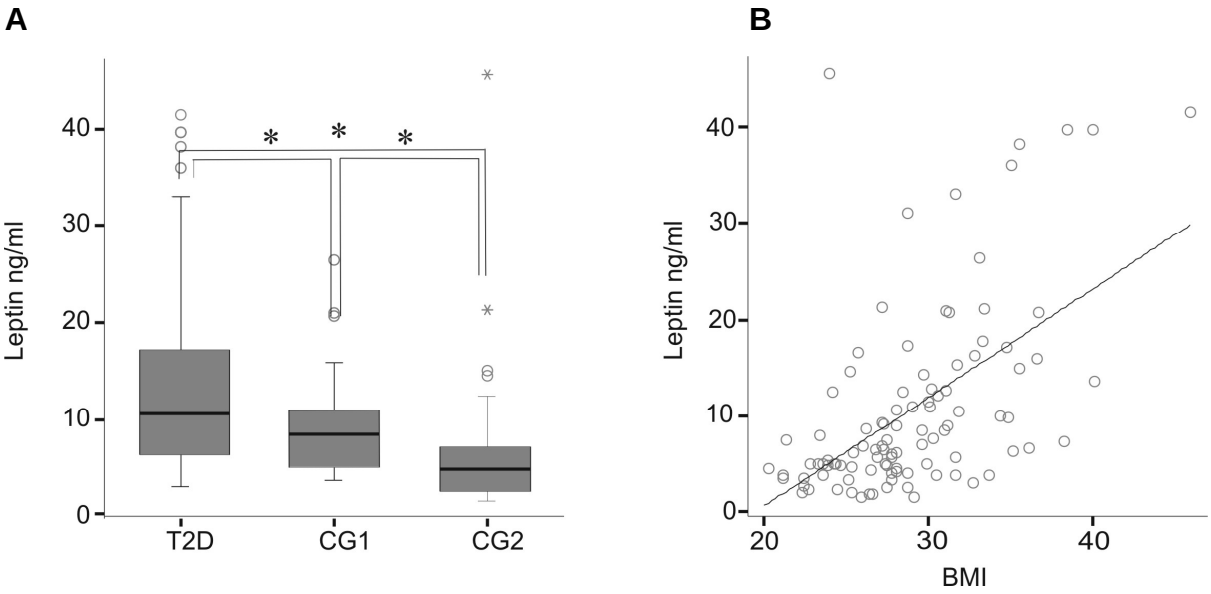


Abb. 23: Leptinkonzentration im Plasma von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2) (A). Korrelation der Leptinkonzentration im Plasma zum BMI der Probanden ($p < 0{,}001$; $r = 0{,}55$) (B)

3.5.3 Der Resistinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Der Resistinspiegel wurde im Plasma von insgesamt 102 Probanden gemessen. Wie Abbildung 24A zeigt, lag der Median der Plasma-Resistinspiegel der Typ 2 Diabetiker bei 14,7 ng/ml (8,5 – 38,4). Bei den Kontrollen lag die mittlere Konzentration im Kollektiv der übergewichtigen Probanden (CG1) bei 9,2 ng/ml (3,7 – 16,3) und im Kollektiv der normalgewichtigen Probanden (CG2) bei 8,9 ng/ml (3,6 – 17,8). Der Plasma- Resistinspiegel zeigte signifikante Unterschiede sowohl zwischen T2D und CG1 als auch zwischen T2D und CG2 (p jeweils < 0,001). Ferner korrelierte der Plasma-Resistinspiegel der Probanden positiv mit dem Alter der Probanden ($p < 0{,}001$), dem Bauchumfang ($p = 0{,}003$) und der WHR ($p = 0{,}001$). Auch eine positive Korrelation zwischen Resistin- und Leptinspiegel im Plasma konnte nachgewiesen werden ($p = 0{,}007$; $r = 0{,}33$) (Abbildung 24B).

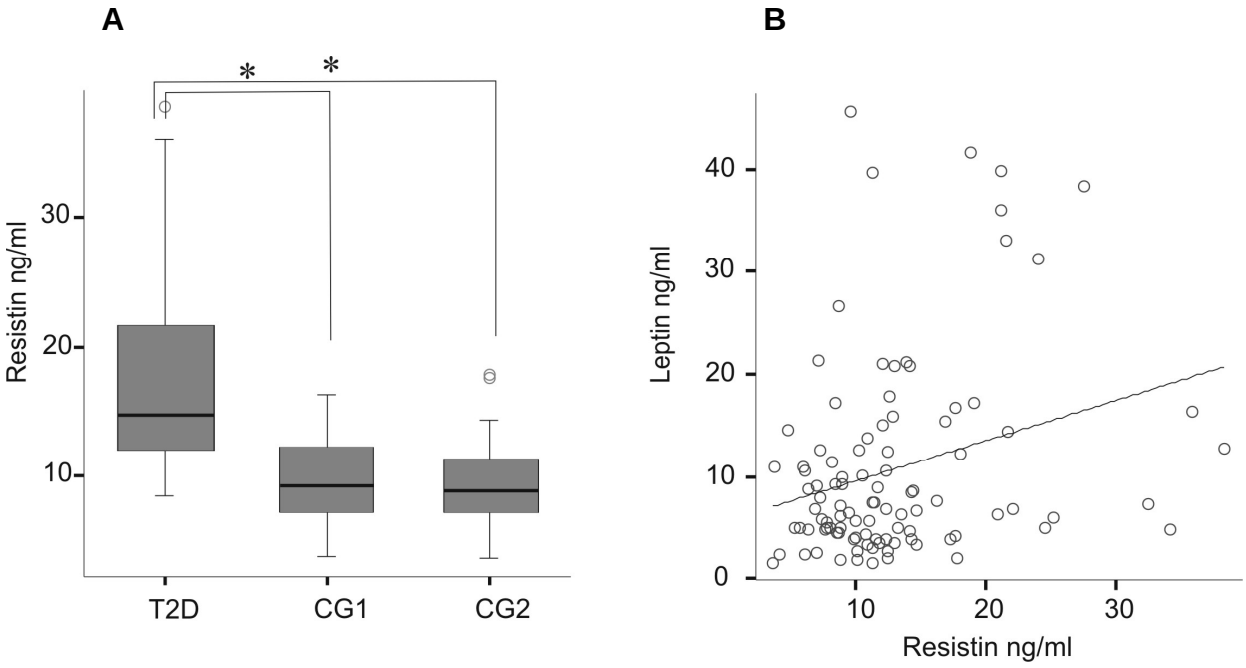


Abb. 24: Resistinkonzentration in ng/ml im Plasma von Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen (CG1) und normalgewichtigen Kontrollen (CG2) (A). Korrelation der Leptinkonzentration zur Resistinkonzentration im Plasma (p = 0,007; r = 0,33) (B)

3.5.4 Der Adiponektinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Bei 104 Probanden wurde der Plasmaspiegel des Adiponektins zunächst mit einem ELISA der Firma R&D Systems bestimmt. Der Median der Adiponektinsspiegel im Kollektiv T2D lag bei 2,8 µg/ml (0,8 – 10,6). Die mediane Konzentration der übergewichtigen Kontrollen lag bei 2,8 µg/ml (1,2 – 8,5) und der normalgewichtigen Kontrollen bei 2,6 µg/ml (1,0 – 9,4) Adiponektin im Plasma.

