

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Ambulanzzentrum des UKE

Bereich Endokrinologie/Diabetologie

Ärztliche Leitung: Priv.-Doz. Dr. med. P. Algenstaedt
Priv.-Doz. Dr. med. J. Aberle

Expressionsmuster verschiedener Adipozytokine in humanem, viszeralem Fettgewebe nach einer Inkubation mit Interleukin 6

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Anna Schneider
aus Hannover

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.10.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. P. Algenstaedt

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Merkel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Bühling

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
2. EINLEITUNG	6
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. Reagenzien und Bezugsquellen.....	19
3.1.1. Reagenzien.....	19
3.1.2. Primer	20
3.1.3. Verbrauchsmaterialien	20
3.1.4. Geräte.....	20
3.2. Die Behandlung des Fettgewebes	21
3.3. Molekularbiochemie	22
3.3.1. RNA-Isolierung.....	22
3.3.2. Gelelektrophorese.....	24
3.3.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.....	24
3.3.4. Reverse Transkription	25
3.3.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26
3.3.6. Quantitative Echtzeit PCR.....	26
3.3.7. Vitalitätsnachweis mittels Cell Death Detection ELISA	36
3.3.8. Vitalitätsnachweis mittels Echtzeit PCR	37
3.4. Auswertung und Statistik.....	39
4. ERGEBNISSE	41
4.1. Korrelationsanalyse zwischen dem BMI und der mRNA Expression verschiedener Adipozytokine	41
4.2. Korrelationsanalyse zwischen der WHR und der mRNA Expression verschiedener Adipozytokine	43
4.3. Korrelationsanalyse zwischen CRP und Nüchtern-Glukose im Plasma und der mRNA Expression verschiedener Adipozytokine	43
4.4. Adiponectin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden	43
4.5. TNF- α mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden	43
4.6. Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden	43
4.7. Adiponectin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden	44
4.8. TNF- α mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden	45

4.9. Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden	46
4.10. Vitalitätsnachweis mittels Cell-Death-ELISA	47
4.11. Vitalitätsnachweis mittels Echtzeit PCR	47
5. DISKUSSION.....	48
6. ZUSAMMENFASSUNG	54
7. REFERENZEN	56
8. ABKÜRZUNDSVERZEICHNIS	65
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	68
10. DANKSAGUNG	69
11. LEBENSLAUF	70
12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	72

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und inwiefern das Adipozytokin Interleukin 6 im humanen viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger, stoffwechselgesunder bzw. übergewichtiger, stoffwechselgesunder Personen Einfluss auf die Genexpression der Adipozytokine Adiponectin, TNF- α und Visfatin nimmt. Dabei soll überprüft werden, ob ein Unterschied in den Regulationsmechanismen normalgewichtiger und übergewichtiger Personen besteht.

Des Weiteren soll anhand einer Korrelationsanalyse getestet werden, ob ein Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen Parametern, wie BMI, WHR, CRP und Nüchtern-Glukose im Plasma und der Genexpression der unterschiedlichen Adipozytokinen besteht. Durch Regulationsmechanismen könnte dem Adipozytokin IL-6 vor allem vor dem Hintergrund einer subklinischen chronischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe, eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes und des Metabolischen Syndroms zukommen.

2. EINLEITUNG

Präadipositas und Adipositas und die damit verbundenen Folgeerkrankungen wie Typ-2-Diabetes, haben in Deutschland in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen (Helmert and Strube 2004). In Deutschland haben mittlerweile zwei Drittel der Männer und die Hälfte der Frauen Übergewicht und mehr als jeder fünfte leidet an Adipositas. Die Tendenz ist weiterhin steigend (Deutsche-Gesellschaft-für-Ernährung 2008). Die Adipositas-Prävalenz ist in den Industriestaaten auf etwa 20% gestiegen (Adams, Schatzkin et al. 2006). Die Gesamtmortalität ist bei Adipositas mit mehr als 20% deutlich erhöht (Benecke, Topak et al. 2000). Auch im Kindes- und Jugendalter ist ein dramatischer Anstieg von Übergewicht und Adipositas zu verzeichnen. So sind laut Berichten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in Deutschland 17% der unter 15-jährigen Jungen und 7% der Mädchen übergewichtig (WHO 2007).

Präadipositas wird als ein Body Mass Index (BMI) von 25 kg/m² – 30 kg/m² definiert. Von Adipositas spricht man ab einem BMI >30 kg/m². Adipositas stellt also ein großes soziales und sozioökonomisches Problem dar und die Daten unterstreicht den gesundheitspolitischen Handlungsbedarf (Gesundheitsbericht des Bundes 2006). Übergewicht und Adipositas führen zu einer Reihe von Begleit- und Folgeerkrankungen wie Diabetes/Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen und das dadurch bedingte erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Gelenkschäden und einige Krebserkrankungen (WHO 2003; Bray 2004; Batsis, Nieto-Martinez et al. 2007). Häufig kommt es zum Metabolischen Syndrom.

Das Metabolische Syndrom ist definiert als das Zusammentreffen von mindestens drei der folgenden Kriterien. Zentrale Adipositas gemessen in Form des Taillenumfangs von mehr als 102 cm bei Männern und mehr als 88 cm bei Frauen, nüchtern gemessene Triglyzeride im Plasma von größer oder gleich 150 mg/dl, HDL im Plasma von weniger als 40 mg/dl bei Männern oder weniger als 50 mg/dl bei Frauen, Blutdruck größer oder gleich 130/85 mmHg, wobei es ausreicht, wenn der systolische oder der diastolische Wert überschritten wird und Nüchternblutzucker größer oder gleich 110 mg/dl (Sutherland, McKinley et al. 2004; Grundy, Cleeman et al. 2005; Beltowski 2006).

Übergewicht und Adipositas stellen die wichtigsten Risikofaktoren für Typ-2-Diabetes dar. Pathogenetisch spielt bei Typ-2-Diabetes vor allem die Insulinresistenz eine wichtige Rolle. Die Insulinresistenz greift mit Prä-Rezeptordefekten, Rezeptordefekten mit Downregulation und Postrezeptordefekten in die Signaltransduktion der Zelle ein. (Herold 2006). Nach Angaben der Deutschen Diabetes-Union sind in Deutschland ca.

sechs Millionen Menschen an Diabetes erkrankt, wovon 90% der Typ-2-Diabetes ausmacht. Gewichtsinduzierte Erkrankungen sind in Deutschland eines der zentralen Probleme des Gesundheitssystems. Sie belasten die Ausgaben der Gesetzlichen Krankenversicherungen mit steigender Anzahl (Hauner, Bramlage et al. 2008). Bei 58% der Versicherten mit Typ-2-Diabetes tritt zusätzlich eine und bei 25% zwei oder mehr behandlungsbedürftige Komplikationen auf (Nichols, Arondekar et al. 2008).

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass Übergewicht mit einem stark erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes einhergeht. In den letzten 10 Jahren konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei Fettgewebe nicht nur um einen Energiespeicher handelt, sondern dass Fettgewebe und viszerales Fettgewebe im Besonderen ein hormonaktives Organ ist, welches Proteine sezerniert und so einen entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus nimmt (Arita, Kihara et al. 1999). So besteht zum Beispiel eine positive Korrelation zwischen der Menge an viszeralem Fettgewebe und einer verminderten Glukosetoleranz im Zusammenhang mit einer Hyperinsulinämie im oralen Glukosetoleranztest (Pouliot, Despres et al. 1992; Wajchenberg 2000).

Vermehrtes abdominales/zentrales Fettgewebe geht häufiger mit einer erhöhten Mortalität einher, als vermehrtes subkutanes/peripheres Fettgewebe (Ohlson, Larsson et al. 1985; Donahue, Abbott et al. 1987; Vague 1996). Neuere Studien verwenden zur genaueren Differenzierung zwischen abdominalem und subkutanem Fettgewebe bildgebende Verfahren wie die Computertomographie. Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass der negative Einfluss des abdominalen Fettgewebes vom intraabdominellen Fettdepot ausgeht. So besteht zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen viszeralem abdominalem Fettgewebe und Bluthochdruck, erhöhter Nüchtern glukose, Diabetes und dem Metabolischen Syndrom. Der Einfluss von subkutanem abdominalen Fettgewebe auf Bluthochdruck, erhöhter Nüchtern glukose, Typ-2-Diabetes und dem Metabolischen Syndrom ist dagegen deutlich geringer. Des Weiteren zeigte sich, dass ein hoher Anteil an viszeralem Fettgewebe zu einer Insulinresistenz führt, da er erhöhte Spiegel freier Fettsäuren in der Leber bedingt (Fox, Massaro et al. 2007). Korrelationsanalysen haben gezeigt, dass der Effekt von viszeralem Fettgewebe auf die Glukosetoleranz unabhängig vom Gesamtkörperfettgehalt und dem subkutanen abdominalen Fettgewebe ist (Pouliot, Despres et al. 1992). Neben der Beeinträchtigung der Insulin-Glukose-Homöostase, führt vermehrtes viszerales Fettgewebe auch zu einer Zunahme der Lipoproteine im Plasma (Despres 1991). Auch wenn der genaue Zusammenhang bisher noch nicht geklärt ist, zeigen alle bisherigen Studien, dass vor allem viszerales Fettgewebe ein

wichtiges Bindeglied zwischen den vielen Aspekten des metabolischen Syndroms wie Glukoseintoleranz, Hypertension, Dyslipoproteinämie und Insulinresistenz darstellt (Despres 1994).

Wie Abbildung 1 zeigt, konnten in viszeralem Fettgewebe eine ganze Reihe verschiedener Adipozytokine identifiziert werden; unter ihnen Adiponectin, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Visfatin und Interleukin-6 (IL-6). Diese Stoffwechselforgänge liegen mit großer Wahrscheinlichkeit der Entstehung des Typ-2-Diabetes zugrunde.

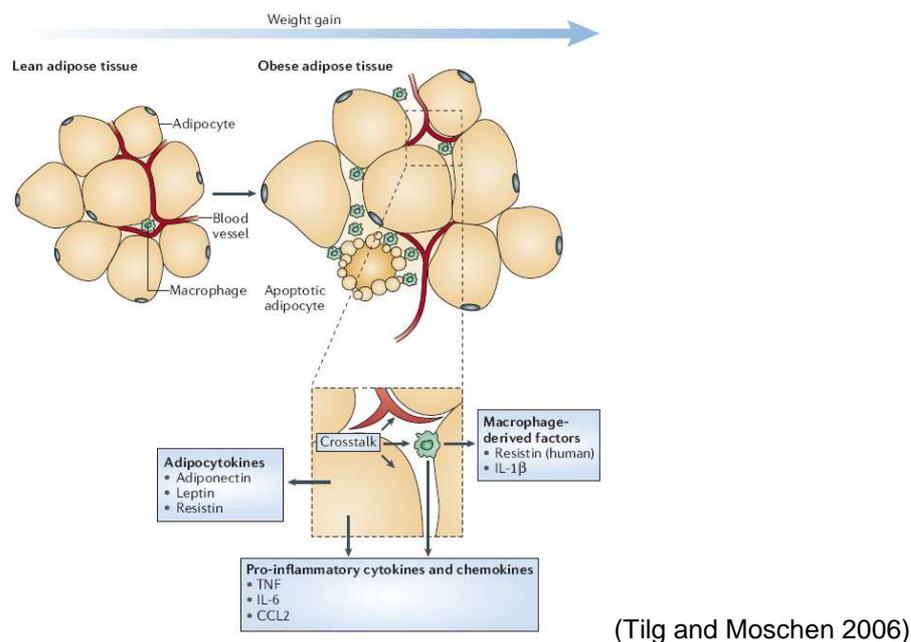


Abbildung 1: Das humane Fettgewebe mit seinen zellulären Komponenten und Zytokinen

Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen einer chronischen systemischen Entzündungsreaktion, ausgehend vom Fettgewebe und Übergewicht besteht. Eine langfristige Aktivierung dieser proinflammatorischen Signalkaskade könnte der auslösende Faktor für die Entwicklung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes sein. Gewichtszunahme ist mit einem Anstieg von inflammation-sensitive plasma proteins (ISPs) assoziiert und IL-6 und TNF- α führen zu einem Anstieg der Synthese von ISPs in der Leber (Engstrom, Hedblad et al. 2003). Eine Studie zeigt, dass bei Typ-2-Diabetikern Akute-Phase-Proteine wie α -1 acid glycoprotein und IL-6 im Vergleich zu Nicht-Diabetikern deutlich erhöht sind und in der Gruppe von Probanden mit Typ-2-Diabetes und Metabolischem Syndrom wiederum höher als in der Gruppe der reinen Diabetiker sind (Xu, Barnes et al. 2003). Eine weitere Studie zeigte, dass mit zunehmendem BMI, waist-to-hip circumference

ratio (WHR) und waist circumference (WC) auch der Gehalt an C-reaktivem Protein (CRP) und IL-6 im Fettgewebe zunimmt (Rexrode, Pradhan et al. 2003). Auch der IL-6-Gehalt im Plasma nimmt in Abhängigkeit von BMI, Körpergewicht und Körperfettanteil zu (Vozarova, Weyer et al. 2001).

Acetylsalicylsäure (ASS) wird unter anderem zur antiinflammatorischen Therapie des Rheumatischen Fiebers und der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe hoher Dosen an ASS der Blutzuckerspiegel gesenkt wird (Xu, Barnes et al. 2003). Dass ein Zusammenhang zwischen einer chronischen Entzündungsreaktion und der Entwicklung einer Insulinresistenz besteht, ist somit vielfach belegt. Welche Rolle jedoch IL-6 in diesem Zusammenhang spielt, wird kontrovers diskutiert. So sind IL-6-Spiegel bei Adipositas grundsätzlich erhöht, was einen pro-diabetogenen Effekt vermuten lässt, eine Studie zeigt jedoch, dass Gewichtsreduktion bei Patienten mit gestörtem Zuckerstoffwechsel die mRNA Expression von IL-1 β , IL-1-Rezeptor-Antagonist und TNF- α in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) reduziert, die Expression von IL-6 jedoch steigert. Auch führt der Anstieg von IL-6-Expression zur Abnahme der Nüchternblutglukosewerte im Plasma (de Mello, Kolehmainen et al. 2008), was wiederum einem anti-diabetogenen Effekt entspräche.

Interleukin-6:

Interleukin-6 ist ein 212 Aminosäuren, 26 kDa großes Zytokin, dass in vielen biologischen Prozessen, wie Entzündungsreaktionen, Immunantwort (Pedersen, Steensberg et al. 2003; Hodge, Hurt et al. 2005; Moller and Villiger 2006), Gehirnfunktionen (Balschun, Wetzel et al. 2004; Craddock and Thomas 2006) und Ermüdungsreaktionen (Spath-Schwalbe, Hansen et al. 1998), eine wichtige Rolle spielt. Viele unterschiedliche Gewebe tragen zum physiologischen IL-6-Plasmaspiegel von ca. 3,0 pg/ml bei (Song, Song et al. 2006). Bis zu 35% stammen aus dem Fettgewebe (Mohamed-Ali, Goodrick et al. 1997; Kern, Ranganathan et al. 2001) und die IL-6-Konzentration in der intestiziellen Flüssigkeit des Fettgewebes ist 50mal höher als im Plasma, was darauf hindeutet, dass IL-6 bei der Regulation dieses Gewebes eine entscheidende Rolle spielen könnte (Andersson, Sopasakis et al. 2007). Während verschiedener Stoffwechsellagen kann die IL-6-Freisetzung unterschiedlicher Gewebe stark variieren. So wird zum Beispiel unter starker körperlicher Belastung die Skelettmuskulatur zum primären IL-6 freisetzenden Organ (Steensberg, van Hall et al. 2000; Franckhauser, Elias et al. 2008). IL-6 wirkt über Rezeptoren, die aus zwei Untereinheiten bestehen: gp130, einem nicht-Liganden-bindenden Protein, welches für

die intrazelluläre Signaltransduktion zuständig ist, und der Liganden-spezifischen Alpha-Kette IL-6R α (auch CD126 genannt) (Kamimura, Ishihara et al. 2003).

Des Weiteren nimmt IL-6 auf den Schlaf-Wach-Rhythmus Einfluss. Die IL-6 Sekretion nimmt in der Nacht zu. Interessanterweise steigt auch die Expression des IL-6-Rezeptors an, was auf eine Erweiterung des IL-6 Einflusses auf peripheres und zentralnervöses Gewebe im Schlaf schließen lässt (Dimitrov, Lange et al. 2006).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Übergewicht und Insulinresistenz mit einem erhöhten IL-6-Spiegel im Serum einhergehen. Diese Erkenntnis führt zu der Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhtem IL-6 und Insulinresistenz besteht (Kern, Ranganathan et al. 2001; Vozarova, Weyer et al. 2001; Bastard, Maachi et al. 2002; Spranger, Kroke et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist in schlanken Verwandten 1. Grades von Typ-2-Diabetikern ebenfalls eine Insulinresistenz nachweisbar, jedoch ohne ein erhöhtes IL-6 (Petersen, Dufour et al. 2004). IL-6 scheint mit dem Alter anzusteigen und nimmt wahrscheinlich Einfluss auf den Alterungsprozess (Maggio, Guralnik et al. 2006). Da auch Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes mit dem Alter zunehmen, könnte dies einige der Korrelationen erklären. Wie genau der Zusammenhang zwischen IL-6 und Insulinresistenz zu erklären ist, bleibt bis heute unbekannt (Kristiansen and Mandrup-Poulsen 2005; Maggio, Guralnik et al. 2006; Petersen and Shulman 2006).