Das Gesamtadiponektin zeigte keine signifikanten Unterschiede in den drei Kollektiven. Der Adiponektinspiegel im Plasma korrelierte weder mit dem Gewicht, dem Bauchumfang, dem Hüftumfang noch der der WHR. Auch eine Korrelation mit einem anderen der gemessenen Plasmafaktoren konnte nicht gezeigt werden.

Da in der Literatur erniedrigte Adiponektinspiegel bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu Kontrollen beschrieben sind, wurden zur Verifizierung der Ergebnisse alle Proben mit Hilfe eines hochsensitiven ELISAs der Firma Mediagnost nachgemessen. Der Median der HMW-Adiponektinkonzentrationen lag auch hier mit 5,1 µg/ml (0,0 – 17,4) bei den Typ 2 Diabetikern leicht über dem der übergewichtigen Kontrollen mit 4,59 µg/ml (1,83 – 11,56) und den normalgewichtigen Kontrollen mit 4,64 µg/ml (2,0 – 20,1). Es ergaben sich auch mit diesem ELISA keine signifikanten Unterschiede.

3.5.5 Der Aktivin-A-Spiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Der Aktivin-A-Spiegel wurde im Plasma von 68 Spendern gemessen. Dabei ergab sich bei den T2D Patienten ein medianer Wert von 242,0 pg/ml (36,5 – 577,3). Im Kollektiv CG1 lag der Median der Aktivin-A-Spiegel im Plasma bei 222,1 pg/ml (114,5 – 533,9) und im CG2 Kollektiv bei 183,7 pg/ml (35,0 – 937,8).

Es ergaben sich keine Unterschiede des Aktivin-A-Spiegels bei den drei Kollektiven. Eine Korrelation mit dem Gewicht, dem Hüft- und Bauchumfang oder dem BMI und der WHR der Probanden wurde nicht gefunden. Auch eine Korrelation mit den übrigen gemessenen Plasmafaktoren konnte nicht gezeigt werden.

3.5.6 Der Follistatinspiegel im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Der Follistatinspiegel wurde im Plasma von 103 Probanden bestimmt. Im Kollektiv T2D ergab sich eine mediane Konzentration von 2086,0 ng/ml (749,9 – 8558,3) Follistatin im Plasma. Das Plasma der Kontrollkollektive enthielt mit 1996,0 ng/ml (37,9 – 3848,0) (CG1) und 2073,0 ng/ml (806,0 – 5123,0) (CG2) weniger Follistatin, ohne dabei aber einen signifikanten Unterschied aufzuweisen.

Da die Follistatinwerte über einen weiten Bereich streuten, wurden die Berechnungen mit dem dekadischen Logarithmus durchgeführt. Es fand sich hierbei eine positive Korrelation des Follistatinspiegels im Plasma zum Adiponektinspiegel im Plasma (Abbildung 25) ($p < 0,0001$, $r = 0,349$).

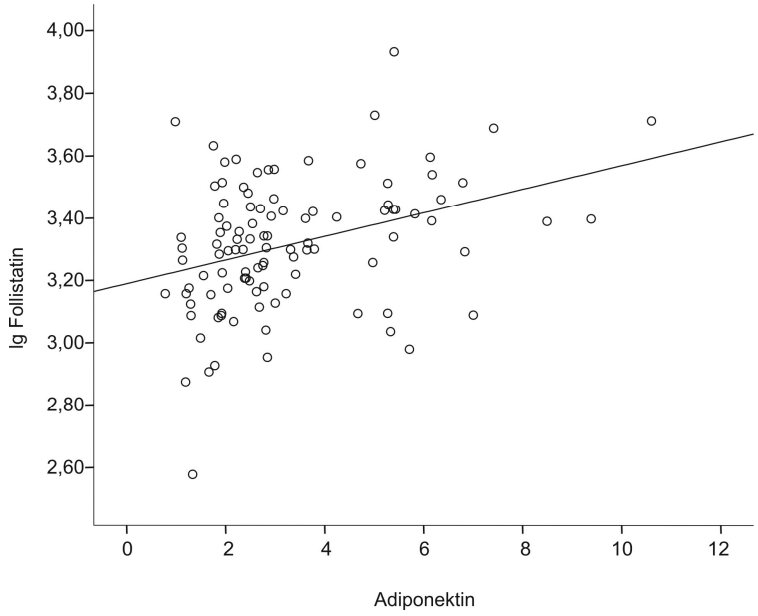


Abb. 25: Korrelation von Adiponektin zum Logarithmus der Follistatinmenge im Serum

Ferner bestand eine positive Korrelation des Plasma- Follistatinspiegels zum Gewicht der Probanden ($p = 0,008$; $r = 0,260$).