Körperliche Aktivität schützt vor der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes und ist eine sehr wirkungsvolle nicht-pharmakologische Behandlungsmöglichkeit für neu diagnostizierte Patienten mit Typ-2-Diabetes/Prädiabetes. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass regelmäßiger Sport in Kombination mit Gewichtsreduktion in der Therapie des neu diagnostizierten Typ-2-Diabetes effektiver ist, als Placebo oder eine pharmakologische Therapie mit Metformin.

Sport beeinflusst die Genexpression in der Skelettmuskulatur, den Metabolismus und die Insulinsensitivität (Ryder, Gilbert et al. 2001; Hawley, Hargreaves et al. 2006; Jorgensen, Richter et al. 2006). Die genauen molekularen Mediatoren für diesen positiven Effekt der körperlichen Belastung sind bisher nur unvollständig verstanden. Während länger anhaltendem Training wird aus dem sich kontrahierenden Skelettmuskel vermehrt IL-6 freigesetzt. Der Plasmaspiegel von IL-6 steigt bis auf das hundertfache an. Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass IL-6 der Mediator des positiven Effekts von körperlicher Betätigung auf die Insulinsensitivität sein könnte

(Febbraio and Pedersen 2005). Im Widerspruch dazu stieg in Patienten nach einer IL-6 Infusion der Blutzuckerspiegel an (van Hall, Steensberg et al. 2003; Petersen, Carey et al. 2005). In Bezug auf den Fettstoffwechsel sind die Studien eindeutiger (van Hall, Steensberg et al. 2003; Petersen, Carey et al. 2005).

IL-6 aktiviert den Lipidstoffwechsel. Es stimuliert die Mobilisierung und Verwertung von freien Fettsäuren (Al-Khalili, Bouzakri et al. 2006; Carey, Steinberg et al. 2006). Ein akuter Anstieg von IL-6 könnte also in Zeiten erhöhten Energiebedarfs zur Mobilisierung von Ressourcen wichtig sein (Kim, Higashimori et al. 2004). Da erhöhte intramuskuläre Fettsäuren mit erhöhter Insulinresistenz der Skelettmuskulatur einhergehen und erhöhte Fettsäuren im Zusammenhang mit Übergewicht und Typ-2-Diabetes stehen (Petersen and Shulman 2006), könnte ein erhöhter IL-6 Spiegel in Abwesenheit von erhöhtem Energiebedarf zu ektopter Fettgewebsbildung in der Skelettmuskulatur führen (Glund and Krook 2008). Chronisch erhöhte IL-6 Spiegel sind bisher nur im Tierexperiment untersucht worden und daher mit gewissen Einschränkungen zu betrachten. So stimmen zum Beispiel nur 42% der DNA-Sequenzen von Maus und Mensch überein (Kamimura, Ishihara et al. 2003). In der Mehrzahl der Studien geht eine chronische IL-6-Erhöhung mit Insulinresistenz einher (Klover, Zimmers et al. 2003; Cai, Yuan et al. 2005). Entweder kam es zu einem diabetischen Phenotyp (Cai, Yuan et al. 2005) oder zu hepatischer Insulinresistenz. Interessanter Weise blieb die Insulinsensitivität der Skelettmuskulatur unbeeinflusst (Kim, Higashimori et al. 2004). Der diabetische Phenotyp konnte mit Hilfe von IL-6 neutralisierenden Antikörpern rückgängig gemacht werden (Cai, Yuan et al. 2005) und IL-6 neutralisierende Antikörper steigern Insulinsensitivität in ob/ob Mäusen (Klover, Clementi et al. 2005).

In vitro Studien haben gezeigt, dass der Effekt von IL-6 auf unterschiedliche Gewebe stark variiert. In Skelettmuskelzellen führt IL-6 zu einem direkten Anstieg des Glukosemetabolismus und der Insulinaktivität (Weigert, Hennige et al. 2005; Al-Khalili, Bouzakri et al. 2006).

IL-6 steigert die Oxidation freier Fettsäuren und senkt den lipogenen Effekt von Insulin. Im Gegensatz dazu zeigen Studien an humanem Fettgewebe und 3T3-L1 Adipozyten ganz andere Ergebnisse. Hier hat IL-6 einen inhibierenden Effekt auf die Gentranskription des Insulin-Rezeptor-Substrats (IRS)-1 und den insulinsensitiven Glukosetransporter (GLUT) 4 (Rotter, Nagaev et al. 2003; Sopasakis, Sandqvist et al. 2004).

Andere Ergebnisse zeigte jedoch eine Studie an 3T3-L1-Zellen, an denen IL-6 zu einem Anstieg der Glukoseaufnahme führte (Stouthard, Oude Elferink et al. 1996). Mehrere Studien haben gezeigt, dass IL-6 die Insulinwirkung mindert. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass IL-6 die Expression von Adiponectin in humanem Fettgewebe und die Expression des insulin receptor substrate-1 (IRS-1) und des Glukosetransporters 4 in 3T3-L1-Adipozyten senkt (Jansson, Pellme et al. 2003; Rotter, Nagaev et al. 2003). Ausserdem induziert IL-6 die Expression des inducer of suppresor of cytokine signaling (SOCS) Proteins. Die Induktion von SOCS1 und SOCS3 inhibiert die Insulinsignalkette durch Bindung an den Insulinrezeptor und IRS-1. Insulin hat durch die Hemmung des intrazellulären IL-6-Signalwegs einen antiinflammatorischen Effekt in 3T3-L1-Adipozyten (Andersson, Sopasakis et al. 2007).

Auch genetisch modifizierte Nager wurden genutzt, um die Rolle des IL-6 genauer zu verstehen. IL-6-knock-out-Mäuse (IL-6^{-/-}) entwickelten in fortgeschrittenem Alter Übergewicht und Insulinresistenz (Wallenius, Wallenius et al. 2002). Dies zeigt, dass unter der Abwesenheit von IL-6, charakteristische Symptome des Metabolischen Syndroms auftreten (Wallenius, Wallenius et al. 2002). Das Übergewicht und die Insulinresistenz waren unter exogener Substitution von IL-6 teilweise reversibel. Diese Studien zeigen, dass IL-6 im Allgemeinen für die Aufrechterhaltung des normalen Glukosestoffwechsels notwendig ist. Im Gegensatz dazu waren Mäuse denen das TNF- α -Gen fehlte gegenüber Adipositas induzierter Insulinresistenz geschützt (Uysal, Wiesbrock et al. 1997).

IL-6 ist eine Zytokin mit vielen unterschiedlichen Aufgaben und Einflussgebieten. Die Rolle des IL-6 im Glukosestoffwechsel ist nach wie vor nur sehr unzureichend geklärt. Sowohl das Zielorgan, als auch die Tatsache, dass es sich um einen chronischen oder einen akuten Effekt handelt scheinen eine Rolle zu spielen und mit unterschiedlichen Aufgaben im Zusammenhang zu stehen. Vor allem die Daten zum Einfluss von IL-6 im Fettgewebe sind bisher sehr widersprüchlich und bedürfen weiterer Untersuchung.

Adiponectin:

Adiponectin wurde erstmalig Mitte der neunziger Jahre von mehreren Laboren unabhängig von einander beschrieben, was die vielen verschiedenen Namen erklärt. Seit dem wurde Adiponectin ausführlich untersucht. 1995 beschrieb Scherer et al. Adiponectin das erste Mal als ein Protein, welches von differenzierten 3T3-L1-Adipozyten von Mäusen synthetisiert und sezerniert wird. Sie nannten dieses Protein

„adipocyte complement-related protein of 30 kDa“ (ACRP30), da es Ähnlichkeiten zum Komplementfaktor C1q aufwies (Scherer, Williams et al. 1995). Das gleiche Protein wurden unabhängig davon von einer Arbeitsgruppe aus dem Labor von Spiegelmann identifiziert und „adipoQ“ genannt (Hu, Liang et al. 1996). Mittlerweile hat sich der Name „Adiponectin“ etabliert. Adiponectin wurde in hohen Mengen in humanem Fettgewebe gefunden, was zu dem Namen „adipose most abundant gene transcript 1“ (APM1) führte (Ahima 2006). Es ist in Konzentrationen von 5 bis 30 µg/ml im menschlichen Plasma vorhanden und macht damit etwas 0,01% der Plasmaproteine aus (Arita, Kihara et al. 1999). Das codierende Gen ist auf Chromosom 3q27 lokalisiert und mittlerweile haben Studien einen Typ-2-Diabetes prädisponierten Locus auf demselben Chromosom nachweisen können (Nishida, Funahashi et al. 2007). Adiponectin ist 244 Aminosäuren groß und weist strukturell Homologien mit Kollagen VIII und X und dem Komplementfaktor C1q auf (Maeda, Okubo et al. 1996).

Im Plasma liegt es in zwei oligomeren Formen vor; einem ca. 180 kDa großen Hexamer und einem 400-kDa großen Komplex. Der 400-kDa große Komplex scheint für den Glukosestoffwechsel die entscheidende Rolle zu spielen. So senkt die Form mit dem höheren molekularen Gewicht (HMW) den Glukosespiegel in Mäusen, nicht jedoch die Form mit dem niedrigeren molekularen Gewicht (LMW)(Pajvani, Du et al. 2003).

In Zellkulturen hemmt HMW-Adiponectin die hepatische Glukoseproduktion wesentlich effektiver. In einer Untersuchung von Adiponectinspiegeln in Typ-2-Diabetikern konnte gezeigt werden, dass der niedrigere Adiponectinspiegel im Vergleich zu Nicht-Diabetikern ausschließlich auf einem erniedrigten HMW-Adiponectin basiert (Lara-Castro, Fu et al. 2007). Adiponectin konnte neben dem Fettgewebe auch im Knochenmark (Yokota, Meka et al. 2002), in Knochenmark bildenden Zellen (Berner, Lyngstadaas et al. 2004), in fetalem Gewebe (Corbetta, Bulfamante et al. 2005), in Myozyten, Cardiomyozyten (Pineiro, Iglesias et al. 2005) und Speicheldrüsenepithelzellen (Katsiogiannis, Kapsogeorgou et al. 2006) nachgewiesen werden.

Der größte Anteil des Plasmaadiponectin wird von Adipozyten im Fettgewebe sezerniert. Es ist das am meisten sezernierte Protein des Fettgewebes. Seine Konzentration im Plasma ist zwei bis dreimal so hoch, wie die anderer Polypeptide (Ahima 2006). Wie Adiponectin in das Plasma sezerniert wird, ist bisher noch unzureichend bekannt. 2003 konnten zwei Adiponectin Rezeptoren identifiziert werden.

AdipoR1 wird im Skelettmuskel exprimiert und AdipoR2 wird primär in der Leber exprimiert. Außerdem konnte die Expression von AdipoR1 und AdipoR2 im Hypothalamus und eine erhöhte Expression von AdipoR2 in einem paraventriculären Kern (PVN) nachgewiesen werden.

Diese Zentren könnten mit der Regulation des Energiehaushaltes im Zusammenhang stehen. Klinische Studien haben gezeigt, dass obwohl Adiponectin primär im Fettgewebe gebildet wird, sein Plasmagehalt mit steigendem BMI abfällt und bei anschließender Reduktion des BMI wieder ansteigt. Diese Korrelation ist in viszeralem Fettgewebe wesentlich deutlicher nachweisbar als in subkutanem Fettgewebe (Nishida, Funahashi et al. 2007). Der Mechanismus für die Reduktion des Plasmaadiponectinspiegels in Personen mit vermehrtem viszeralem Fettgewebe ist nicht eindeutig geklärt. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass TNF- α , ein potenter Inhibitor der Adiponectinexpression ist (Hector, Schwarzloh et al. 2007).

Des Weiteren lassen sich bei cardiovasculären Risikofaktoren, wie Insulinresistenz, Bluthochdruck, Hyperlipoproteinämie und Hypercholesterinämie erniedrigte Adiponectinspiegel nachweisen. Adiponectin zeigt erniedrigte Plasmaspiegel in Patienten mit KHK (Zyriax, Algenstaedt et al. 2008). Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und erniedrigtem Adiponectinspiegel starben häufiger an kardiologischen Zwischenfällen als Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und normalen Adiponectinspiegeln. Diese Daten lassen vermuten, dass Hypoadiponectinämie ein wichtiger Risikofaktor für Atherosklerose ist. Eine prospektive Studie hat gezeigt, dass Männer mit hohen Adiponectinspiegeln ein geringeres Risiko haben einen Myokardinfarkt zu erleiden, als Männer mit einem mittleren oder niedrigen Adiponectinspiegel. Dieser Zusammenhang war unabhängig von den gängigen Risikofaktoren wie Hypertension und Diabetes (Nishida, Funahashi et al. 2007).

Adiponectin besitzt antiinflammatorische, antiatherogene und diabetesprotektive Eigenschaften. Eine Studie an Pima Indianern, einem Volksstamm mit einer überdurchschnittlich hohen Rate an Adipositas und Diabetes zeigte, dass Personen mit hohen Adiponectinspiegeln ein geringeres Risiko hatten einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln als Personen mit niedrigen Adiponectinwerten (Nishida, Funahashi et al. 2007). Adiponectin-Knockout-Mäuse zeigen unter normaler Diät einen unauffälligen Phänotyp. Unter einer fett- und zuckerreichen Diät nahmen der Blutzuckerspiegel und der Blutinsulinspiegel jedoch deutlich zu. Unter einer Therapie mit Adiponectin mittels Adenovirusinfektion verbesserte sich die Insulinresistenz deutlich. In der zuvor

durch Atherosklerose beschädigten Intima der Aorta in den Knockout-Mäusen kam es durch die Adiponectinsubstitution zu einer erhöhten Proliferation der glatten Muskulatur in der Intima (Matsuzawa, Shimomura et al. 2003).

Eine weitere Studie zeigte, dass Thiaglitazone, ein orales Antidiabetikum welches die Insulinsensitivität erhöht, die Expression von Adiponectin in weißem Fettgewebe deutlich erhöht. Auch die Serumspiegel von Adiponectin stiegen unter dem Einfluss von Glitazonen an. Dies scheint ein entscheidender Effekt in der medikamentösen Wirkung von Thiazolinedionen zu sein. In einer weiteren Studie mit Adiponectin-Knockout-Mäusen waren die hepatische Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz nach einer fettreichen Diät herabgesetzt. Adiponectin besitzt demnach eindeutig eine Schlüsselfunktion im so genannten Metabolischen Syndrom (Ronti, Lupattelli et al. 2006).

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α):

TNF- α mit seinen zahlreichen immunologischen Funktionen wurde ursprünglich als eine Ursache von Tumornekrose in septischen Tieren beschrieben. Und mit katabolen Stoffwechsellagen, wie malignen Erkrankungen und Infektionen in Zusammenhang gebracht. TNF- α wird als 26-kDa Transmembranprotein exprimiert (Fain, Madan et al. 2004; Kershaw and Flier 2004; Ryden and Arner 2007). Mit Hilfe des TNF- α -converting enzyme spaltet sich hiervon die 17-kDa große biologisch aktive Form ab. Zwei verschiedene Membranrezeptoren, eine 55-kDa Isoform (p55) und eine 75-kDa Isoform (p75), vermitteln alle bisher bekannten Eigenschaften des TNF- α (Moller 2000). 1993 war TNF- α das erste vom Fettgewebe sezernierte Produkt, welches mit Übergewicht und Insulinresistenz in Verbindung gebracht wurde (Hotamisligil, Shargill et al. 1993). Der Gehalt an TNF- α mRNA korreliert mit dem BMI und Hyperinsulinämie (Hotamisligil, Arner et al. 1995). Die Freisetzung von TNF- α aus primären Fettgewebeskulturen stieg nach der Fütterung von Mäusen oder Ratten mit stark fetthaltiger Nahrung an (Morin, Eckel et al. 1997). Die Stimulation von primären Kulturen humaner Adipozyten mit Lipopolysacchariden führte ebenfalls zu einer vermehrten Sekretion von TNF- α . Wenn man davon ausgeht, dass der Spiegel freier TNF- α -Rezeptoren im Plasma die Aktivität des TNF- α -Systems widerspiegelt, ist es interessant festzustellen, dass der Gehalt an Rezeptoren bei Übergewicht und Insulinresistenz erhöht ist. Einen weiteren faszinierenden Zusammenhang zwischen fettabhängigem TNF- α und Insulinsensitivität zeigt die folgende Studie: Mäuse mit einer Null-Mutation im Ap2-Gen, welches für das adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) kodiert, waren trotz fettreicher Diät, nicht in der Lage TNF- α im Fettgewebe zu synthetisieren (Uysal, Wiesbrock et al. 1997).

Obwohl die Mäuse unter der fettreichen Diät genauso übergewichtig wurden wie die Kontrollmäuse, entwickelten sie im Gegensatz zu den Kontrollmäusen weder eine Hyperinsulinämie noch eine Hyperglukosämie.

Gewichtsreduktion senkt den TNF- α -Spiegel (Kern, Saghizadeh et al. 1995; Bastard, Jardel et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Neutralisierung von TNF- α die Insulinresistenz in übergewichtigen Ratten verbessert (Samad, Uysal et al. 1999; Ruan and Lodish 2003). TNF- α Infusionen in Ratten bewirken eine verminderte Insulinsensitivität und führen zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut. Ausserdem bewirkt es einen signifikanten Abfall von Adiponectin (Ruan, Miles et al. 2002). Die Gabe von TNF- α neutralisierenden Antikörpern an Typ-2-Diabetiker beeinflusste jedoch weder die Blutglukosespiegel, noch die Insulinsensitivität. Die Therapie mit Thiaglitazone (TZD) führt teilweise zu einer Antagonisierung der herabgesetzten Insulinsensitivität durch TNF- α (Boyle 2004).

Visfatin:

Visfatin wurde bereits 1994 von Samal et al. als Wachstumsfaktor für B-Vorläuferzellen unter dem Namen pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF) beschrieben (Samal, Sun et al. 1994). Es wurde in Lebergewebe (Samal, Sun et al. 1994), Muskelgewebe (Samal, Sun et al. 1994), Herzmuskelgewebe, Plazenta (Kendal and Bryant-Greenwood 2007), Lungengewebe (Zhang, Adyshev et al. 2008) und Nierengewebe (Kato, Odamaki et al. 2009) nachgewiesen.

Erst 2004 stellten Fukuhara et al. fest, dass PBEF auch in großem Maße in viszeralem Fettgewebe exprimiert wird und gaben diesem Protein den Namen Visfatin (Fukuhara, Matsuda et al. 2005). Der Gehalt an Visfatin-mRNA stieg während der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten stark an. Gleichzeitig wiesen sie einen Anstieg der Sekretion des Proteins in das Inkubationsmedium nach. Visfatin im Plasma steigt mit zunehmendem viszeralem Fettgewebe, gemessen mittels CT an (Fukuhara, Matsuda et al. 2005; Beltowski 2006).

In KKAy Mäusen, einem Mausmodell für Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes, stieg der Visfatinplasmaspiegel während einer Gewichtszunahme an. Gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der Visfatin-mRNA im viszeralem Fettgewebe, nicht jedoch in der Leber oder in subkutanem Fettgewebe. Die Plasmaspiegel von Visfatin ändern sich verglichen mit Insulin jedoch nicht kurzfristig nach dem Essen. Intravenöse Gaben von Visfatin senken den Blutzuckerspiegel, haben jedoch keinen Einfluss auf die

Insulinkonzentration (Fukuhara, Matsuda et al. 2005; Beltowski 2006). Man kann also davon ausgehen, dass Visfatin direkt einen hypoglykämischen Effekt hat. In vitro hat Visfatin einige insulinähnliche Eigenschaften. So stimuliert Visfatin die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten und Monozyten und suprimiert die Glukosefreisetzung aus Hepatozytenkulturen. Visfatin bindet an den Insulinrezeptor und stimuliert diesen durch Phosphorylierung. Des Weiteren bindet es an Insulin Rezeptor Substrat-1 und -2 (IRS-1 und IRS-2) und vermittelt die Bindung von PI3K an IRS-1 und IRS-2, sowie die Phosphorylierung der weiteren Signalkaskade und Mitochondrien aktivierten Proteinkaskade (MAPK).

Visfatin stimuliert die Ausdifferenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten, induziert die Akkumulation von Triglyceriden, steigert die Synthese von Glukose aus Triglyceriden und induziert die Expression von adipose tissue-specific markers peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), Fettsäuresynthase, Diacylglycerol Acyltransferase und Adiponectin (Fukuhara, Matsuda et al. 2005; Beltowski 2006).

Um die physiologische Rolle von Visfatin weiter zu charakterisieren, wurde ein Visfatin-defizientes Mausmodell entwickelt. Während die homozygoten Tiere bereits während der Embryogenese verstarben, erreichten die heterozygoten Visfatin +/-Tiere das Erwachsenenalter und zeigten ein normales Wachstum, eine normale Nahrungsaufnahme und ein normales Gewicht. Das Plasmavisfatin war ca. ein Drittel niedriger und der Blutzuckerspiegel im Vergleich zu den Wildtypen leicht erhöht. Die Glukosetoleranz war herabgesetzt, während die Insulinsensitivität in Visfatin +/-Mäusen intakt war. Diese Daten zeigen, dass endogenes Visfatin in die Regulationskreisläufe von Glukose involviert ist, wenn auch in einem weitaus geringeren Umfang als Insulin. Der Visfatinplasmagehalt ist ca. 10% des Insulinspiegels im nüchternen Zustand und sogar nur 3% postprandial (Beltowski 2006). In zwei weiteren Studien war Visfatin im Plasma bei Typ-2-Diabetikern höher als bei normoglykämischen Kontrollpersonen (Chen, Chung et al. 2006).

All diese Studien lassen demnach darauf schließen, dass Visfatin im Vergleich zu Insulin eher einen Basisspiegel für den Zuckerstoffwechsel liefert und Insulin schnelle Schwankungen abfängt. Visfatin scheint jedoch auch die Möglichkeit eines Gegenregulationsmechanismus zu haben, wenn die Insulinsensitivität herabgesetzt ist.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass Übergewicht und Adipositas und die damit verbundenen Folgeerkrankung wie Typ-2-Diabetes oder das Metabolische Syndrom aufgrund der steigenden Prävalenz ein zunehmendes Problem für die Gesundheit der Bevölkerung darstellt. In der Pathogenese dieser Erkrankungen spielt das Fettgewebe eine zentrale Rolle. In den letzten 10 Jahren konnte gezeigt werden, das Fettgewebe und viszerales Fettgewebe im Besonderen kein reiner Energiespeicher ist, sondern ein hormonaktives Organ, welches Proteine sezerniert und so einen entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus nimmt. In viszeralem Fettgewebe konnten eine ganze Reihe verschiedener Adipozytokine identifiziert werden; unter ihnen Adiponectin, TNF- α ; Visfatin und IL-6. Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen einer chronischen systemischen Entzündungsreaktion, ausgehend vom Fettgewebe und Übergewicht besteht. Eine langfristige Aktivierung dieser proinflammatorischen Signalkaskade könnte der auslösende Faktor für die Entwicklung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes sein.

IL-6 ist eine Zytokin mit vielen unterschiedlichen Aufgaben und Einflussgebieten. Die Rolle des IL-6 im Glukosestoffwechsel ist nach wie vor nur sehr unzureichend geklärt. Sowohl das Zielorgan, als auch die Tatsache, dass es sich um einen chronischen oder einen akuten Effekt handelt scheinen eine Rolle zu spielen und mit unterschiedlichen Aufgaben im Zusammenhang zu stehen. Vor allem die Daten zum Einfluss von IL-6 im Fettgewebe sind bisher sehr widersprüchlich und bedürfen weiterer Untersuchung.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Reagenzien und Bezugsquellen

3.1.1. Reagenzien

Produkt	Firma
Agarose	Invitrogen
Aprotinin	Sigma
BCA-Protein Assay	Pierce
Bromphenolblau	Bio-Rad
BSA Fraktion V	Serva
c-DNA-Synthese-Kit	Invitrogen
Chloroform	Merck
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	Sigma
DNA-Ladder	Invitrogen
DTT	Invitrogen
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Modium (DMEM) (4,500 mg/ml D-Glucose)	Gibco BRL
Dulbecco's PBS	Gibco BRL
ECL Western blotting detection reagents	Amersham
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	BioRad
Fetales Rinderserum (FBS)	Gibco BRL
HEPES-Pufferlösung	Sigma
Human Adiponectin Immunoessay	R&D Systems
Isopropanol	Fluka
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	Gibco BRL
LightCycler Kit-FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Natriumfluorid	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
Natriumvanadat	Sigma
Natronlauge	Merck
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL

PMSF (Phenylmethylsulfinylflurid)	Sigma
Salzsäure	Merck
TRI Reagent	Sigma
Triton X 100	Merck

3.1.2. Primer

Gen	Primersequenzen forward und reverse	Effizienz	Produkt	
			BP	TM (°C)
S27	5'-CCA GGA TAA GGA AGG AAT-3' 5'-CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG-3'	1,84	319	83,2
Adiponectin	5'-GGA-GCT-GTT-CTA-CTG-CTA-3' 5'-GGA-CCA-ATA-AGA-CCT-GGA-3'	1,74	215	90,8
TNF- α	5'-GAA-AGG-ACA-CCA-TGA-GCA-3' 5'-GAG-AGG-TCC-CTG-GGG-AA-3'	2,16	200	95,0
Visfatin	5'-GAT CCC AAC AAA AGG-TCC A-3' 5'-ATG ATG TGC TGC TTC CA-3'	1,90	216	82,1
Caspase 3	5'-ATG-GAC-CTG-TTG-ACC-TGA-3' 5'-ATA-ACC-AGG-TGC-TGT-GGA-3'	1,97	217	95,0

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Reaktiongefäße (0,5; 1,5; 2,0ml)	Eppendorf
Filter-tip Pipettenspitzen für PCR	Greiner
Phenolfeste Röhrchen	Plus
LC Glaskapillaren	Roche
Kunststoff-Einmalartikel	Costar, Falcon, Nune

3.1.4. Geräte

Produkt	Firma
Absorbtionsspektrometer	Eppendorf
Autoklav	Webeco
Eismaschine	Scotsman
Filme für Agarosegele	Polaroid
Fotoapparat mit UV-Tisch	Invar

Heizblock Tri-Block DB-3	Techne
Kühlschrank	Liebherr
LightCycler	Roche
Relative Quantivication Software 1.0	Roche
Mikrowelle	Moulinex
Magnetrührer/Heizplatte	Ikamag RCT
ph-Meter CG 820	Schott Geräte GmbH
Pipetten für PCR	Eppendorf
Pipetten für Westernblot	Gilson
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Reinraumwerkbank VBM 400	The Baker Company
Scanner, SnapScan 1236	AGFA
Schüttler	Rocky 3D
Stickstofftank 35 VHC	Taylor Wharton
Termal Cycler Trio-Thermoblock	Biometra
Tiefkühlschrank (-80°C) IUF 8520	Romulus Holding
Tiefkühzentrifuge Mikro Rapid/K	Hettich
Tischzentifuge, Biofuge	Heraeus Instruments
Ultrathurax	IKA
Vortexer, VF 2	Jahnke & Kunkel
Waage PM 4600	Mettler
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik
Zellkultur-Inkubator	Nunc
Zentrifuge, Sigma 3K30	B.Braun Biotech International

3.2. Die Behandlung des Fettgewebes

Insgesamt 30 normalgewichtigen und 10 adipösen Patienten, die sich einem abdominalchirurgischen Eingriff unterziehen mussten, wurde intraoperativ viszerales Fettgewebe aus dem Omentum majus entnommen. Keiner der Patienten litt an einer endokrinologischen Erkrankung. Der mittlere BMI der normalgewichtigen Probanden betrug $23,6\text{kg/m}^2$ mit einer Standardabweichung von $2,9\text{kg/m}^2$, der mittlere BMI der adipösen Probanden betrug $37,3\text{kg/m}^2$ mit einer Standardabweichung von $0,4\text{kg/m}^2$. Die Personen wurden mündlich und schriftlich aufgeklärt und gaben mündlich und schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Des Weiteren wurde an klinischen Daten der CRP-Wert, der Nüchtern-Glukose-Wert und das Creatinin im

Plasma erhoben. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf genehmigt (OB/12/2004).

Für den kurzen Transport aus dem Operationssaal in das Labor wurde das Gewebe in Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) aufgenommen und auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden viermal 300 mg des Gewebes auf Petrischalen verteilt. Nach mechanischer Zerkleinerung in ca. 1mm große Stücke wurden die Proben in 3ml Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) Kulturmedium, einem standardisierten Kulturmedium für Zellkulturen, aufgenommen. Das Kulturmedium war zuvor mit 20%igem Rinderserum (FBS), 4,5mg/ml Glukose, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin, sowie 10ml Hepes-Puffer angereichert worden. Die Behandlung des Gewebes erfolgte mit humanem rekombinantem Interleukin-6 (IL-6) in einer Konzentration von 50ng/ml, bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5%.

Alle vier Proben verblieben für 72 Stunden bei 37°C und 5% pCO₂ in dem Medium und wurden in diesem Zeitraum entweder für 24-, 48- oder 72 Stunden mit IL-6 inkubiert. Eine Negativkontrolle ohne IL-6-Inkubation wurde über den gesamten Zeitraum mitgeführt. Die Probe, die 24 Stunden mit IL-6 behandelt wurde, befand sich die ersten 48 Stunden im reinen Kulturmedium, ohne IL-6-Anreicherung, und wurde anschließend für die letzten 24 Stunden mit IL-6 inkubiert. Die Probe, die 48 Stunden mit IL-6 behandelt wurde, befand sich zunächst 24 Stunden in reinem Kulturmedium, ohne IL-6-Anreicherung, und wurde anschließend für die letzten 48 Stunden mit IL-6 inkubiert. Die Probe, die 72 Stunden mit IL-6 behandelt wurde, befand sich über die gesamten 72 Stunden in mit IL-6 angereichertem Kulturmedium. Die als Standard dienende Negativkontrolle verblieb für 72 Stunden im Kulturmedium ohne IL-6-Anreicherung. Das Kulturmedium und das IL-6 wurden alle 24 Stunden gewechselt. Das IL-6 wurde vor dem Versetzen der Proben in PBS gelöst. Um die Versuchsbedingungen für alle Gewebeproben absolut identisch zu haben, wurde allen Proben während der Zeit ohne IL-6-Inkubation eine äquivalente Menge PBS zugesetzt. Nach 72 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Proben mit PBS gewaschen. Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt.

3.3. Molekularbiochemie

3.3.1. RNA-Isolierung

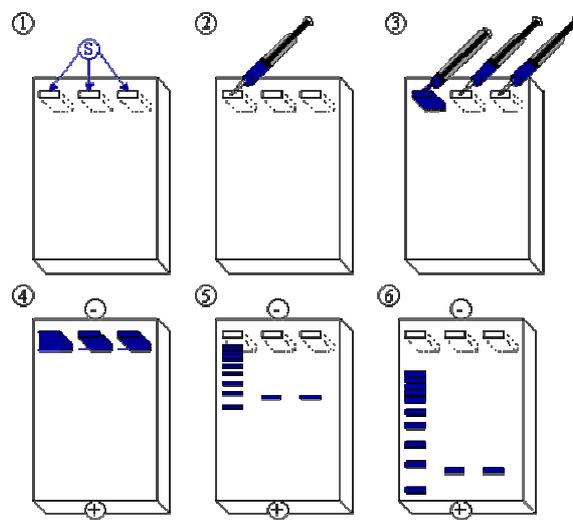
Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe von Tri Reagent™, einer monophasischen Lösung auf Guanidinthiocyanat- und Phenolbasis, womit über die „single-step-Methode“ aus einer Gewebeprobe gleichzeitig RNA, DNA und Proteine isoliert werden können. Nach Versetzen der Lösung mit Chloroform und

anschließender Zentrifugation, bilden sich drei Phasen: eine wässrige Phase, welche die RNA beinhaltet, eine Interphase, welche die DNA beinhaltet und eine organische Phase, welche die Proteine beinhaltet. Jede einzelne Komponente kann dann nach der Separierung der Phasen isoliert werden.

Hierzu wurden jeweils die 300 mg Fettgewebe in 1ml TriReagentTM aufgenommen und mit Hilfe eines Ultrathurax homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Nicht gelöstes Material, welches sich am Boden absetzte und die oberste Phase, bestehend aus Fett, wurden verworfen. Der klare Überstand wurde abgenommen und mit 0,2ml Chloroform versetzt, für 15 Minuten mit einem Vortexer gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000g teilte das Gemisch in die drei Phasen. Die untere, wässrige Phase, bestehend aus RNA wurde abgenommen. Die obere, organische Phase, bestehend aus Protein und die Interphase, bestehen aus DNA, wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde zur Isolierung der RNA mit 1ml Isopropanol versetzt und erneut auf dem Vortexer gemischt. Nach erneuter Inkubation, für 10 Minuten bei Raumtemperatur, wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000g die präzipitierte RNA pelletiert. Das Pellet wurde dreimal mit je 1ml Ethanol 75% gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wurde die getrocknete RNA in 20µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser gelöst und auf Eis gestellt. Die vorherige Behandlung des Wassers mit DEPC erfolgte zur Denaturierung von Ribonukleasen zum Schutz der gewonnenen RNA. Um eine vollständige Lösung der RNA zu gewährleisten wurden die Proben für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend erneut auf Eis gestellt. Die isolierte RNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.2. Gelelektrophorese

Das Ergebnis der Isolation wurde in einem Checkgel durch Anfärben der 28S und 18S Bande der ribosomalen RNA mit Ethidiumbromid kontrolliert. Hierfür wurde, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, zunächst ein 1%-iges Agarosegel in einfachem TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer angesetzt. 100ml TBE-Puffer wurden mit 2µl Ethidiumbromid versetzt, in die vorbereitete Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Je 2µl der Probe wurden mit 8µl aqua dest. und 2µl Laufpuffer in die Gelkammern eingesetzt und das Gel in TBE-Puffer bei 100 Volt 30 Minuten laufen gelassen. Ein 100 bp-Marker wurde mitgeführt.