Um die hemmende Wirkung des Follistatins auf die systemische Aktivität des Aktivin A zu berücksichtigen, wurden aus den Plasmakonzentrationen die Quotienten Aktivin A zu Follistatin gebildet. Dieser Quotient wurde mit den anthropometrischen Daten und den übrigen Plasmafaktoren in Bezug gesetzt, es konnten jedoch keinerlei Korrelationen gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Erhöhte mRNA-Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in den Monozyten von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen

Studien über die Expression der Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in unterschiedlichen Geweben und bei Probanden unterschiedlichen Ernährungszustandes haben bisher sehr konträre Ergebnisse gebracht. Eine mexikanische Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte AdipoR1 und AdipoR2 Genexpression in der Skelettmuskulatur bei Verwandten ersten Grades von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu Mitgliedern nicht vorbelasteter Familien feststellen [23]. Dagegen konnte eine deutsche Arbeitsgruppe eine negative Korrelation zwischen der AdipoR1-Expression in Myotuben und der Insulinsensitivität nachweisen [24]. Die Arbeitsgruppe um Alberti beschäftigte sich mit der AdipoR1 und AdipoR2 Expression in Lymphozyten erwachsener, übergewichtiger Probanden im Vergleich zu anorektischen Patientinnen und konnte eine erhöhte AdipoR1 und AdipoR2-Expression übergewichtiger Probanden im Vergleich zu anorektischen Patienten zeigen [25]. Bisher wurde gezeigt, dass humane Makrophagen beide Adiponektinrezeptoren exprimieren, wobei AdipoR1 eine höhere Expression als AdipoR2 zeigte [26]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, die AdipoR1-mRNA ist etwa 2-fach mehr vorhanden als die AdipoR2-mRNA. Daten zur differentiellen Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in humanen Blutmonozyten von Typ 2 Diabetes Patienten wurden bisher nicht publiziert. Hier konnte nachgewiesen werden, das ähnlich wie für Lymphozyten gezeigt, eine erhöhte AdipoR1- und AdipoR2-Expression bei Monozyten von übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu Probanden mit einer WHR kleiner als eins vorliegt. Monozyten von Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus haben ebenfalls mehr AdipoR1- und AdipoR2-mRNA im Vergleich zu schlanken Spendern. Die Expression ist jedoch ähnlich derer, der Monozyten von übergewichtigen Probanden. Während die Arbeitsgruppe um Staiger eine positive Korrelation der AdipoR1-Expression im Muskel mit dem Insulinspiegel, dem Plasmacholesterin, den Plasmatriglyzeriden und der First-Phase-Insulinsekretion fand, konnte in dieser Arbeit eine positive Korrelation der monozytären AdipoR1-Expression mit der WHR gezeigt werden [24]. Dies könnte für

eine durch Fettgewebsmediatoren vermittelte Regulation der Rezeptorenexpression sprechen. Sowohl in der Skelettmuskulatur als auch in Lymphozyten und Monozyten zeigte sich eine starke Korrelation der mRNA beider Rezeptoren und lässt somit eine Koregulation beider Rezeptoren vermuten [24; 25].

4.2 Adiponektin erhöht die Expression von AdipoR1 und AdipoR2 in primären Monozyten in vitro

Im Vergleich zu Kontroll-kultivierten Monozyten konnte eine Zunahme der mRNA-Expression beider Rezeptoren durch Adiponektin detektiert werden. Eine schwache Korrelation der Rezeptorenexpression mit dem systemischen Adiponektinspiegel konnte jedoch nur für AdipoR1 festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass das systemische Adiponektin nicht wesentlich für die Regulation von AdipoR1 und AdipoR2 in den Monozyten verantwortlich ist.

4.3 Erhöhte IL-6-Sekretion bei primären Monozyten von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Probanden im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden

Wie bereits in den einleitenden Abschnitten erwähnt, führt eine vermehrte Ablagerung von weißem Fettgewebe zu einer gering ausgeprägten systemischen Entzündungsreaktion mit einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie dem IL-6. So konnten Fernandez-Real et al. eine positive Korrelation des IL-6-Spiegels im Plasma mit der Ganzkörperfettmasse und Andreozzi et al. sowohl mit dem BMI als auch der Insulinsekretion bei gesunden männlichen Probanden messen [27; 28]. Eine deutsche Gruppe fand zusätzlich erhöhte IL-6-Spiegel bei Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus beziehungsweise einer gestörten Glukosetoleranz [29].
In dieser Arbeit konnte eine vermehrte IL-6-Produktion in primären Monozyten von Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Probanden im Vergleich zu normalgewichtigen Pobanden gezeigt werden. Dies spricht für eine Aktivierung des zellulären Immunsystems und einen möglichen Beitrag an den erhöhten IL-6-Plasmaspiegeln in übergewichtigen Probanden und Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus. Ferner konnte wie in der Arbeit von Andreozzi et al. eine Korrelation des IL-6-Spiegels im Plasma mit dem BMI gezeigt werden [28]. Zusammen mit der Erkenntnis, dass eine vermehrte stammbetonte Fetteinlagerung das Einwandern von

aktivierten Makrophagen in das weiße Fettgewebe bewirkt, die dort vermehrt IL-6 freisetzen, lässt sich so der Zusammenhang zwischen erhöhtem BMI und erhöhtem systemischen IL-6-Spiegeln erklären.

4.4 Die monozytäre IL-6-Sekretion nimmt nach Inkubation mit LMW-Adiponektin ab

Während Adiponektin per se eine antiatherogene und antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird, hatten Vorversuche innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt, dass die IL-6-Produktion primärer Monozyten und THP-1 Zellen durch die Inkubation mit HMW-Apm deutlich zunahm [22; 30]. Um nun auch die Effekte der anderen Isoformen von Adiponektin auf die Expression des proinflammatorischen IL-6 zu differenzieren, wurden primäre Monozyten mit in Insektenzellen erzeugtem rekombinanten LMW-Apm inkubiert. Die signifikante Abnahme der IL-6-Expression auf 78% zeigt das unterschiedliche Wirkspektrum der verschieden Isoformen des Adiponektins. Die LMW-Isoform des Adiponektins führt bei Monozyten zu einer Herunterregulation von IKKß und damit zu einer verminderten Translokation von NF-κB p65 in den Zellkern [22]. Im Mausmodell konnte von Arkan et al. gezeigt werden, dass Mäuse mit Monozyten ohne IKKß vor einer Insulinresistenz geschützt waren [31]. Diese Ergebnisse zeigen, dass das HMW-Apm, wie in manchen Arbeiten vermutet wird, nicht die einzige biologisch aktive Form des Adiponektins darstellt, sondern auch die trimere Isoform aktiv in die Immunmodulation der Monozyten eingreifen kann. Pajvani et al. vermuten sogar, dass die HMW-Form des Adiponektins eine Art Vorstufe anderer aktiver kurzlebiger Metaboliten, wie dem LMW-Apm darstellt, die durch proteolytische Spaltung aus dem HMW-Apm entstehen [32].

Grundsätzlich scheint Adiponektin nicht, wie zunächst vermutet, ausschließlich antiinflammatorische Eigenschaften zu besitzen, sondern viel mehr eine immunmodulatorische Funktion auszuüben.