(Adkins and Burmeister 1996)

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese

3.3.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Ermittlung der Reinheit und Konzentration der RNA, wurde die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines Absorbitionsspektrometers ermittelt. Hierzu wurden 1µl der Probe in 99µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

Die Konzentration der RNA errechnet sich aus der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm, dem RNA-typischen Multiplikationsfaktor von 40µg/µl (eine OD von 1 bei 260nm entspricht ca. 40ng/µl einzelsträngiger RNA) und der Verdünnung von 1:100. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/µl]} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung [ng/µl]} \times 40$$

Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe der Wellenlänge 320nm und dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt. Eine ausreichende Reinheit wurde bei einer optischen Dichte von $< 0,005$ bei einer Wellenlänge von 320nm und einem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} < 1,80$ angenommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.3.4. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wird genutzt, um aus einem RNA-Strang Einzelstrang-DNA zu synthetisieren. Dazu synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase (RT) zunächst von einer einzelsträngigen RNA durch Basenanlagerung mit Hilfe einer DNA-Polymerase einen RNA-DNA-Hybridstrang. Als nächstes folgt der Abbau des RNA-Anteils mit Hilfe eines eigenen Abschnitts der DNA-Polymerase, des RNase H-Anteils. Die einzelnen Schritte der Reverse Transkription sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurde für die Herstellung der c-DNA das „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ der Firma Invitrogen verwendet. SuperScript™ II Reverse Transcriptase ist eine weiterentwickelte Version der M-MLV RT mit reduzierter RNase H-Aktivität und erhöhter Thermostabilität. Das Enzym wird aus einem mit dem Mononey Murine Leukemia Virus infizierten E. coli gewonnen und wurde so modifiziert, dass nahezu keine intrinsische Ribonuklease H-Aktivität mehr vorhanden ist. 1,5µg RNA wurden mit 1µl des Desoxynucleosidtriphosphatgemischs (10mM dNTP-Mix) und 1,5µl des unspezifischen Primers „Random Hexamers“, in einer Konzentration von 50ng/µl, gemischt und mit DEPC-behandeltem aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Probe aufgefüllt. Das Basengemisch setzt sich aus dATP (10mM), dTTP (10mM), dCTP (10mM) und dGTP (10mM) zusammen. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Danach wurden die Proben für eine Minute auf Eis gestellt, wobei es zur Anlagerung des Random Hexamers an die RNA kam. Daraufhin wurden 2µl 10X RT-Buffer, 4µl MgCl₂ (25mM), 2µl Dithiothreitol 0,1M (DTT) und 1µl des rekombinanten Ribonuklease Inhibitors „RNaseOut“ zur Protektion der RNA hinzugefügt und der Ansatz für zwei Minuten bei 25°C inkubiert. Um die Strangbildung zu katalysieren wurden 1µl des Enzyms SuperScript II RT in einer Konzentration von 50ng/µl zugefügt und die Probe erst 10 Minuten bei 25°C und dann 50 Minuten bei 42°C auf dem Heizblock inkubiert. Durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 72°C wurde das Enzym inaktiviert und anschließend ein RNA-Verdau mit 1µl Ribonuclease H bei 37°C für 20 Minuten durchgeführt, um die restliche RNA zu eliminieren. Anschließend wurde die erstellte c-DNA auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert.

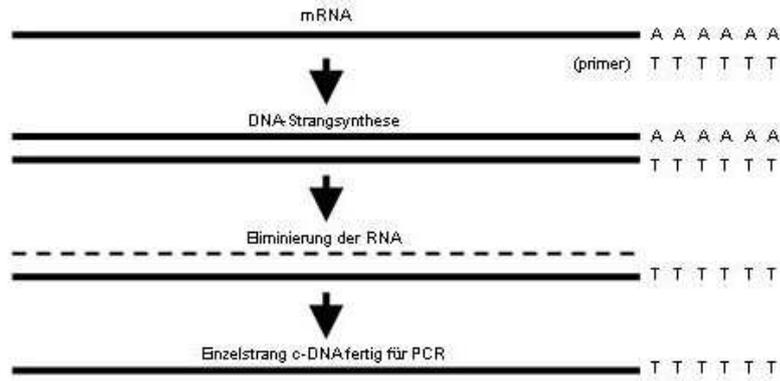


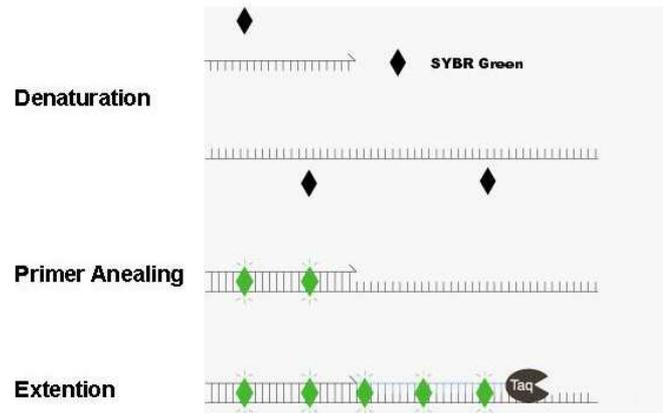
Abbildung 3: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese

3.3.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine in-vitro-Methode zur enzymatischen Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen. Die Reaktion benötigt zwei Oligonukleotidprimer, welche mit den beiden komplementären Strängen hybridisieren und sich der zu vervielfältigenden DNA-Sequenzen anlagern. Hierdurch wird der Startpunkt der DNA-Synthese festgelegt und der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt. Die Elongation der Primer wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert. Durch die Wiederholung von Zyklen unterschiedlicher Temperaturen im Thermocycler, die zu Denaturierung, Annealing und Elongation führen, häufen sich die spezifischen DNA-Sequenzen an. Essentiell sind außerdem eine Pufferlösung, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellt und Mg-Ionen, die für die Funktion der DNA-Polymerase unersetzbar sind.

3.3.6. Quantitative Echtzeit PCR

Die Quantitative Echtzeit PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die hier verwendete Methode mittels Light Cycler beruht auf der Fluoreszenzmessung des zugesetzten Farbstoffes SYBR Green I. Der Light Cycler ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. SYBR Green I ist ein Farbstoff, der spezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Während der PCR wird SYBR Green I in die neu synthetisierte DNA eingebaut. So gibt die nach jeder Elongationsphase gemessene Fluoreszenz einen Aufschluss über die entstandene Menge des PCR-Produkts. Der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs in die Doppelstrang-DNA ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



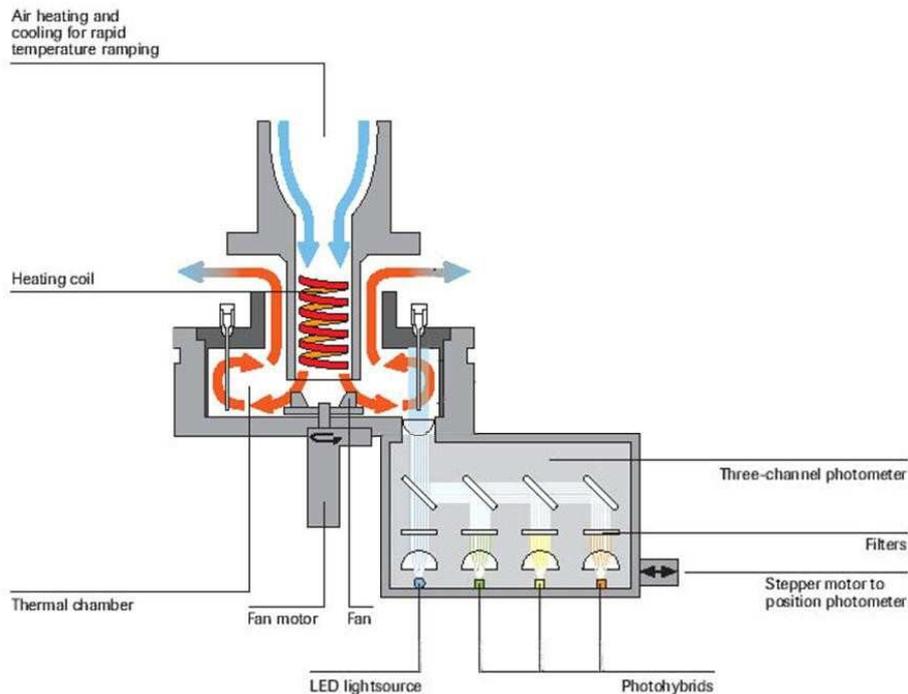
(www.gibthai.com)

Abbildung 4: Quantitative Echtzeit PCR:

Schematische Darstellung des unspezifischen Einbaus des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green in die Doppelstrang-DNA während der Polymerase Kettenreaktion. Durch die Bindung des Farbstoffs an die DNA wird die Fluoreszenz deutlich verstärkt.

Eine Kontrolle der Spezifität des entstandenen PCR-Produkts ist die am Ende eines jeden Zyklus durchgeführte Schmelzkurvenanalyse. Jede Doppelstrang-DNA hat eine für ihre Größe und chemische Zusammensetzung typische Temperatur, bei der sich die Doppelstränge trennen. Durch eine schrittweise Erhöhung der Temperatur und kontinuierliche Messungen der dadurch abnehmenden Fluoreszenz entsteht eine für jede Doppelstrang-DNA spezifische Schmelzkurve. Diese ermöglicht eine Unterscheidung von unerwünschten Nebenprodukten, wie zum Beispiel Primerdimeren und dem PCR-Produkt. Das Reaktionsgemisch besteht aus der DNA-Probe, forward und reverse Primer, $MgCl_2$ und dem SYBR Green Fast-Start-Kit bestehend aus LightCyclerFastStart Enzyme, Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dem Basenmix dNTP und dem SYBR Green I Farbstoff. Dieses wird in Glaskapillaren eingesetzt, die im Verhältnis zum Volumen eine große Oberfläche haben. Dadurch sind ein schneller Temperaturwechsel und damit ein deutlich schnellerer Reaktionsablauf als bei der herkömmlichen PCR möglich. Des Weiteren ist an der Spitze der Kapillare das Fluoreszenzsignal konzentriert, so dass es dort optimal von einem Fluorimeter detektiert werden kann. Durch Erwärmung der Luft im Gerät werden die unterschiedlichen Temperaturen erreicht und nach jedem Zyklus erfolgt die Messung der Fluoreszenz. Eine kontinuierliche Kontrolle des Reaktionsverlaufs ist an einem angeschlossenen Monitor möglich. Je höher die Anfangskonzentration des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ist, desto eher kann ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Als vergleichende Messpunkte werden die so genannten Crossing Points gewählt: Darunter versteht man die Anzahl von Zyklen nach der das Fluoreszenzsignal in die exponentielle Phase übergeht und eine vorher

festgelegte Crossing Line schneidet. Anhand dieser Werte erfolgt im Anschluss die Auswertung.



(www.roche-applied-science.com)

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Light Cyclers

Gemessen wurde der Gehalt von Adiponectin, TNF- α und Visfatin spezifischen Sequenzen in der c-DNA. Als Housekeeping-Gen wurde das ribosomale Protein S27 verwendet. Als Housekeeping-Gene bezeichnet man diejenigen Gene, die nicht reguliert sind, das heißt unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden. In der Regel kodieren sie für Enzyme, die der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen, z. B. für Proteine des Zytoskeletts, für rRNA und für Histone (Wenzel 1991).

Die Vorbereitung der Proben wurde entsprechend den Empfehlungen des LightCycler Kit-FastStart DNA Master SYBR Green I von Roche vorgenommen. Pro Probe wurde ein Reaktionsvolumen von 12,5 μ l eingesetzt, welches sich aus 1,25 μ l SYBR Green I, 3mM MgCl₂, 1 μ l DNA, 300nM forward primer, 300nM reverse primer und 8 μ l DEPC-behandeltem aqua dest. zusammensetzt. Für alle Primerpaare wurden die Bedingungen im Lightcycler hinsichtlich Temperatur und Konzentration der Reagenzien optimiert. Die Effizienz wurde anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Folgende Beziehungen wurden angenommen: $E = 10^{-1/\text{slope}}$

dabei gilt: E = Effizienz des Laufs; slope = Steigung der generierten Standardkurve.

Folgende Bedingungen wurden für die verschiedenen Genabschnitte gewählt:

Adiponectin:

Die Verdünnungsreihe für Adiponectin ergab die in Abbildung 6 dargestellte Fluoreszenzmessung.

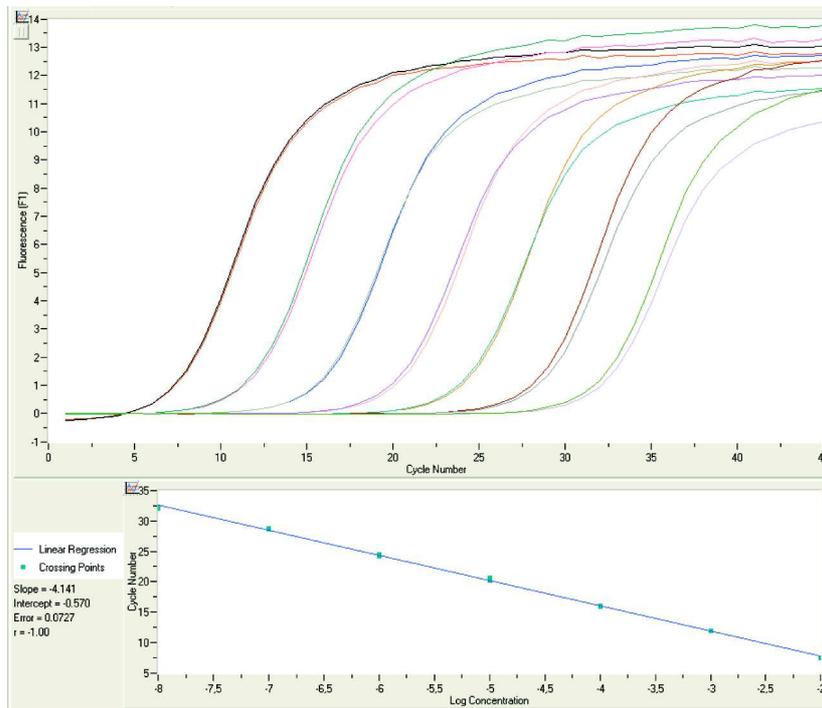


Abbildung 6: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für Adiponectin

Eine Effizienz von 1,74 ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) ergab sich bei einer Primerkonzentration von 300nM und einer Magnesiumchloridkonzentration von 3mM. Die Amplifikationstemperatur betrug 60°C und die Elongationstemperatur 72°C. Nach einer Elongation von 8 Sekunden, wurde die Fluoreszenz bei 78°C gemessen.

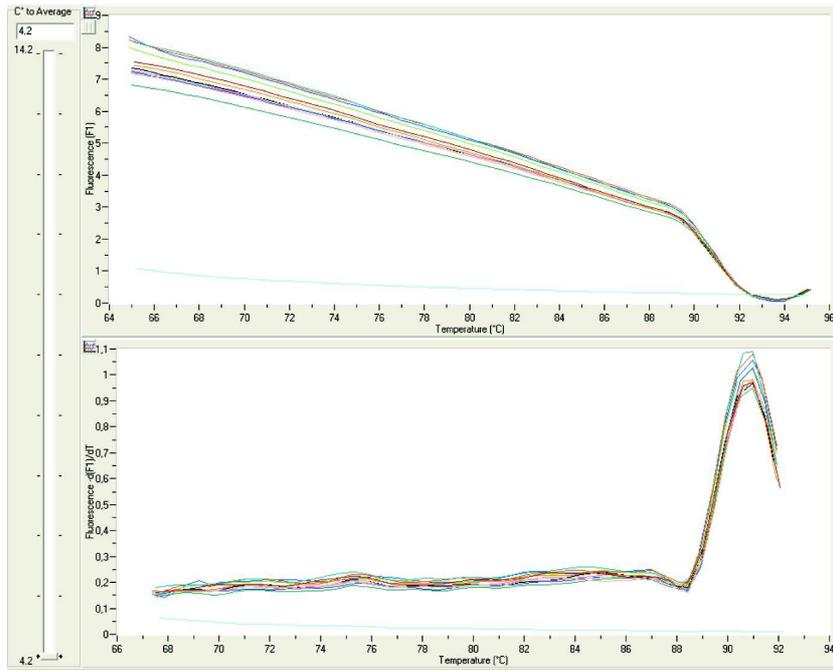


Abbildung 7: Schmelzkurve des Adiponectin-spezifischen PCR-Produkts

Die Schmelzkurve, wie sie in Abbildung 7 dargestellt ist, identifiziert das 215 Basenpaare große Fragment bei einer Schmelztemperatur von 90,8°C. Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts im Agarosegel ist in Abbildung 8 dargestellt und zeigt eine Bande der erwarteten Größe von 215 bp.

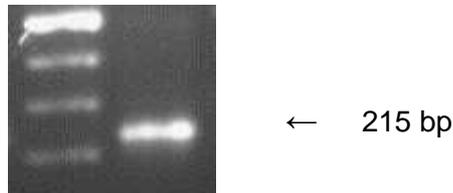


Abbildung 8: Elektrophoretische Auftrennung des Adiponectin-spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel

TNF- α :

Die Verdünnungsreihe für TNF- α ergab die in Abbildung 9 dargestellte Fluoreszenzmessung.

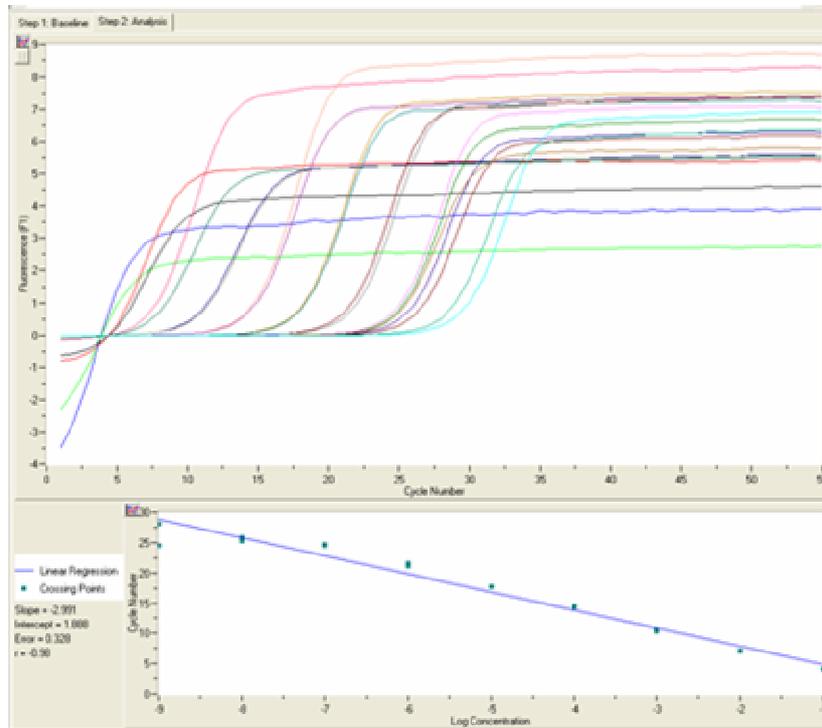


Abbildung 9: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für TNF- α

Eine Effizienz von 2,16 ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) ergab sich bei einer Primerkonzentration von 300nM und einer Magnesiumchloridkonzentration von 3mM.

Die Amplifikationstemperatur betrug 64°C und die Elongationstemperatur 72°C. Nach einer Elongation von 12 Sekunden wurde die Fluoreszenz bei 80°C gemessen.

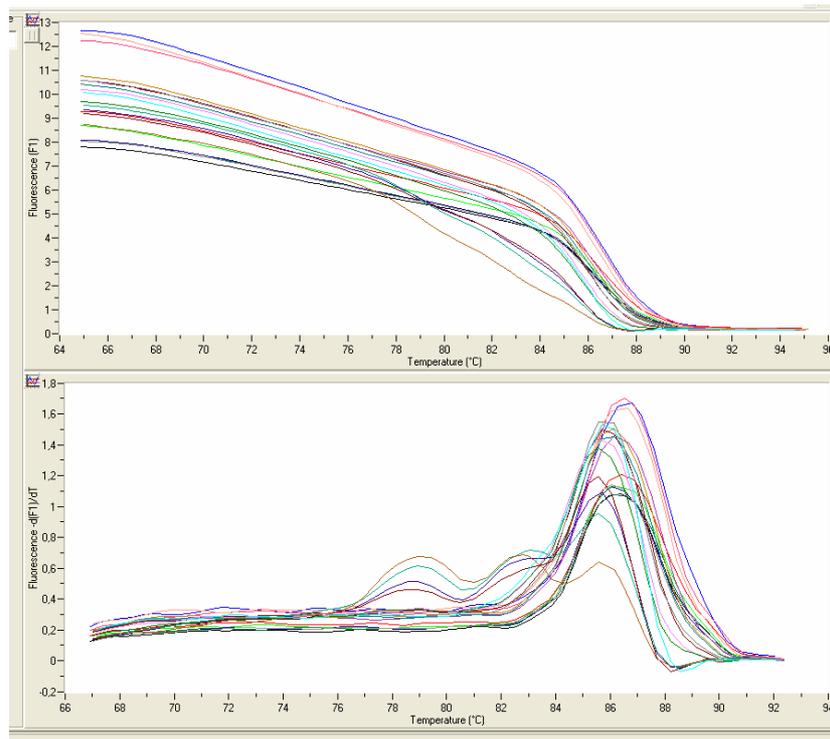


Abbildung 10: Schmelzkurve des TNF- α -spezifischen PCR-Produkts

Die Schmelzkurve, wie sie in Abbildung 10 dargestellt ist, ermittelte das 200 Basenpaare große Fragment, bei einer Schmelztemperatur von 95°C.

Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts im Agarosegel ist in Abbildung 11 dargestellt und zeigt eine Bande der erwarteten Größe von 200 bp.



← 200 bp

Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung des TNF- α -spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel

Visfatin:

Die Verdünnungsreihe für Visfatin ergab die in Abbildung 12 dargestellte Fluoreszenzmessung.

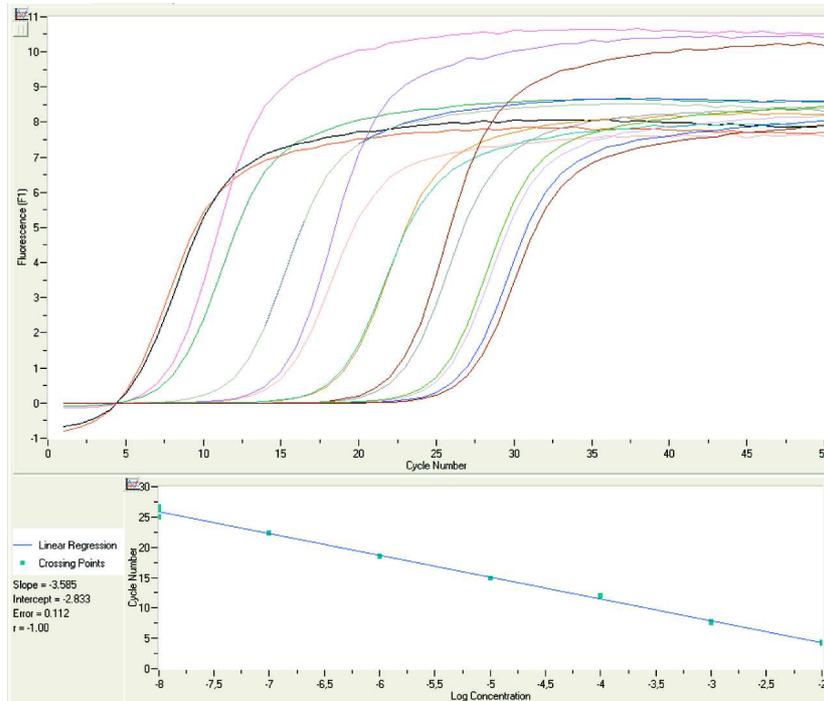


Abbildung 12: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für Visfatin

Eine Effizienz von 1,90 ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) ergab sich bei einer Primerkonzentration von 300nM und einer Magnesiumchloridkonzentration von 3mM.

Die Amplifikationstemperatur betrug 64°C und die Elongationstemperatur 72°C. Nach einer Elongation von 8 Sekunden wurde die Fluoreszenz bei 80°C gemessen.

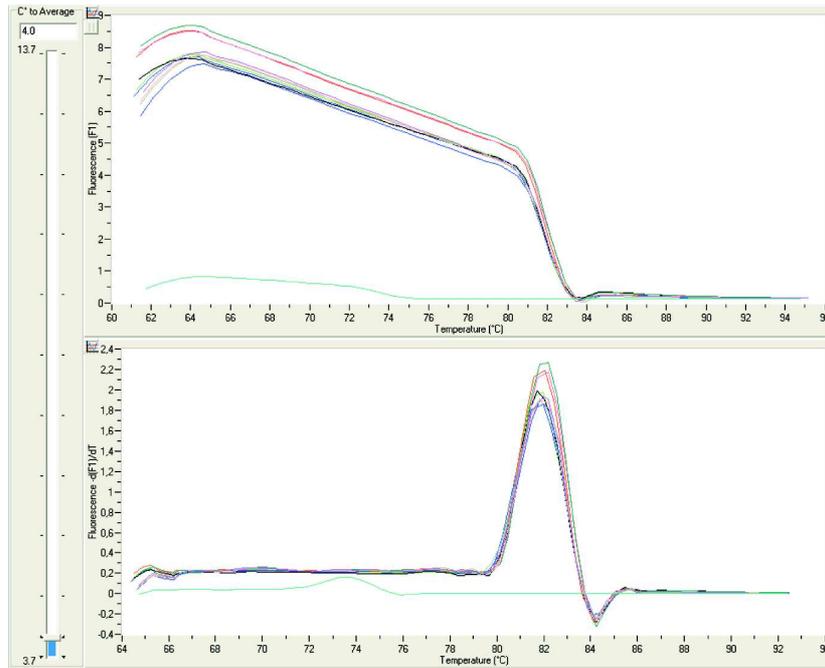


Abbildung 13: Schmelzkurve des Visfatin-spezifischen Produkts

Die Schmelzkurve, wie sie in Abbildung 13 dargestellt ist, ermittelte das 216 Basenpaare große Fragment bei einer Schmelztemperatur von 82,1°C. Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts im Agarosegel ist in Abbildung 14 dargestellt und zeigt eine Bande der erwarteten Größe von 216 bp.

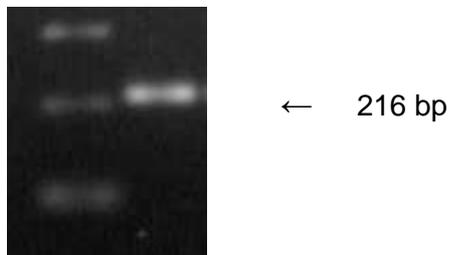


Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung des Visfatin-spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel

S27:

Die Verdünnungsreihe für S27 ergab die in Abbildung 15 dargestellte Fluoreszenzmessung.

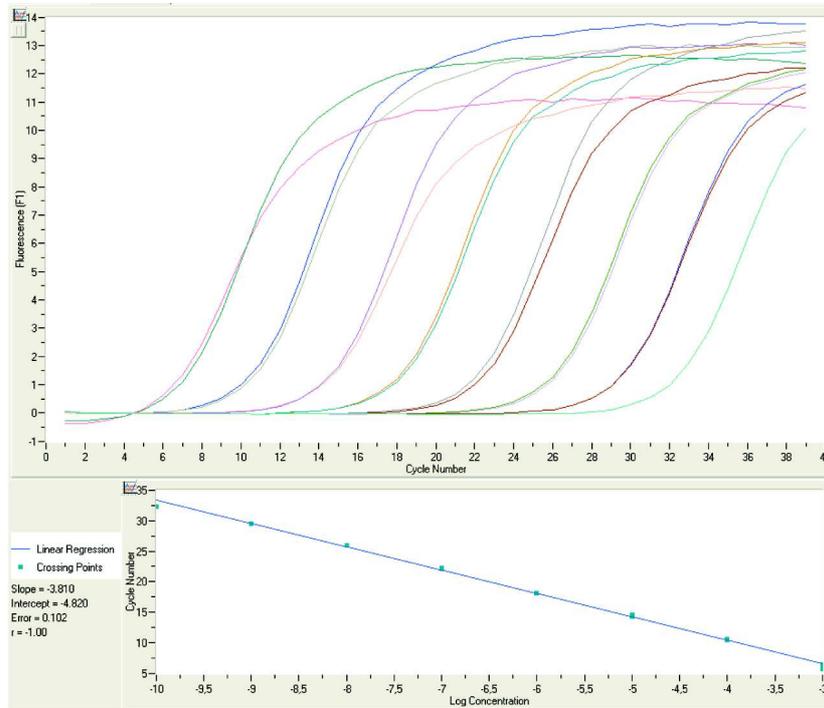


Abbildung 15: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für S27

Eine Effizienz von 1,84 ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) ergab sich bei einer Primerkonzentration von 300nM und einer Magnesiumchloridkonzentration von 3mM.

Die Amplifikationstemperatur betrug 61°C und die Elongationstemperatur 72°C. Nach einer Elongation von 12 Sekunden wurde die Fluoreszenz bei 78°C gemessen.

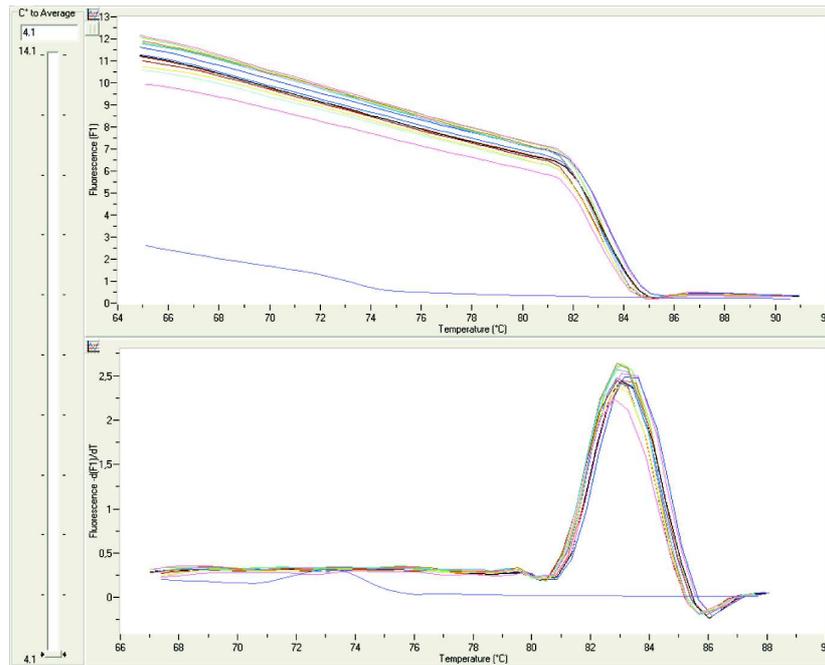


Abbildung 16: Schmelzkurve des S27-spezifischen PCR-Produkts

Die Schmelzkurve, wie sie in Abbildung 16 dargestellt ist, ermittelte das 319 Basenpaare große Fragment bei einer Schmelztemperatur von 83,2°C. Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts im Agarosegel ist in Abbildung 17 dargestellt und zeigte eine Bande der zu erwartenden Größe von 319 bp.

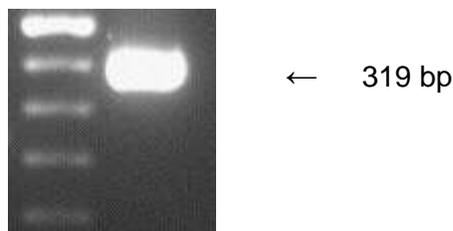


Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung des S27-spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel

3.3.7. Vitalitätsnachweis mittels Cell Death Detection ELISA

Zum Vitalitätsnachweis nach 72-stündiger Kultivierung des Gewebes wurde ein Cell Death Detection ELISA durchgeführt. Bei dem ELISA handelt es sich um einen photometrischen Enzym-Immunoassay zur qualitativen und quantitativen in vitro-Detektion zytoplasmatischer Histon-assoziiierter DNA-Fragmente nach induziertem Zelltod. Der ELISA basiert auf folgendem Testprinzip: Zuerst werden die Proben in einer streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte platziert und eine Mischung aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD wird hinzugefügt. Während der anschließenden Inkubation bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histon-Komponente der Nukleosome. Gleichzeitig bindet der Immunokomplex über Biotinylierung an die

streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Außerdem bindet der Anti-DNA-POD-Antikörper mit den Nukleosomen. Durch anschließendes Waschen werden nicht gebundene Antikörper entfernt. Eine quantitative Bestimmung der Menge an Nukleosomen erfolgt durch die photometrische Bestimmung des im Immunokomplex verbleibenden POD. Für die Durchführung wurden 80mg des inkubierten Fettgewebes mit 200µl Lysispuffer im Ultrathurax homogenisiert und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 200 x g wurde die Zytoplasmafraktion abgenommen. 20µl des Überstands wurde in die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte eingesetzt. Anschließend wurde jede Probe mit 80µl Immunoreagenz versetzt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Folie abgedeckt und für 2 Stunden auf einem Schüttler mit 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus der Mikrotiterplatte wieder entfernt und jedes Reaktionsgefäß dreimal mit 250µl Inkubationspuffer gewaschen. Dann wurden in jedes Reaktionsgefäß 100µl ABTS-Lösung eingesetzt und die Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit 250 rpm erneut inkubiert bis sich eine Farbreaktion entwickelte. Die Extinktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Ein positives Ergebnis wurde bei einem Signal von >600 mU angenommen.

3.3.8. Vitalitätsnachweis mittels Echtzeit PCR

Hierfür wurde der Gehalt einer für Caspase 3 spezifischen Sequenz in der c-DNA gemessen. Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose. Es handelt sich um Cystein-Proteasen, die ihr Substrat spezifisch nach einem Aspartatrest schneiden. Im Menschen sind bis jetzt 11 Caspasen bekannt. Zum Auslösen des Zelltods werden Initiator-Caspasen, wie Caspase-8, -9 und -10 aktiviert. Diese wiederum führen zur Spaltung der pro-Form nachgeschalteter Caspasen, wie Caspase-3 und -7 wodurch diese aktiviert werden und schließlich zum Zelltod führen. Caspase 3 spielt demnach eine zentrale Rolle in der Apoptose. Das codierende Gen für Caspase 3 ist auf Chromosom 4q34 lokalisiert.

Caspase 3:

Die Verdünnungsreihe für Caspase 3 ergab die in Abbildung 18 dargestellte Fluoreszenzmessung.