4.5 Serumspiegel von Adiponektin und dessen Isoformen bei Typ 2 Diabetikern, normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Um die genaue Verteilung der Adiponektin Isoformen im Serum von Typ 2 Diabetikern und Kontrollen mit dem Serumspiegel des Gesamtadiponektins in Bezug setzen zu können, wurden die Isoformen mit Hilfe eine ELISAs bestimmt.

Bei den Serumspiegeln des Gesamtadiponektins konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Typ 2 Diabetikern, übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen festgestellt werden. Lediglich ein Trend zu erniedrigten Adiponektinkonzentrationen im Kollektiv T2D spiegelte die in der Literatur beschriebene Hypoadiponektinämie bei Typ 2 Diabetikern bzw. bei Adipositas wieder [15].

Auch eine Erweiterung des Kollektivs konnte nicht die erwarteten erniedrigten Adiponektinspiegel bei Typ 2 Diabetikern zeigen. Dies mag bei 100 Probanden zum einen an einer zu geringen Anzahl an Probanden liegen, zum anderen wäre jedoch auch eine genauere Differenzierung des metabolischen Profils der Kontrollen anhand eines oralen Glukose-Toleranz-Testes hilfreich gewesen, um vor allem in der Gruppe der übergewichtigen Kontrollen eine falsche Kollektivzuordnung zu vermeiden. Da es jedoch sehr schwierig war geeignete Kontrollpersonen ohne nennenswerte Erkrankungen zu rekrutieren wäre die Zahl derer durch die Maßnahme eines 2h OGTT noch weiter gesunken. Des Weiteren wurden keine Unterschiede zum Kollektiv der normalgewichtigen Kontrollen gefunden. Da sich Leptin im Serum jedoch wie erwartet verhielt, muss angenommen werden, dass der Adiponektinserumspiegel eine geringere Assoziation zum BMI und der Erkrankung an T2D zeigt als Leptin.

Bei der genaueren Differenzierung der Adiponektinisoformen ergab sich bei der HMW -Form ein ähnliches Bild wie für das Gesamtadiponektin. Auch hier fanden sich leicht erhöhte Spiegel bei normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Das MMW-Apm war signifikant niedriger in der Gruppe der Typ 2 Diabetiker im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen. Die LMW-Apm Serumspiegel waren bereits in den übergewichtigen Kontrollen geringer als im Kollektiv der normalgewichtigen Kontrollen, während die Kollektive der Typ 2 Diabetiker und der übergewichtigen Kontrollen ähnliche Konzentrationen aufwiesen.

Das Gesamtadiponektin korrelierte mit der HMW-Form und der MMW-Form im Serum. Dem HMW-Apm wird ein höherer prädiktiver Wert für die Insulinresistenz und kardiovaskuläre Krankheiten zugeschrieben als dem Gesamtadiponektin. So bestand eine negative Korrelation des Gesamt- und des HMW- Adiponektinspiegels, nicht aber der LMW-Apm-Spiegel und MMW-Apm-Spiegel, im Serum eines Kollektivs thailändischer Typ 2 Diabetiker und Kontrollen mit dem gemessenen Nüchternblutzucker, HOMA-Index, BMI und Triglyzeriden, also den Indikatoren des metabolischen Syndroms [33].

Während also die Funktion des HMW-Apm schon genauer beleuchtet werden konnte, fehlen Arbeiten über die genaue Wirkweise der anderen Isoformen. Die LMW-Form scheint sowohl in vitro als auch in vivo antiinflammatorische Effekte auszuüben.

4.6 Adiponektin erhöht die Aktivin-A-Expression und -Sekretion in primären Monozyten

Durch eine 24-stündige Inkubation primärer Monozyten mit Adiponektin stieg die Aktivin-A-Sekretion auf Proteinebene um den Faktor 2,93 und auf RNA-Ebene um den Faktor 3,6 an. Aktivin A gehört zur Transforming growth factor ß (TGFß) Familie, einer Superfamilie mit mehr als 40 Mitgliedern und wurde zunächst in seiner Funktion als Stimulator des im Vorderlappen der Hypophyse produzierten Follikel stimulierenden Hormons (FSH) entdeckt [34].

In verschiedenen Studien konnte weiterhin eine erhöhte Aktivin-A-Expression bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der rheumatoiden Arthritis und der Septikämie festgestellt werden. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von 100 µg LPS die Aktivin A-Konzentration im Serum innerhalb der ersten Stunde nach Injektion massiv anstieg und innerhalb von fünf bis acht Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückging. Diese starke Zunahme der Expression von Aktivin A basiert auf einer Aktivierung des TLR4 und des Adaptorproteins myeloischer Differenzierungsfaktor 88 (MyD88). Verglichen mit anderen Entzündungsmediatoren entsprach der rasche Anstieg innerhalb der ersten Stunde, dem des TNF-α und war zeitlich deutlich vor dem Anstieg von IL-6 und IL-1ß einzuordnen [34; 35]. Da Aktivin A die Sekretion von IL-1ß vermindert und die Freisetzung des IL-1-Rezeptor-Antagonisten in Monozyten induziert, wird angenommen dass Aktivin A

antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. Eine japanische Forschungsgruppe fand weiterhin heraus, dass Aktivin A über die Regulation der Phagozytose und der Expression des Scavenger Rezeptors die Schaumzellbildung im Rahmen der Arteriosklerose verhindert und somit auch antiatherogene Eigenschaften besitzt [36]. Inwieweit die Induktion von Aktivin A zu einer Verminderung der Schaumzellbildung und zur Erhöhung der IL-1 Rezeptor Antagonisten Freisetzung beiträgt, die als Funktion von Adiponektin beschrieben sind, beiträgt muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.7 Monozyten exprimieren kein Follistatin

Die Wirkung von Aktivin A kann durch die Bindung von Follistatin, ebenfalls einem Mitglied der TGFß Superfamilie, aufgehoben werden. Im Mausmodell erreichte innerhalb einer durch LPS induzierten Entzündungsreaktion Follistatin zwei Stunden nach dem Aktivin A Peak seine Maximalkonzentration. Bei Vorbehandlung von Mäusen mit Follistatin konnte die Lebenszeit nach einer Injektion einer letalen Dosis LPS verlängert werden [34]. Follistatin scheint die Wirkung von Aktivin A zu blockieren und somit antiinflammatorisch tätig zu sein. Hohe Follistatinkonzentrationen wurden bisher in Hoden-, Pankreas- und Herzgewebe gemessen, während systemisches Follistatin zumeist an Aktivin A gebunden vorkommt [37]. Obwohl Monozyten Aktivin A exprimieren, konnte in dieser Arbeit weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene eine Sekretion beziehungsweise Expression des antagonistischen Follistatins festgestellt werden.