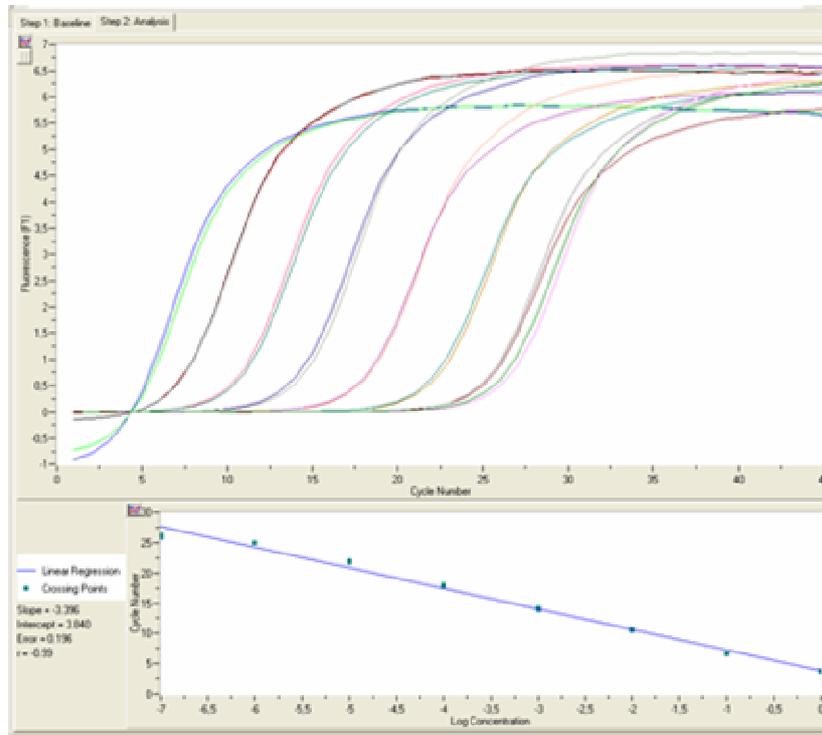


Abbildung 18: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für Caspase

Eine Effizienz von 1,97 ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) ergab sich bei einer Primerkonzentration von 300nM und einer Magnesiumchloridkonzentration von 3mM.

Die Amplifikationstemperatur betrug 95°C und die Elongationstemperatur 55°C. Nach einer Elongation von 15 Sekunden wurde die Fluoreszenz bei 72°C gemessen.

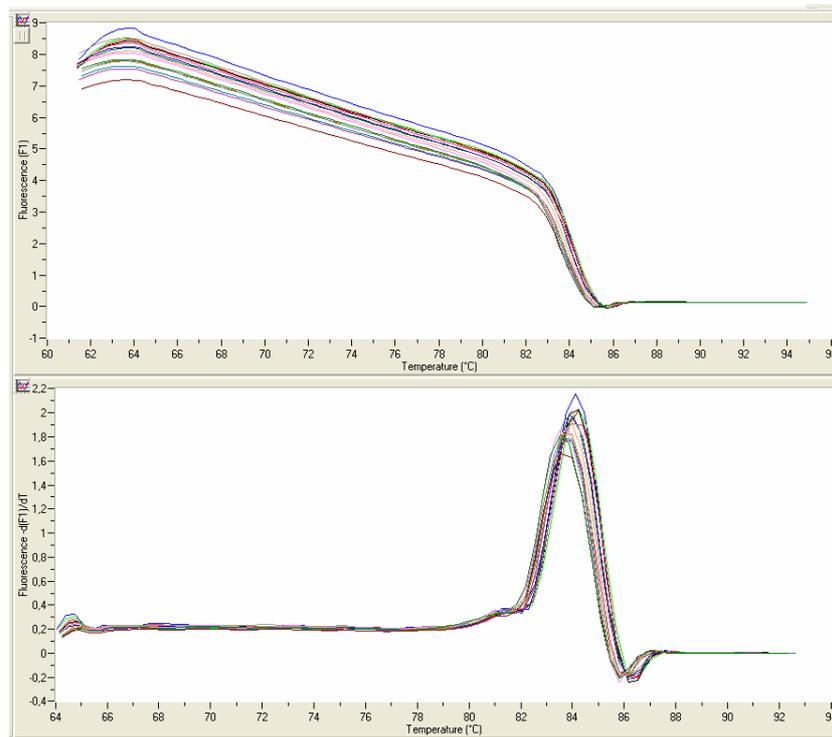


Abbildung 19: Schmelzkurve des Caspase-spezifischen PCR-Produkts

Die Schmelzkurve, wie sie in Abbildung 19 dargestellt ist, ermittelte das 217 Basenpaare große Fragment bei einer Schmelztemperatur von 95°C.

3.4. Auswertung und Statistik

Für jede Probe und einen definierten Kalibrator wurde die relative Menge des Targets und die des Referenzgens mit Hilfe der Second-Derivative-Maximum-Methode der LightCyclersoftware bestimmt. Als Referenzgen wurde das Housekeepinggen S27, dessen Expression als konstant angenommen wurde, verwendet. Die Ergebnisse sind als target/reference ratio geteilt durch den target/reference ratio des Kalibrators aufgeführt. Als Kalibrator dient die unbehandelte Kontrolle. Um Ungenauigkeiten durch verschiedene Effizienzen der unterschiedlichen Primer zu verringern, wurde mit Hilfe der Relativen Quantifikation Software eine Effizienzkorrektur durchgeführt. Die Effizienzkorrektur beruht auf den Daten relativer Standardkurven, welche auf die Effizienz des Targets und des Referenzgens schließen lassen.

Es wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem BMI bzw. der WHR und der mRNA-Expression der verschiedenen Adipozytokine nach Inkubation mit IL-6 über den Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Korrelationsanalyse zwischen CRP und Nüchternblutglukose im Plasma und der mRNA-Expression der verschiedenen Adipozytokine nach Inkubation mit IL-6 über den Zeitraum von 72

Stunden durchgeführt. Die Berechnung der Korrelationen erfolgte nach Pearson. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsmessung der verschiedenen Adipozytokine nach Inkubation mit IL-6 über den Zeitraum von 72 Stunden sind als Mediane mit den 75% und 25% Perzentilen dargestellt. Zur Ermittlung von Signifikanzen wurden der nicht parametrische Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben und Friedmans ANOVA durchgeführt. Signifikanzen wurden bei $p < 0,05$ angenommen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Korrelationsanalyse zwischen dem BMI und der mRNA Expression verschiedener Adipozytokine

Adiponectin:

Es konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen dem BMI und der Adiponectin mRNA Expression im humanen viszeralen Fettgewebe nach einer Inkubation mit IL-6 über einen Zeitraum von 24 Stunden festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient für den BMI und die Adiponectin mRNA Expression nach 24 Stunden Inkubation mit IL-6 betrug 0,409 bei $p=0,02$ (nach Pearson). Es konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen dem BMI und der Adiponectin mRNA Expression nach 48 Stunden Inkubation mit IL-6 gezeigt werden. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,541 bei $p=0,001$ (nach Pearson). Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem BMI und der Adiponectin mRNA Expression nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 gezeigt werden. Der Korrelationskoeffizient betrug für diesen Fall 0,532 bei $p=0,001$ (nach Pearson). Die Anzahl der Gewebsspender betrug jeweils $n = 40$.

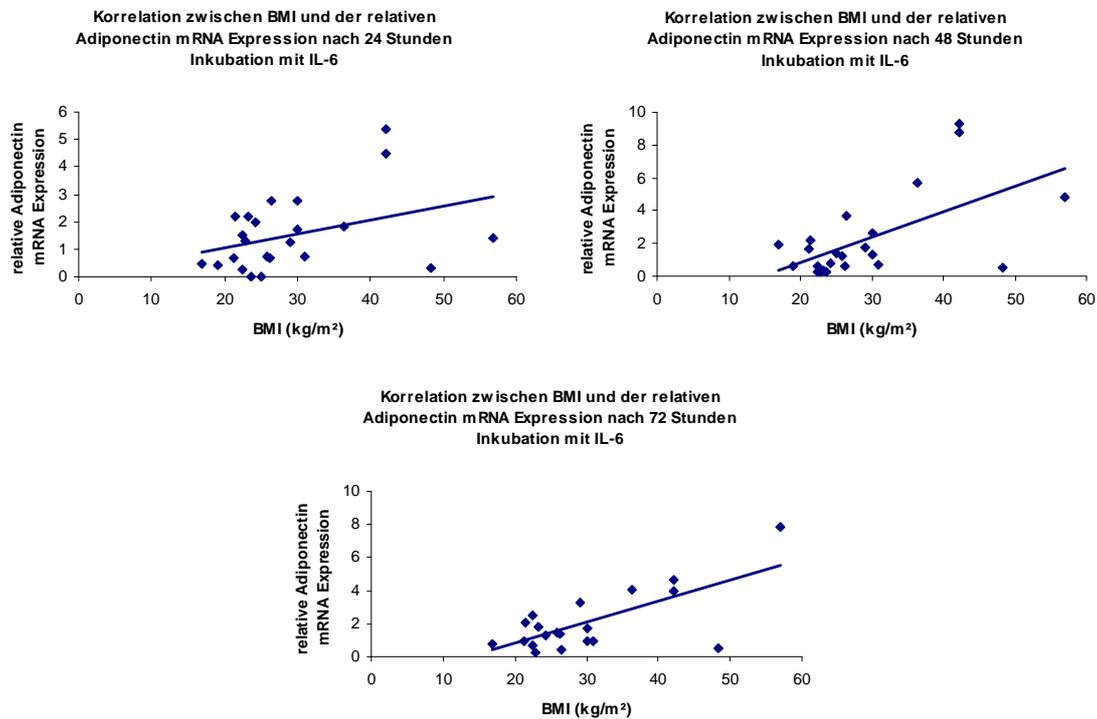


Abbildung 20: Korrelation zwischen BMI und der relativen Adiponectin mRNA Expression

TNF-alpha:

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem BMI und der TNF- α mRNA Expression nach 24-, 48- und 72 Stunden Inkubation mit IL-6 gezeigt werden.

Visfatin:

Es konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen dem BMI und der Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe nach einer Inkubation mit IL-6 über einen Zeitraum von 24 Stunden festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient für den BMI und die Visfatin mRNA Expression nach 24 Stunden Inkubation mit IL-6 betrug 0,407 bei $p=0,028$ (nach Pearson). Es konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen dem BMI und der Visfatin mRNA Expression nach 48 Stunden Inkubation mit IL-6 gezeigt werden. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,413 bei $p=0,026$ (nach Pearson). Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem BMI und der Visfatin mRNA Expression nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 gezeigt werden. Der Korrelationskoeffizient betrug in diesem Fall 0,414 bei $p=0,04$ (nach Pearson). Die Anzahl der Gewebsspender betrug jeweils $n = 40$.

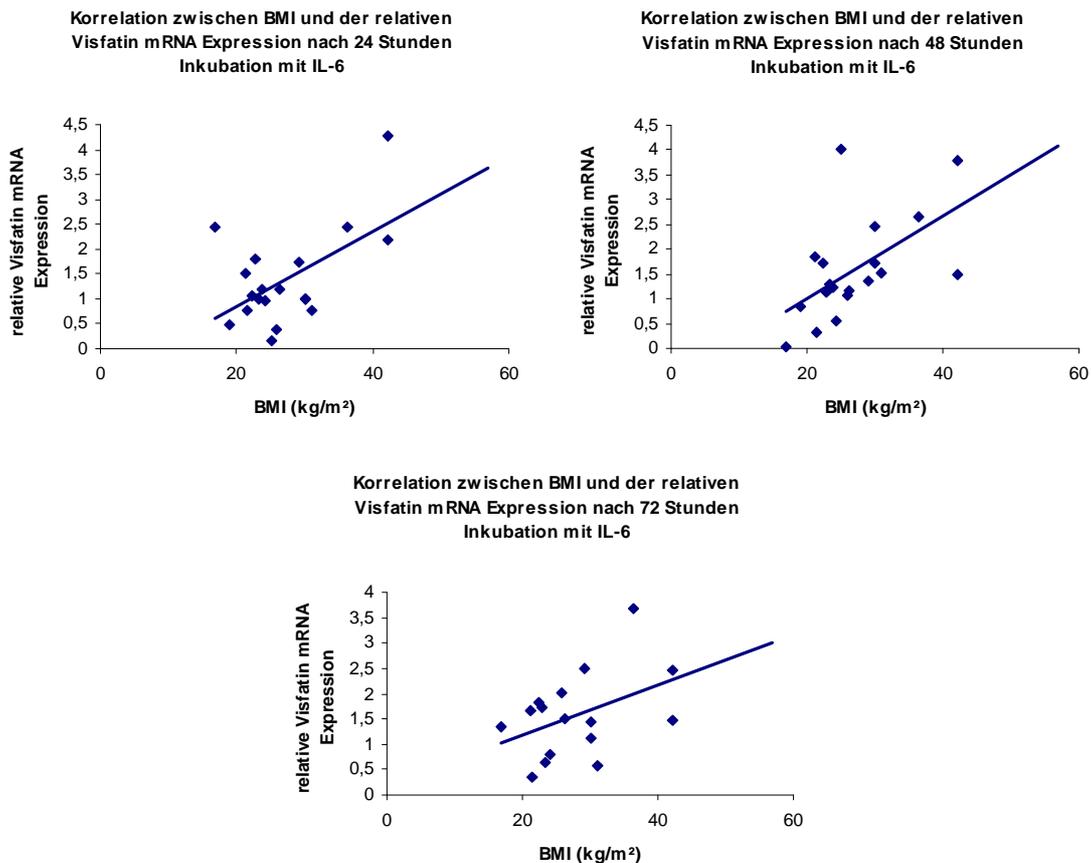


Abbildung 21: Korrelation zwischen BMI und der relativen Visfatin mRNA Expression

4.2. Korrelationsanalyse zwischen der WHR und der mRNA Expression verschiedener Adipozytokine

Es konnte weder für Adiponectin noch für TNF- α oder Visfatin eine signifikante Korrelation mit der WHR nachgewiesen werden.

4.3. Korrelationsanalyse zwischen CRP und Nüchtern-Glukose im Plasma und der mRNA Expression verschiedener Adipozytokine

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen CRP oder Nüchtern-Glukose im Plasma und der mRNA Expression von Adiponectin, TNF- α oder Visfatin im humanen viszeralen Fettgewebe nachgewiesen werden.

4.4. Adiponectin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden

Die Behandlung von humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden mit IL-6 hatte weder nach 24 Stunden noch nach 48- oder 72 Stunden einen signifikanten Einfluss auf die Adiponectin mRNA Expression in dem Gewebe. Die Anzahl der Gewebsspender betrug $n = 30$.

4.5. TNF- α mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden

Die Behandlung vom humanen viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden mit IL-6 hatte weder nach 24 Stunden noch nach 48 oder 72 Stunden einen signifikanten Einfluss auf die TNF- α mRNA Expression in dem Gewebe. Die Anzahl der Gewebsspender betrug $n = 30$.

4.6. Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden

Die Behandlung vom humanen viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Probanden mit IL-6 hatte weder nach 24 Stunden noch nach 48 oder 72 Stunden einen signifikanten Einfluss auf die Visfatin mRNA-Expression in dem Gewebe. Die Anzahl der Gewebsspender betrug $n = 30$.

4.7. Adiponectin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden

Nach Inkubation von humanem viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Probanden mit IL-6 für 24 Stunden deutet sich gegenüber der unbehandelten Probe ein signifikanter Anstieg der Adiponectin mRNA Expression in dem Gewebe an. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch ein eindeutiger Trend zu erkennen (Wilcoxon $p=0,05$).

Nach Inkubation von humanem viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Probanden mit IL-6 für 48 Stunden zeigt sich gegenüber der unbehandelten Probe ein signifikanter Anstieg der Adiponectin mRNA Expression in dem Gewebe um 163% (Wilcoxon $p<0,05$).

Nach Inkubation vom humanen viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Probanden mit IL-6 für 72 Stunden deutet sich gegenüber der unbehandelten Probe ein signifikanter Anstieg der Adiponectin mRNA Expression in dem Gewebe an. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch ein eindeutiger Trend zu erkennen (Wilcoxon $p=0,05$). Die Anzahl der Gewebsspender betrug $n = 9$.

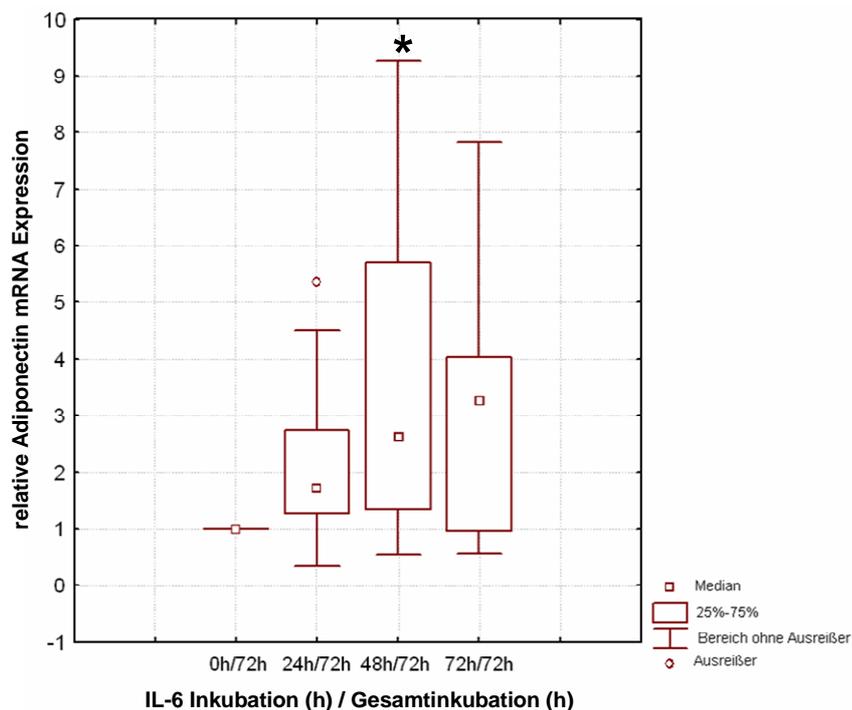


Abbildung 22: Adiponectin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden

4.8. TNF- α mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden

Nach Inkubation von humanem viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Probanden mit IL-6 für 24 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied der TNF- α mRNA Expression in dem Gewebe gegenüber der unbehandelten Probe gezeigt werden. Nach Inkubation des Gewebes für 48 Stunden zeigt sich tendenziell ein Anstieg der TNF- α mRNA Expression (Wilcoxon $p=0,1$). Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Nach einer Inkubation des Gewebes über einen Zeitraum von 72 Stunden zeigt sich jedoch ein signifikanter Anstieg der TNF- α mRNA Expression gegenüber der unbehandeltem Probe um 96% (Wilcoxon $p<0,05$). Die Anzahl der Gewebsspender betrug $n = 10$.