4.8 Inkubation mit Adiponektin erhöht die Resistin-Sekretion und -Expression in primären Monozyten

Bei dem Adipokin Resistin handelt es sich um ein Protein bestehend aus 92 Aminosäuren [38]. Für die Resistinbildung sind beim Menschen hauptsächlich Monozyten verantwortlich [39]. Die Arbeitsgruppe um Silswal konnte zeigen, dass es bei einer Inkubation aktivierter primärer Blutmonozyten mit Resistin zu einer Zunahme der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und Interleukin-12 kommt. Auch wurde eine direkte Korrelation zwischen dem Serumresistinspiegel und dem Entzündungsmarker CRP beziehungsweise eine negative Korrelation des Serumresistinspiegels mit dem Stressmarker Nitrotyrosin gefunden [38]. Diese

Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Resistin im Rahmen von Entzündungen vermehrt von Makrophagen sezerniert wird und auch eine antioxidative Funktion wahrnimmt [40].
In dieser Arbeit wurde eine signifikante Zunahme der Resistin-Sekretion und Expression primärer Monozyten nach Inkubation mit Adiponektin gefunden. Es wurde jedoch nicht untersucht ob Resistin auch autokrin beziehungsweise parakrin auf die Monozyten wirkt bzw. ob die Resistinfreisetzung in den 3 Kollektiven unterschiedlich ist.

4.9 Plasmaspiegel verschiedener Adipokine bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

4.9.1 Erhöhte Leptinplasmaspiegel bei Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen

Nach dessen Klonierung 1994 haben sich viele Studien mit der Rolle des Leptins im Rahmen verschiedener Ernährungszustände beschäftigt. Dabei fand man heraus, dass sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen der Leptinspiegel im Plasma stark mit dem BMI korreliert. Eine Mutation des Leptingens bei ob/ob Mäusen beziehungsweise des Leptinrezeptorgens bei db/db Mäusen führte dagegen zur massiven Fettleibigkeit der Mäuse. Zwar sind Defekte des Leptingens beim Menschen relativ selten; doch konnte bei diesen, wie im Tiermodell, durch rekombinantes Leptin eine Reduktion des Gewichts und eine Verbesserung der Stoffwechsellage erreicht werden. Bei Fettleibigkeit ohne dem Vorliegen eines Defekts des Leptingens sind durch die vermehrte Leptinproduktion des Fettgewebes die Leptinspiegel bereits erhöht, und es bildet sich eine Leptinresistenz, die eine Therapie mit Leptin nicht sinnvoll macht [14; 41].
In dieser Arbeit bestätigte sich, dass der Leptinspiegel mit dem BMI korreliert. Ferner korrelierte er sowohl mit dem Bauch- und Hüftumfang als auch mit der WHR. Bei Typ 2 Diabetikern lag er signifikant höher als bei übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen. Dies unterstreicht die enge Korrelation des vom Fettgewebe produzierten Leptins mit dem Ernährungszustand und dem Vorliegen eines Typ 2 Diabetes Mellitus. An der Entstehung der Insulinresistenz scheint Leptin über dessen Fähigkeit zur Modulation der TNF-α Produktion beteiligt zu ein. Bei Ratten und Mäusen kommt

es sowohl bei Fettleibigkeit als auch bei einer Insulinresistenz zu erhöhten TNF-α Spiegeln. Beim Menschen ist die genaue Pathogenese unklar [42].

4.9.2 Erhöhte Resistinspiegel bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen

Reilly et al. fanden bei Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Probanden erhöhte Resistinspiegel im Serum, die positiv mit den Serumspiegeln des löslichen TNF-α-Rezeptors korrelierten [39]. Der TNF-α-Rezeptor gilt als Marker sowohl für die Adipositas als auch für eine Insulinresistenz und dem Vorliegen von Arteriosklerose. Daraus kann man vermuten, dass die durch Resistin im Entzündungszustand induzierte Zytokinexpression über TNF-α zur Insulinresistenz führt [39; 43].
In dem in dieser Arbeit zusammengestellten Plasmakollektiv fanden sich signifikant erhöhte Resistinspiegel bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollen. Die Plasmaspiegel der übergewichtigen Kontrollen waren dagegen nur geringfügig höher als die der normalgewichtigen Probanden. Ferner konnte eine positive Korrelation des Resistinspiegels mit der WHR und dem Bauchumfang festgestellt werden. Die Korrelation mit für die Adipositas wichtigen anthropometrischen Daten wie der WHR und dem Bauchumfang spricht für die Theorie, dass es zunächst im Rahmen vermehrter Adipositas zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommt, die dazu führt, dass Makrophagen vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie etwa das Resistin sezernieren. Das Vorliegen einer Insulinresistenz scheint mit einer Potenzierung dieser Vorgänge verbunden zu sein, was sich an den im Vergleich auch zu übergewichtigen Kontrollen stark erhöhten Resistinplasmaspiegeln zeigt.

4.9.3 Keine signifikanten Unterschiede des Plasmaadiponektins bei Typ 2 Diabetikern und Kontrollen

In verschiedenen Studien wurde in den vergangenen Jahren gezeigt, dass Adiponektin ein Adipozyten-spezifisches Adipokin ist, dessen Plasmakonzentration negativ mit der Insulinsensitivität und dem BMI korrelliert. Ferner fand man in verschiedenen Studien mit Probanden unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit heraus, dass hohe Adiponektinserumspiegel mit einem erniedrigten Risiko an Typ 2 Diabetes zu erkranken vergesellschaftet sind [15; 44].

In dieser Arbeit wurden die Adiponektinspiegel von 43 Typ 2 Diabetikern, 25 Kontrollen mit einer WHR größer als eins und 36 Kontrollen mit einer WHR kleiner als eins bestimmt. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven den Adiponektinspiegel im Plasma betreffend. Auch eine Korrelation zu für die Fettverteilung wichtigen anthropometrischen Daten, wie dem BMI und der WHR, konnte nicht festgestellt werden. Eine erneute Messung mit einem hochsensitiven ELISA einer anderen Firma bestätigte dieses Ergebnis. Hiernach lässt sich die Frage stellen, ob dieses Ergebnis eine Folge der Zusammensetzung oder der Größe des Kollektivs darstellt. Alle Patienten waren über Verlauf ihrer Diabetes Erkrankung, Folgeerkrankungen, Medikation und familiären Hintergrund befragt worden, um eine genauere Charakterisierung der Probanden zu erreichen. Eine exaktere Darstellung der metabolischen Situation der Probanden des Kontrollkollektivs und somit eine eindeutigere Zuordnung wäre mit Hilfe eines OGTTs eventuell hilfreich gewesen. Eine zirkadiane Schwankung des Adiponektinspiegels wurde in einer japanischen Studie widerlegt und ist daher nicht als Erklärung für dieses Ergebnis zu sehen [45]. Selbige Studie konnte auch in einem Kollektiv japanischer Typ 2 Diabetiker und gesunder Kontrollen keine signifikant erniedrigten Adiponektinplasmaspiegel bei Diabetikern ohne kardiovaskuläre Begleiterkrankungen finden. Ein signifikanter Unterschied fand sich erst beim Vergleich der Adiponektinspiegel von Typ 2 Diabetikern mit kardiovaskulären Begleiterkrankungen und gesunden Kontrollen [45]. Dies würde dafür sprechen, dass das Vorhandensein einer Arteriosklerose entscheidender für die Erniedrigung der Adiponektinspiegel bei Typ 2 Diabetikern ist als das alleinige Vorliegen einer Insulinresistenz. Doch auch eine Differenzierung der Kollektive in Probanden mit und ohne koronarer Herzerkrankung konnte keine signifikant erniedrigten Plasmaadiponektinspiegel im Vergleich zu denen gesunder Kontrollen zeigen. Ferner zeigte die Messung der verschiedenen Isoformen des Adiponektins im Serum einer Subgruppe Unterschiede in den Serumspiegeln der einzelnen Isoformen. Nur bei der Messung des LMW-Adiponektins und des MMW-Adiponektins konnten signifikant niedrigere Adiponektinkonzentrationen bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen gezeigt werden. Da nicht klar ist welche Isoformen vornehmlich von unterschiedlichen ELISA-Systemen gemessen werden, ist ein Vergleich mit unterschiedlichen ELISA-Systemen gemessener Daten schwierig.

5 Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war es mit Hilfe von aus Vollblut isolierten primären Monozyten einen genaueren Einblick in deren Rolle bei der Produktion von Entzündungsmediatoren abhängig vom Ernährungszustand und der metabolischen Situation der Probanden zu gewinnen und den Einfluss von Adiponektin auf die Monozytenfunktion zu untersuchen Dazu wurde zunächst die Expression der Adiponektin-Rezeptoren, AdipoR1 und AdipoR2, in primären Monozyten von Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus und geeigneten normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen verglichen. Hierbei konnte eine erhöhte Expression von AdipoR1 und AdipoR2 bei Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen festgestellt werden. Des Weiteren wurde gezeigt dass Adiponektin die mRNA- und Proteinexpression beider Rezeptoren induziert. Eine überzeugend signifikante Korrelation der AdipoR1- und AdipoR2-Expression zu systemischen Adiponektinspiegeln fand sich jedoch nicht, was andeutet, dass der systemische Adiponektinspiegel nicht primär die monozytäre AdipoR1- und AdipoR2-Expression bestimmt.

Anschließend wurde die Auswirkungen einer Inkubation mit Adiponektin auf die Sekretion und Expression des Entzündungsmediators IL-6 durch primäre Monozyten untersucht. Hierbei konnte zunächst eine signifikant erniedrigte IL-6-Freisetzung von Monozyten isoliert aus normalgewichtigen Kontrollen im Vergleich zu Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen festgestellt werden. Es fanden sich ferner positive Korrelationen der IL-6-Konzentration in den Überständen der inkubierten Monozyten zu anthropometrischen Größen des Fettstoffwechsels wie dem BMI, der WHR und dem Bauchumfang. Eine genauere Differenzierung des Effekts von Adiponektin auf die IL-6-Sekretion erfolgte anhand einer Inkubation mit den beiden Isoformen HMW- und LMW-Adiponektin. Nach Inkubation mit HMW-Apm zeigte sich erneut eine Zunahme der IL-6-Produktion während eine Inkubation mit LMW-Apm eine Reduktion der IL-6-Sekretion bewirkte.

Um sich ein Bild über die systemischen Konzentrationen der einzelnen Isoformen des Adiponektins in Bezug zum Gesamtadiponektin zu machen, wurden deren systemische Konzentrationen im Serum von Spendern aller drei Kollektive bestimmt. Hierbei konnten entgegen der Literatur keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kollektiven das Gesamtadiponektin und die HMW-Isoform betreffend

gefunden werden. Es fanden sich jedoch erniedrigte Adiponektinspiegel der LMW- und MMW-Isoformen im Kollektiv der Typ 2 Diabetiker. Eine Korrelation des Gesamtadiponektins ergab sich sowohl mit der MMW-Isoform als auch mit der HMW-Isoform von Adiponektin, nicht jedoch mit der LMW-Isoform.

Der Theorie einer durch Fettgewebe induzierten systemischen Entzündungsreaktion folgend, fanden sich bei Typ 2 Diabetikern und übergewichtigen Kontrollen signifikant höhere IL-6-Konzentration als bei normalgewichtigen Kontrollen. Ferner ergab sich eine negative Korrelation der monozytären IL-6-Freisetzung zur LMW-Isoform des Adiponektins, nicht aber zu den anderen Isoformen und dem Gesamtadiponektin. Dies verdeutlicht den Unterschied zwischen den einzelnen Isoformen und macht eine genauere Differenzierung von Adiponektin und seiner Isoformen in der Rolle als Entzündungsmediatoren notwendig.

Es fanden sich weiterhin sowohl für Aktivin A als auch für Resistin eine signifikant erhöhte Expression und Sekretion nach Inkubation der Monozyten mit Adiponektin im Vergleich zu Kontroll-kultivierten Zellen. Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene konnte der Aktivin A Gegenspieler Follistatin detektiert werden.

Um die systemischen Konzentrationen jener Entzündungsmediatoren und Adipokine in den jeweiligen Kollektiven zu bestimmen wurde eine Plasmabank von insgesamt 104 Probanden erstellt und darin die Konzentrationen dieser Proteine bestimmt. Zur Validierung des Plasmakollektivs wurde zunächst die Leptinkonzentration bestimmt, da es sich bei Leptin um ein bereits gut erforschtes Adipokin handelt und entsprechende Referenzliteratur vorhanden ist. Wie in der Literatur beschrieben fanden sich signifikant erhöhte Leptinkonzentrationen im Plasma von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu beiden Kontrollkollektiven. Ferner korrelierte der Leptinspiegel im Plasma positiv mit dem BMI, der WHR, dem Bauch- und dem Hüftumfang. Die Bestimmung der Resistinkonzentrationen ergab signifikant erhöhte Plasmaspiegel bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu beiden Kontrollkollektiven und eine positive Korrelation zur WHR und dem Bauchumfang. Eine erwartete Hypoadiponektinämie bei Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus oder eine Korrelation des Adiponektinspiegels zu anthropometrischen Größen der Fettverteilung konnte nicht nachgewiesen werden

6 Literaturverzeichnis

[1] C. Day, Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. Diab Vasc Dis Res 4 (2007) 32-8.
[2] G. Herold, Innere Medizin, Herold, G., Köln, 2007.
[3] 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) 1796-808.
[4] A.A. Nanji, and J.B. Freeman, Relationship between body weight and total leukocyte count in morbid obesity. Am J Clin Pathol 84 (1985) 346-7.
[5] A.H. Berg, and P.E. Scherer, Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res 96 (2005) 939-49.
[6] D.M. Tsukumo, M.A. Carvalho-Filho, J.B. Carvalheira, P.O. Prada, S.M. Hirabara, A.A. Schenka, E.P. Araujo, J. Vassallo, R. Curi, L.A. Velloso, and M.J. Saad, Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 56 (2007) 1986-98.
[7] I. Harman-Boehm, M. Bluher, H. Redel, N. Sion-Vardy, S. Ovadia, E. Avinoach, I. Shai, N. Kloting, M. Stumvoll, N. Bashan, and A. Rudich, Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. J Clin Endocrinol Metab 92 (2007) 2240-7.
[8] S.E. Shoelson, J. Lee, and A.B. Goldfine, Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest 116 (2006) 1793-801.
[9] H. Greten, Innere Medizin Verstehen-Lernen-Anwenden, Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
[10] G.S. Hotamisligil, and B.M. Spiegelman, Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. Diabetes 43 (1994) 1271-8.
[11] R. Feinstein, H. Kanety, M.Z. Papa, B. Lunenfeld, and A. Karasik, Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. J Biol Chem 268 (1993) 26055-8.
[12] K.N. Frayn, P. Arner, and H. Yki-Jarvinen, Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. Essays Biochem 42 (2006) 89-103.
[13] D.H. Endemann, and E.L. Schiffrin, Endothelial dysfunction. J Am Soc Nephrol 15 (2004) 1983-92.
[14] G. Fantuzzi, Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol 115 (2005) 911-9; quiz 920.
[15] D.K. Oh, T. Ciaraldi, and R.R. Henry, Adiponectin in health and disease. Diabetes Obes Metab 9 (2007) 282-9.

[16] H. Waki, T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, and T. Kadowaki, Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. J Biol Chem 278 (2003) 40352-63.

[17] J. Capeau, The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. J Hepatol 47 (2007) 736-8.

[18] T. Kadowaki, and T. Yamauchi, Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev 26 (2005) 439-51.

[19] 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) 30817-22.

[20] T. Yamauchi, Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki, Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat Med 13 (2007) 332-9.

[21] C.J. Behre, Adiponectin, obesity and atherosclerosis. Scand J Clin Lab Invest 67 (2007) 449-58.

[22] 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) 803-8.

[23] A.E. Civitarese, C.P. Jenkinson, D. Richardson, M. Bajaj, K. Cusi, S. Kashyap, R. Berria, R. Belfort, R.A. DeFronzo, L.J. Mandarino, and E. Ravussin, Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. Diabetologia 47 (2004) 816-20.

[24] H. Staiger, S. Kaltenbach, K. Staiger, N. Stefan, A. Fritsche, A. Guirguis, C. Peterfi, M. Weisser, F. Machicao, M. Stumvoll, and H.U. Haring, Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. Diabetes 53 (2004) 2195-201.

[25] L. Alberti, L. Gilardini, A. Girola, M. Moro, F. Cavagnini, and C. Invitti, Adiponectin receptors gene expression in lymphocytes of obese and anorexic patients. Diabetes Obes Metab 9 (2007) 344-9.

[26] 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) 151-8.

[27] J.M. Fernandez-Real, M. Vayreda, C. Richart, C. Gutierrez, M. Broch, J. Vendrell, and W. Ricart, Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. J Clin Endocrinol Metab 86 (2001) 1154-9.

[28] F. Andreozzi, E. Laratta, M. Cardellini, M.A. Marini, R. Lauro, M.L. Hribal, F. Perticone, and G. Sesti, Plasma interleukin-6 levels are independently associated with insulin secretion in a cohort of Italian-Caucasian nondiabetic subjects. Diabetes 55 (2006) 2021-4.

[29] S. Muller, S. Martin, W. Koenig, P. Hanifi-Moghaddam, W. Rathmann, B. Haastert, G. Giani, T. Illig, B. Thorand, and H. Kolb, Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. Diabetologia 45 (2002) 805-12.

[30] R. Tarquini, C. Lazzeri, G. Laffi, and G.F. Gensini, Adiponectin and the cardiovascular system: from risk to disease. Intern Emerg Med 2 (2007) 165-76.

[31] M.C. Arkan, A.L. Hevener, F.R. Greten, S. Maeda, Z.W. Li, J.M. Long, A. Wynshaw-Boris, G. Poli, J. Olefsky, and M. Karin, IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. Nat Med 11 (2005) 191-8.

[32] U.B. Pajvani, X. Du, T.P. Combs, A.H. Berg, M.W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee, and P.E. Scherer, Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications fpr metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem 278 (2003) 9073-85.

[33] Y. Liu, R. Retnakaran, A. Hanley, R. Tungtrongchitr, C. Shaw, and G. Sweeney, Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects. J Clin Endocrinol Metab 92 (2007) 4313-8.

[34] K.L. Jones, A. Mansell, S. Patella, B.J. Scott, M.P. Hedger, D.M. de Kretser, and D.J. Phillips, Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (2007) 16239-44.

[35] D.J. Phillips, K.L. Jones, J.Y. Scheerlinck, M.P. Hedger, and D.M. de Kretser, Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. Mol Cell Endocrinol 180 (2001) 155-62.

[36] K. Kozaki, M. Akishita, M. Eto, M. Yoshizumi, K. Toba, S. Inoue, M. Ishikawa, M. Hashimoto, T. Kodama, N. Yamada, H. Orimo, and Y. Ouchi, Role of activin-A and follistatin in foam cell formation of THP-1 macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (1997) 2389-94.

[37] A. Mukherjee, Y. Sidis, A. Mahan, M.J. Raher, Y. Xia, E.D. Rosen, K.D. Bloch, M.K. Thomas, and A.L. Schneyer, FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (2007) 1348-53.

[38] N. Silswal, A.K. Singh, B. Aruna, S. Mukhopadhyay, S. Ghosh, and N.Z. Ehtesham, Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun 334 (2005) 1092-101.

[39] M.P. Reilly, M. Lehrke, M.L. Wolfe, A. Rohatgi, M.A. Lazar, and D.J. Rader, Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. Circulation 111 (2005) 932-9.

[40] S. Bo, R. Gambino, A. Pagani, S. Guidi, L. Gentile, M. Cassader, and G.F. Pagano, Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance. Int J Obes (Lond) 29 (2005) 1315-20.

[41] F. Lago, C. Dieguez, J. Gomez-Reino, and O. Gualillo, The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. Cytokine Growth Factor Rev 18 (2007) 313-25.

[42] J.P. Bastard, M. Maachi, C. Lagathu, M.J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau, and B. Feve, Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw 17 (2006) 4-12.

[43] 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.

[44] J.J. Diez, and P. Iglesias, The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. Eur J Endocrinol 148 (2003) 293-300.

[45] K. Hotta, T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa, and Y. Matsuzawa, Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20 (2000) 1595-9.

7 Eigene Publikationen

Schober F, Neumeier M, Weigert J, Wurm S, Wanninger J, Schäffler A, Dada A, Liebisch G, Schmitz G, Aslanidis C, Buechler C.: Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release, Biochem Biophys Res Commun 361 (2007) 968-973.

Weigert J, Neumeier M, Wurm S, Schober F, Wanninger J, Schäffler A, Zeitoun M, Aslanidis C, Buechler C:Reduced response to adiponectin despite higher abundance of adiponectin receptor mRNAs in type 2 diabetic monocytes.
FEBS Lett. 2008 May 28;582(12):1777-82.

Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Schober F, Sporrer D, Weber M, Schramm A, Wurm S, Stögbauer F, Filarsky M, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C.: Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes.
Cytokine. 2009 Feb;45(2):86-91.

Danksagung

Zu Allererst möchte ich Christa Büchler für Ihre Unterstützung und Ihre schnellen und zuverlässigen Korrekturen bedanken. Dies ist auf keinen Fall selbstverständlich und verdient großen Respekt. Durch sie und Ihre Doktoranden Johanna Weigert, Sabrina Bauer, Markus Neumeier und Joseph Wanninger war ich rund um die Uhr im Labor gut betreut. Jeder von Ihnen hatte immer ein offenes Ohr für Fragen. Mit kurzen Dreisatzübungen, einem Kurs in Pippettieren für Anfänger und viel Geduld konnten sie mir, als Labor-unerfahrenem Medizindoktoranden, das nötige know-how beibringen.
Diesem Team möchte ich meine Doktorarbeit widmen.
Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich danken, dass sie mir so hilfreich waren bei der Rekrutierung der Probanden. Chris schaffte den Kontakt zur Landshuter Koronarsportgruppe, Susanne und Simone nutzen Familienfeiern um Ihren Lieben ein bisschen Blut abzunehmen und mein Vater überredete sein ganzes Lehrerkollegium sich in der Pause von einer Studentin Blut abnehmen zu lassen. Vielen Dank!

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,15.12.2009 Franziska Schober

Curriculum Vitae	**Franziska Schober**
Persönliche Daten	
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	04.03.1984
Geburtsort	Ebersberg
Zivilstand	ledig
Konfession	römisch-katholisch
Schulausbildung	
1995–2003	Europäisches Gymnasium Leopoldinum, Passau, Allgemeine Hochschulreife: (Note 1,60)
Hochschulausbildung	
2003–2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
13.09.2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „sehr gut" (1,50)
24.11.2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „ sehr gut“ (1,50)
Famulaturen	
03.2009	Prof. Dr. Niederer, Kardiologie und interne Notaufnahme, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg
08.2006	Prof. Dr. Grimm, Allgemeinchirurgie, Klinikum, Passau
03.2007	Dr. Lynch, Gynäkologie und Allgemeinchirurgie, Kitovu Hospital Masaka, Uganda
03.2008	Dres. Biehler, Schneider, Gynäkologie und Geburtshilfe, Evangelisches Krankenhaus, Regensburg
04.2008	Dr. Turnwald, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Kreiskrankenhaus, Bad Reichenhall
Praktisches Jahr	
08.2008–12.2008	Prof. Dr. Meier, medizinische Klinik, Stadtspital Triemli, Zürich
12.2008–01.2009	Prof. Dr. Seelbach-Göbel, Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Schwerpunkt Geburtshilfe, Klinikum St. Hedwig, Regensburg
01.2009–03.2009	Dr. Schnarwyler, Frauenklinik, Spital Zimmerberg, Horgen

03.2009–04.2009	Prof. Dr. Orthmann, Caritas Klinikum St. Josef Regensburg, Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe mit Schwerpunkt Gynäkologie
04.2009–06.2009	Prof. Dr. Zilla, Chris Barnard Division of Cardio-Thoracic Surgery, Groote Schuur Hospital, Kapstadt, Südafrika
06.2009–07.2009	PD Dr. Sido, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg

Dissertation/Publikationen

Dissertation in der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik Regensburg
Einfluss von Adiponektin auf die monozytäre Expression von IL-6, Resistin und Aktivin A

Schober F, Neumeier M, Weigert J, Wurm S, Wanninger J, Schaffler A, Dada A, Liebisch G, Schmitz G, Aslanidis C, Buechler C.
Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release.
Biochem Biophys Res Commun. 2007 Oct; 361 (4): 968-973. Epub 2007 Jul 30.

Weigert J, Neumeier M, Wurm S, Schober F, Wanninger J, Schäffler A, Zeitoun M, Aslanidis C, Buechler C.
Reduced response to adiponectin despite higher abundance of adiponectin receptor mRNAs in type 2 diabetic monocytes.
FEBS Letters 2008 May;582(12):1777-82. Epub 2008 Apr 28.

Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Schober F, Sporrer D, Weber M, Schramm A, Wurm S, Stögbauer F, Filarsky M, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C.
Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes.
Cytokine 2009 Feb;45(2):86-91. Epub 2009 Jan 6.