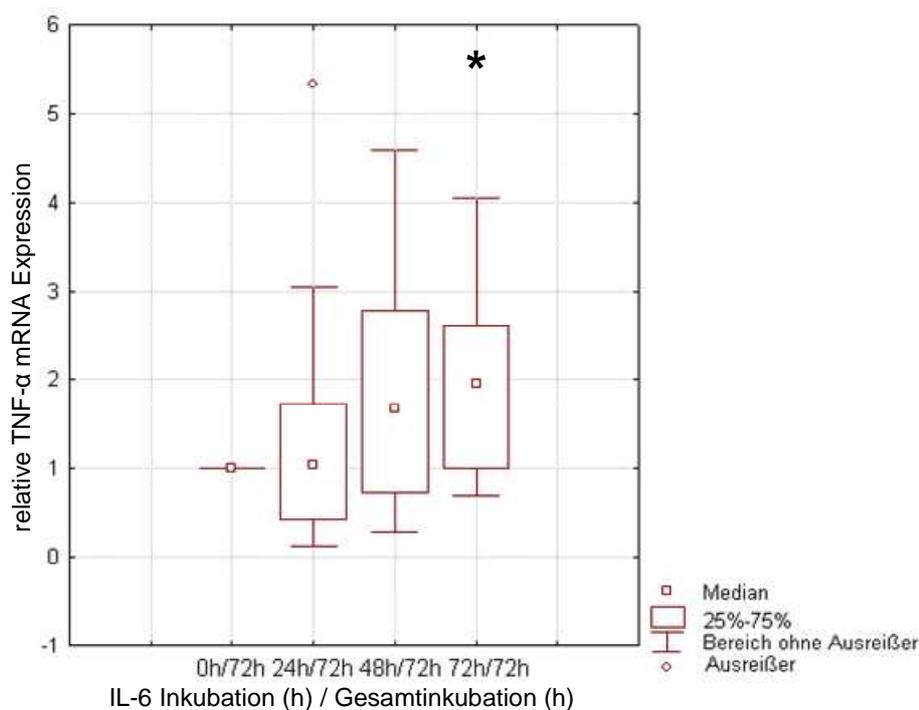


Abbildung 23: TNF- α mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden

4.9. Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden

Die Behandlung von humanem viszeralen Fettgewebe mit IL-6 führt nach 24 Stunden zu keinem signifikanten Unterschied in der Visfatin mRNA Expression. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigt sich gegenüber der unbehandelten Probe jedoch ein signifikanter Anstieg der Visfatin mRNA Expression um 52% (Wilcoxon $p < 0,05$). Dieses Ergebnis konnte mit Daten, die nach einer Inkubation über 72 Stunden erhoben wurden bestätigt werden. Auch dieser Inkubationszeitraum führte zu einem signifikanten Anstieg der Visfatin mRNA Expression um 46% (Wilcoxon $p < 0,05$). Die Anzahl der Gewebeprobe betrug $n = 9$.

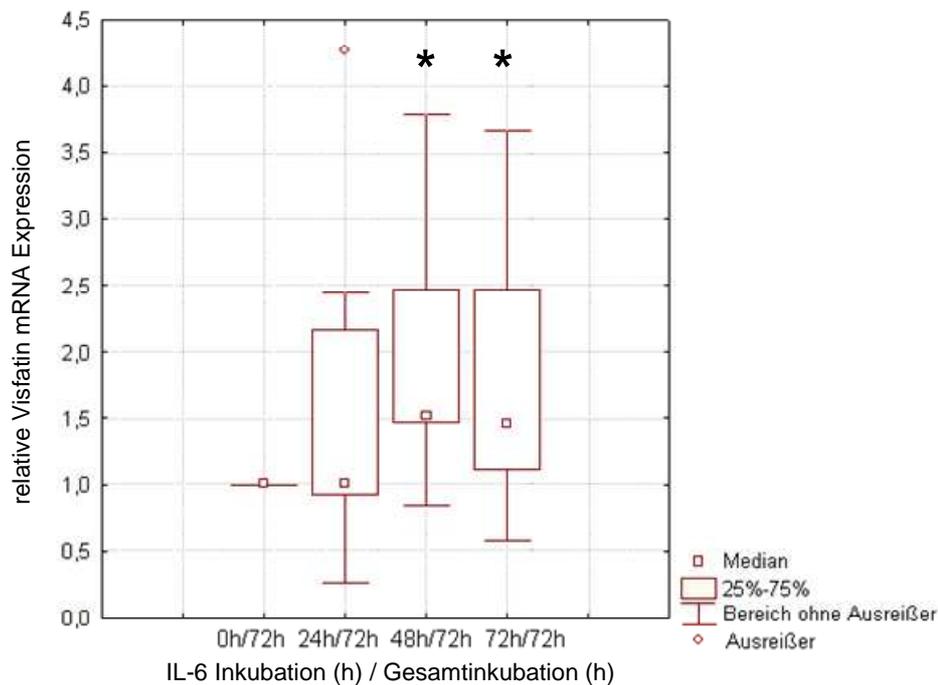


Abbildung 24: Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden

4.10. Vitalitätsnachweis mittels Cell-Death-ELISA

Der Nachweis von Nucleonen im Plasma als Zeichen von Apoptose mit Hilfe des Cell-Death-ELISA ergab eine photometrische Messung von im Mittel 300 mU mit einer Standardabweichung von 48 mU. Ein Nachweis von Apoptose wurde laut Anleitung des Herstellers bei einer photometrischen Messung von > 600 mU angenommen. Es konnte also keine signifikante Apoptose im humanen viszeralem Fettgewebe nach Inkubation mit IL-6 über 24, 48 bzw. 72 Stunden nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte bei Vergleichsmessungen an Gewebe, welches direkt nach der intraoperativen Entnahme im ELISA untersucht wurde und Proben die zuvor 72 Stunden in Kultur gehalten wurden kein signifikanter Anstieg der photometrischen Messung nachgewiesen werden.

4.11. Vitalitätsnachweis mittels Echtzeit PCR

Es ergab sich kein signifikanter Anstieg der mRNA Expression von Caspase 3 über den Zeitraum von 72 Stunden.

5. DISKUSSION

Es ist allgemein bekannt, dass Fettgewebe weitaus mehr Funktionen hat, als die reine Energiespeicherung in Form von Triglyceriden. Seine außerordentlich wichtige Aufgabe als endokrines Organ und seine Rolle in der Pathogenese weit verbreiteter Erkrankungen, wie Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes ist von großem allgemeinem Interesse. Fettgewebe produziert und sezerniert eine ganze Reihe von Adipozytokinen, wie Adiponectin, TNF- α und Visfatin (Maeda, Okubo et al. 1996; Hotamisligil 1999; Kahn and Flier 2000; Algenstaedt, Schaefer et al. 2003; Fukuhara, Matsuda et al. 2005). Für die Sekretion dieser Adipozytokine spielt die Herkunft des Fettgewebes eine entscheidende Rolle und es ist wichtig zwischen subkutanem und viszeralem Fettgewebe zu unterscheiden. Die Adipozytokine spielen ohne Zweifel im Zusammenhang mit einer chronischen Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Insulinresistenz (Hotamisligil 1999; Yamauchi, Kamon et al. 2001).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf parakrinen Mechanismen durch welche Adipozytokine im Fettgewebe reguliert werden. Es ist seit langem bekannt, dass vor allem das viszerale Fettgewebe diese endokrinen Eigenschaften besitzt und mit der Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes in Verbindung steht. Daher wurde für diese Studie humanes viszerales Fettgewebe, welches während abdominalchirurgischer Eingriffe gewonnen wurde, in vitro direkt mit IL-6 als wichtigem Entzündungsmediator inkubiert. Subklinische Inflammation und Übergewicht wurden im Zusammenhang mit Insulinresistenz und der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes beobachtet. So sind bei Adipositas die Plasmaspiegel für CRP, TNF- α , Fibrinogen und IL-6 erhöht (Kolb and Mandrup-Poulsen 2005).

IL-6 und Adiponectin:

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass IL-6 bei Patienten mit Übergewicht und Typ-2-Diabetes sowohl im Plasma als auch im Fettgewebe erhöht ist (Sutherland, McKinley et al. 2004). Wie diese erhöhten IL-6 Spiegel das Fettgewebe beeinflussen bleibt bislang noch ungeklärt. In der hier vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass IL-6 sowohl auf TNF- α als auch auf Adiponectin und Visfatin, im Gegensatz zu normalgewichtigen Patienten, bei übergewichtigen Patienten Einfluss nimmt und, dass dieser Einfluss mit steigendem BMI wächst. All diese Adipozytokine spielen in der Entwicklung von Übergewicht und Typ-2-Diabetes eine wichtige Rolle, so dass die hier vorgestellten Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Energiestoffwechsels leisten können.

Die Rolle von IL-6 im Fettgewebe wird bisher noch kontrovers diskutiert. So ist IL-6 bei Patienten mit Adipositas grundsätzlich erhöht, was einen pro-diabetogenen Effekt vermuten lässt. Auf der anderen Seite führt jedoch auch Gewichtsreduktion zu einem Anstieg der IL-6 Expression, was wiederum für einen anti-diabetogenen Effekt sprechen würde (Matsuzawa, Shimomura et al. 2003; de Mello, Kolehmainen et al. 2008). Der konkrete Einfluss von IL-6 auf Adipozytokine wurde bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht. So konnte zum Beispiel in einer Studie nachgewiesen werden, dass IL-6 die Expression des insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in 3T3-L1-Adipozyten senkt (Rotter, Nagaev et al. 2003) und eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine niedrige IRS-1-Expression in humanem subcutanem Fettgewebe mit einer niedrigen Genexpression und niedrigen Plasmaspiegeln für Adiponectin einhergeht (Jansson, Pellme et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass erhöhte IL-6-Spiegel mit einer Adiponectinsuppression einhergehen. Diese Hypothese wird durch eine Arbeit aus Leipzig unterstützt. Hier ergab die Behandlung von 3T3-L1-Adipozyten mit IL-6 eine Reduktion der Adiponectin mRNA Expression (Fasshauer, Kralisch et al. 2003). Keine dieser Studien befasst sich jedoch, im Gegensatz zu dieser Arbeit, mit humanem viszeralen Fettgewebe, dem im Allgemeinen die größten endokrinologischen Eigenschaften zugesagt werden.

Die hier vorgestellte Studie zeigt keinen Einfluss von IL-6 auf die Expression von Adiponectin im humanen viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Personen, sie zeigt jedoch einen signifikanten positiven Einfluss von IL-6 auf die Expression von Adiponectin im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Personen. Da Adiponectin zu den Diabetes protektiven Adipozytokinen gezählt wird (Nishida, Funahashi et al. 2007), würden auch diese Ergebnisse sich im Sinne eines Diabetes protektiven Mechanismus erklären lassen. Diese Interpretation würde jedoch gegen erhöhte IL-6 Spiegel bei Übergewicht und Typ-2-Diabetes sprechen. Zu berücksichtigen ist hier jedoch, dass es sich bei dieser Arbeit um Gewebe übergewichtiger nicht-diabetischer Patienten handelt. Es könnte also auch ein Kompensationsmechanismus vorliegen, der unter bestimmten Umständen übergewichtige Personen vor der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes schützt. Um mehr Klarheit in diesen Bereich zu bringen, wäre eine vergleichende Untersuchung mit Gewebeproben von Probanden mit Typ-2-Diabetes möglich.

IL-6 und TNF- α :

Das Zytokin TNF- α weist eine positive Korrelation mit Übergewicht und Insulinresistenz auf (Bastard, Maachi et al. 2006; Keller 2006; Popko, Gorska et al. 2010) und spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse im Zusammenhang mit Adipositas und den entsprechenden Folgeerkrankungen. Es war das erste inflammatorische Zytokin bei dem im Zusammenhang mit Übergewicht eine vermehrte Expression im Fettgewebe nachgewiesen werden konnte. (Ji, Dai et al. 2011). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass TNF- α zu einer verminderten Insulinsensitivität führt (Hotamisligil, Arner et al. 1995; Nieto-Vazquez, Fernandez-Veledo et al. 2008; Tzanavari, Giannogonas et al. 2010). So hemmt TNF- α z.B. die Expression von Adiponectin und Visfatin in humanem viszeralen Fettgewebe in vitro (Hector, Schwarzloh et al. 2007) und die Behandlung von Mäusen mit TNF- α führt zu einer reduzierten Glukosetoleranz und zu einer Verringerung der Adiponectin- und Visfatin mRNA Expression im Fettgewebe in vivo (Li, Yang et al. 2009). Gleichzeitig ist die Suppression von TNF- α mit einer Besserung der Insulinsensitivität, verbesserten Nüchternglukosewerten und einer Zunahme von Adiponectin im Fettgewebe verbunden (Ji, Dai et al. 2011; Stanley, Zanni et al. 2011). Bezüglich Regulationsmechanismen zwischen IL-6 und TNF- α konnte bereits gezeigt werden, dass ein starker linearer Zusammenhang zwischen der Sekretion von IL-6 und TNF- α im Fettgewebe besteht (Kern, Ranganathan et al. 2001) und eine weitere Studie ergab, dass TNF- α dosisabhängig die Sekretion von IL-6 in 3T3-L1-Adipozyten steigert (Araki, Dobashi et al. 2006). Der direkter Einfluss von IL-6 auf TNF- α wurde bisher noch nicht untersucht.

Diese Studie konnte zeigen, dass IL-6 im viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger Personen keinen Einfluss auf die TNF- α mRNA Expression hat, im Fettgewebe übergewichtiger Personen jedoch zu einem signifikanten Anstieg der mRNA Expression führt. Diese Ergebnisse unterstützen Daten, laut derer IL-6 einen pro-diabetogenen Effekt hat und könnte eine Erklärung hoher TNF- α -Spiegel bei Adipositas und Insulinresistenz sein (Popko, Gorska et al. 2010).

IL-6 und Visfatin:

Dem bereits 1994 als pre-B-cell colony-enhancing factor beschriebenen Visfatin werden unter anderem auch insulinähnliche Eigenschaften zugesprochen (Samal, Sun et al. 1994; Fukuhara, Matsuda et al. 2005). Die Expressionsspiegel von Visfatin sind im viszeralen Fettgewebe höher als im subkutanen Fettgewebe und es besitzt die Eigenschaft den Blutzuckerspiegel zu senken. Es stimuliert die Glukoseaufnahme in

die Zelle und es konnte gezeigt werden, dass Visfatin an den Insulinrezeptor bindet (Fukuhara, Matsuda et al. 2005). Frühere Studien konnten jedoch auch zeigen, dass PBEF eine wichtige Rolle als pre-B-cell colony-enhancing factor bei Entzündungsreaktionen spielt und die Genexpression von Neutrophilen und Monozyten beeinflusst (Jia, Li et al. 2004). Über den Einfluss von IL-6 auf die Visfatinexpression ist bisher wenig bekannt. So konnte bisher nur an 3T3-L1-Adipozyten gezeigt werden, dass IL-6 hier zu einer Reduktion der Visfatinsynthese führt (Kralisch, Klein et al. 2005). Ergebnisse zu Regulationsmechanismen zwischen IL-6 und Visfatin in Muskelzellen sind eher widersprüchlich. So steigern niedrige IL-6-Spiegel (1ng/ml) die Visfatinexpression und hohe IL-6-Spiegel (100ng/ml) senken die Visfatinexpression (Krzysik-Walker, Hadley et al. 2011).

Diese Studie zeigt erstmals einen Zusammenhang zwischen IL-6 und Visfatin in humanem viszeralem Fettgewebe auf. Nach Inkubation viszeralem Fettgewebes normalgewichtiger Patienten mit IL-6 konnte keine Änderung der Expression von Visfatin nachgewiesen werden. Nach der Inkubation viszeralem Fettgewebes übergewichtiger Patienten mit IL-6 zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Visfatin mRNA Expression in dem Gewebe. Auch dieser Anstieg könnte, ähnlich wie bei Adiponectin als Kompensationsmechanismus gedeutet werden. Da es sich, wie bereits erwähnt, um das Gewebe übergewichtiger Nicht-Diabetiker handelt, die offensichtlich eine Möglichkeit besitzen sich trotz Übergewicht vor der Entwicklung einer Insulinresistenz zu schützen.

In dieser Studie wurde keine primäre Zellkulturlinie verwendet, sondern das Fettgewebe ex-vivo direkt für 72 Stunden kultiviert. Es galt also nachzuweisen, dass dieses Gewebe über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden vital bleibt und adäquat auf den Stimulus IL-6 reagieren kann. Hierfür wurde ein Cell Death Detection ELISA durchgeführt. Der ELISA zeigte keinen Unterschied zwischen der Apoptoserate des für 72 Stunden kultivierten Gewebes und Gewebe dessen Apoptoserate direkt nach der Explantation im ELISA gemessen wurde. Auch blieben die gemessenen Werte weit unter dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert. Des Weiteren wurde ein Vitalitätsnachweis mittels Echtzeit PCR durchgeführt. Hierfür wurde der Gehalt einer spezifischen Sequenz in der c-DNA der für die Apoptose wichtigen Caspase 3 in den unterschiedlichen Geweben gemessen. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg der Expression dieser Sequenz. Es ergab sich somit kein Hinweis auf eine vermehrte Apoptose. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Gewebe über 72 Stunden in der Lage ist adäquat auf die Inkubation mit IL-6 zu reagieren und es sich

bei dem Anstieg der mRNA Expression von Adiponectin, TNF- α und Visfatin im viszeralen Fettgewebe adipöser Patienten um einen durch IL-6 ausgelösten Effekt handelt.

Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese, die eindeutige 28S und 18S Banden der ribosomalen RNA zeigte, nachgewiesen. Die Reinheit der isolierten RNA wurde über die Messung der optischen Dichte bei 260nm und 280nm bestimmt. Der Quotient 260nm / 280nm lag grundsätzlich unter 1,8. Die Integrität des PCR-Produkts wurde sowohl anhand der spezifischen Schmelzkurvenanalyse, als auch anhand einer Agarosegelelektrophorese gesichert.

Diese Ergebnisse bestärken sowohl das Verständnis des Fettgewebes als endokrines Organ, als auch seine Rolle im Energiestoffwechsel und lassen eine wichtige Funktion in der Modulation der Immunantwort vermuten. Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Regulation des Fettgewebes normalgewichtiger und übergewichtiger Personen bestehen. Es stellt sich nun die Frage worin diese Unterschiede begründet sind. Es konnte in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass vor allen Dingen hypertrophe Adipozyten, wie sie im Fettgewebe übergewichtiger Personen vorkommen, große Mengen an Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) sezernieren. Dieses Protein führt zu einer vermehrten Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe (Bastard, Maachi et al. 2006). Passend zu dieser Funktion des MCP-1 besteht das Fettgewebe schlanker Personen im Durchschnitt zu 5-10% aus Makrophagen; bei übergewichtigen Patienten kann dieser Anteil auf bis zu 50% der Gesamtzellzahl im Fettgewebe ansteigen. Die gesteigerte Produktion von MCP-1 in hypertrophen Adipozyten und die damit verbundene vermehrte Einwanderung von Entzündungszellen in das Fettgewebe könnte mit ein auslösender Faktor für die chronische Entzündung im Fettgewebe sein (Tilg and Moschen 2006). Die Entwicklung einer Inflammation im Fettgewebe ist mit Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur assoziiert. Denn Adipozyten und Makrophagen sezernieren neben MCP-1 und anderen Entzündungszellen aktivierenden Cytokinen auch große Mengen an TNF- α .

TNF- α hat zwei entscheidende Effekte auf die Funktion der Adipozyten: Eine Zunahme der Lipolyse und eine Abnahme der Triglyceridsynthese. Dies führt zu einem erhöhten Angebot freier Fettsäuren, die zu einer Akkumulation von Triglyceriden und aktivierten Lipiden in Form von langkettigen acyl-CoA-Estern in der Skelettmuskulatur, der Leber und den Betazellen führt. Langkettige Fettsäuren und andere Fettsäurederivate scheinen den normalen Metabolismus und die sekretorischen Funktionen dieser

Gewebe zu stören und damit eine Insulinresistenz hervorzurufen (Guilherme, Virbasius et al. 2008).

Es lässt sich also vermuten, dass die beobachteten Effekte in einer erhöhten Migration von Makrophagen in das Fettgewebe übergewichtiger Personen begründet liegen. Da es sich in dieser Studie um Untersuchungen an einer Gewebekultur handelte ist keine Differenzierung zwischen Effekten der Makrophagen und der Adipozyten möglich, auch wenn das Kulturmedium für die Kultivierung von Adipozyten optimiert wurde. Dieses Modell wurde trotzdem gewählt, da im Vorfeld gezeigt werden konnte, dass Primäre Adipozytenkulturen schnell ihre Oberflächenstruktur verändern und somit nur bedingt zur Analyse herangezogen werden können. Bei der direkten Kultivierung des gesamten Gewebes nach Explantation ist eine starke Veränderung der Oberflächenstruktur nicht zu vermuten, daher lässt dieses Modell einen besseren Vergleich mit der Situation *in vivo* zu.

Die Daten dieser Studie unterlagen starker Schwankungen, was dazu führte, dass bei der relativ geringen Probandenzahl, nicht in allen Fällen statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten. Die starken Schwankungen könnten durch Unterschiede in den Plasmaspiegeln der einzelnen Patienten begründet liegen. Die Gewebe scheinen bei unterschiedlichen systemischen Spiegel *in vivo*, verschieden stark auf die Inkubation *in vitro* zu reagieren. Des Weiteren wurden die Gewebeproben rein makroskopisch gewählt, so dass Schwankungen in der zellulären Zusammensetzung der einzelnen Proben nicht ausgeschlossen werden können.

Um sowohl klinische Faktoren ausschließen zu können, als auch zwischen Effekten von Makrophagen und Adipozyten unterscheiden zu können, wäre es für die Zukunft sinnvoll ein Adipozytenmodell zu entwickeln, dass alle Eigenschaften der humanen viszeralen Adipozyten widerspiegelt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren konnten zahlreiche, vom Fettgewebe sezernierte Adipozytokine identifiziert werden, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes spielen. Als häufigster Risikofaktor gilt dabei die Adipositas (Arita, Kihara et al. 1999). Ziel dieser Studie war es, unter dem Einfluss vom IL-6 neue Regulationsmechanismen aufzudecken, welche die Expression von Adiponectin, TNF- α und Visfatin beeinflussen.

Intraoperativ wurde von Patienten, die sich einem abdominalchirurgischen Eingriff unterziehen mussten, mesenteriales Fettgewebe entnommen. Bei dem Kollektiv handelte es sich um nicht-diabetische normalgewichtige bzw. adipöse Probanden. Es wurden über 72 Stunden Gewebekulturen angelegt. Das Gewebe wurde innerhalb dieser Zeit für entweder 24, 48 oder 72 Stunden mit 50ng/ml IL-6 inkubiert. Eine unbehandelte Negativkontrolle, ohne IL-6-Inkubation, wurde über den gesamten Zeitraum mitgeführt. Es wurde eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression mittels Real-time PCR mit spezifischen Primern für Adiponectin, TNF- α und Visfatin durchgeführt.

Nach Inkubation mit IL-6 für 24, 48 bzw 72 Stunden konnten im normalgewichtigen Kollektiv für keinen Zeitraum signifikante Änderungen der mRNA Expression von Adiponectin, TNF- α und Visfatin gezeigt werden. Im adipösen Kollektiv konnte nach Inkubation mit IL-6 über 48 Stunden eine signifikante Zunahme der Adiponectin mRNA Expression um 163% im Median beobachtet werden ($p < 0,05$). Die TNF- α mRNA Expression stieg nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 signifikant um 96% im Median an ($p < 0,05$). Sowohl nach 48 Stunden Inkubation mit IL-6 als auch nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Visfatin mRNA Expression. Dieser betrug nach 48 Stunden Inkubation mit IL-6 im Median 52% ($p < 0,05$) und nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 im Median 46% ($p < 0,05$).

Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse bezüglich BMI, WHR, CRP und Nüchtern-Glukose im Plasma mit der mRNA Expression der verschiedenen Adipozytokine durchgeführt. Diese zeigte eine signifikante positive Korrelation von BMI und der Adiponectin mRNA Expression nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit IL-6. Der Korrelationskoeffizient betrug nach 24 Stunden Inkubation mit IL-6 0,409 bei $p = 0,02$, nach 48 Stunden Inkubation mit IL-6 0,541 bei $p = 0,001$ und nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 0,532 bei $p = 0,001$. Für die TNF- α mRNA Expression

konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Die Visfatin mRNA Expression zeigte ebenfalls sowohl nach 24 als auch nach 48 und 72 Stunden Inkubation mit IL-6 eine positive Korrelation mit dem BMI. Der Korrelationskoeffizient betrug nach 24 Stunden Inkubation mit IL-6 0,407 bei $p=0,028$, nach 48 Stunden Inkubation mit IL-6 0,413 bei $p=0,026$ und nach 72 Stunden Inkubation mit IL-6 0,414 bei $p=0,04$. Für die WHR, CRP und Nüchtern-Glukose im Plasma konnte keine signifikante Korrelation mit der mRNA Expression der entsprechenden Adipozytokine nachgewiesen werden.

Die durchgeführte Studie bestätigt die Hypothese, dass Zytokine wie IL-6 die Expression von adipozytären Hormonen beeinflussen und zeigt damit potentielle Regelkreisläufe im viszeralen Fettgewebe auf. Unter dem Einfluss von IL-6 kam es wider erwartend in dem Gewebe des nichtdiabetischen adipösen Kollektivs zu einem Anstieg der Adiponectinexpression. Hierbei könnte es sich um einen Kompensationsmechanismus adipöser nichtdiabetischer Patienten handeln, welcher der Entwicklung einer Insulinresistenz bzw. eines Typ-2-Diabetes entgegenwirkt. IL-6 reguliert weiterhin möglicherweise direkt die Expression von TNF- α und Visfatin, wodurch sich hohe TNF- α und Visfatinkonzentrationen bei Adipositas und Typ-2-Diabetes erklären lassen. Es konnte gezeigt werden, dass es eindeutige Unterschiede zwischen dem Fettgewebe normalgewichtiger und übergewichtiger Personen gibt. Diese Unterschiede könnten in der erhöhten Migration von Entzündungszellen in das Gewebe übergewichtiger Patienten begründet liegen.

7. REFERENZEN

- Adams, K. F., A. Schatzkin, et al. (2006). "Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old." *N Engl J Med* 355(8): 763-78.
- Adkins, S. and M. Burmeister (1996). "Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations." *Anal Biochem* 240(1): 17-23.
- Ahima, R. S. (2006). "Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin." *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1: 9S-15S.
- Al-Khalili, L., K. Bouzakri, et al. (2006). "Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle." *Mol Endocrinol* 20(12): 3364-75.
- Algenstaedt, P., C. Schaefer, et al. (2003). "Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia." *Diabetes* 52(2): 542-9.
- Andersson, C. X., V. R. Sopasakis, et al. (2007). "Insulin antagonizes interleukin-6 signaling and is anti-inflammatory in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* 282(13): 9430-5.
- Araki, S., K. Dobashi, et al. (2006). "N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes." *Life Sci* 79(25): 2405-12.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83.
- Balschun, D., W. Wetzel, et al. (2004). "Interleukin-6: a cytokine to forget." *FASEB J* 18(14): 1788-90.
- Bastard, J. P., C. Jardel, et al. (2000). "Variations in plasma soluble tumour necrosis factor receptors after diet-induced weight loss in obesity." *Diabetes Obes Metab* 2(5): 323-5.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2006). "Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance." *Eur Cytokine Netw* 17(1): 4-12.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 87(5): 2084-9.
- Batsis, J. A., R. E. Nieto-Martinez, et al. (2007). "Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine." *Clin Pharmacol Ther* 82(5): 509-24.
- Beltowski, J. (2006). "Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity?" *Med Sci Monit* 12(6): RA112-9.
- Benecke, H., H. Topak, et al. (2000). "A study on the genetics of obesity: influence of polymorphisms of the beta-3-adrenergic receptor and insulin receptor substrate 1 in relation to weight loss, waist to hip ratio and frequencies of common cardiovascular risk factors." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108(2): 86-92.

- Berner, H. S., S. P. Lyngstadaas, et al. (2004). "Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells." *Bone* 35(4): 842-9.
- Boyle, P. J. (2004). "What are the effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on adiponectin, tumor necrosis factor-alpha, and other cytokines in insulin resistance?" *Clin Cardiol* 27(7 Suppl 4): IV11-6.
- Bray, G. A. (2004). "Medical consequences of obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2583-9.
- Cai, D., M. Yuan, et al. (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB." *Nat Med* 11(2): 183-90.
- Carey, A. L., G. R. Steinberg, et al. (2006). "Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase." *Diabetes* 55(10): 2688-97.
- Chen, M. P., F. M. Chung, et al. (2006). "Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 295-9.
- Corbetta, S., G. Bulfamante, et al. (2005). "Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation." *J Clin Endocrinol Metab* 90(4): 2397-402.
- Craddock, D. and A. Thomas (2006). "Cytokines and late-life depression." *Essent Psychopharmacol* 7(1): 42-52.
- de Mello, V. D., M. Kolehmainen, et al. (2008). "Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome." *Metabolism* 57(2): 192-9.
- Despres, J. P. (1991). "Lipoprotein metabolism in visceral obesity." *Int J Obes* 15 Suppl 2: 45-52.
- Despres, J. P. (1994). "Dyslipidaemia and obesity." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8(3): 629-60.
- Deutsche-Gesellschaft-für-Ernährung (2008). "Ernährungsbericht."
- Dimitrov, S., T. Lange, et al. (2006). "Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans." *FASEB J* 20(12): 2174-6.
- Donahue, R. P., R. D. Abbott, et al. (1987). "Central obesity and coronary heart disease in men." *Lancet* 1(8537): 821-4.
- Engstrom, G., B. Hedblad, et al. (2003). "Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain." *Diabetes* 52(8): 2097-101.
- Fain, J. N., A. K. Madan, et al. (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." *Endocrinology* 145(5): 2273-82.

- Fasshauer, M., S. Kralisch, et al. (2003). "Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 301(4): 1045-50.
- Febbraio, M. A. and B. K. Pedersen (2005). "Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ?" *Exerc Sport Sci Rev* 33(3): 114-9.
- Fox, C. S., J. M. Massaro, et al. (2007). "Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study." *Circulation* 116(1): 39-48.
- Franckhauser, S., I. Elias, et al. (2008). "Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice." *Diabetologia* 51(7): 1306-16.
- Fukuhara, A., M. Matsuda, et al. (2005). "Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin." *Science* 307(5708): 426-30.
- Gesundheitsbericht des Bundes (2006).
- Glund, S. and A. Krook (2008). "Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism." *Acta Physiol (Oxf)* 192(1): 37-48.
- Grundy, S. M., J. I. Cleeman, et al. (2005). "Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement." *Circulation* 112(17): 2735-52.
- Guilherme, A., J. V. Virbasius, et al. (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 367-77.
- Hauer, H., P. Bramlage, et al. (2008). "Overweight, obesity and high waist circumference: regional differences in prevalence in primary medical care." *Dtsch Arztebl Int* 105(48): 827-33.
- Hawley, J. A., M. Hargreaves, et al. (2006). "Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and muscle adaptation." *Essays Biochem* 42: 1-12.
- Hector, J., B. Schwarzloh, et al. (2007). "TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat." *Horm Metab Res* 39(4): 250-5.
- Helmert, U. and H. Strube (2004). "[The development of obesity in Germany in the period from 1985 until 2000]." *Gesundheitswesen* 66(7): 409-15.
- Hodge, D. R., E. M. Hurt, et al. (2005). "The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer." *Eur J Cancer* 41(16): 2502-12.
- Hotamisligil, G. S. (1999). "The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance." *J Intern Med* 245(6): 621-5.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 95(5): 2409-15.

- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* 259(5091): 87-91.
- Hu, E., P. Liang, et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." *J Biol Chem* 271(18): 10697-703.
- Jansson, P. A., F. Pellme, et al. (2003). "A novel cellular marker of insulin resistance and early atherosclerosis in humans is related to impaired fat cell differentiation and low adiponectin." *FASEB J* 17(11): 1434-40.
- Ji, Z. Z., Z. Dai, et al. (2011). "A new tumor necrosis factor (TNF)-alpha regulator, lipopolysaccharides-induced TNF-alpha factor, is associated with obesity and insulin resistance." *Chin Med J (Engl)* 124(2): 177-82.
- Jia, S. H., Y. Li, et al. (2004). "Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis." *J Clin Invest* 113(9): 1318-27.
- Jorgensen, S. B., E. A. Richter, et al. (2006). "Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise." *J Physiol* 574(Pt 1): 17-31.
- Kahn, B. B. and J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 106(4): 473-81.
- Kamimura, D., K. Ishihara, et al. (2003). "IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 1-38.
- Kato, A., M. Odamaki, et al. (2009). "Relationship between serum pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin and atherosclerotic parameters in chronic hemodialysis patients." *Am J Nephrol* 29(1): 31-5.
- Katsiogiannis, S., E. K. Kapsogeorgou, et al. (2006). "Salivary gland epithelial cells: a new source of the immunoregulatory hormone adiponectin." *Arthritis Rheum* 54(7): 2295-9.
- Keller, U. (2006). "From obesity to diabetes." *Int J Vitam Nutr Res* 76(4): 172-7.
- Kendal, C. E. and G. D. Bryant-Greenwood (2007). "Pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF/Visfatin) gene expression is modulated by NF-kappaB and AP-1 in human amniotic epithelial cells." *Placenta* 28(4): 305-14.
- Kern, P. A., S. Ranganathan, et al. (2001). "Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(5): E745-51.
- Kern, P. A., M. Saghizadeh, et al. (1995). "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase." *J Clin Invest* 95(5): 2111-9.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-56.

- Kim, H. J., T. Higashimori, et al. (2004). "Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo." *Diabetes* 53(4): 1060-7.
- Klover, P. J., A. H. Clementi, et al. (2005). "Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity." *Endocrinology* 146(8): 3417-27.
- Klover, P. J., T. A. Zimmers, et al. (2003). "Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice." *Diabetes* 52(11): 2784-9.
- Kolb, H. and T. Mandrup-Poulsen (2005). "An immune origin of type 2 diabetes?" *Diabetologia* 48(6): 1038-50.
- Kralisch, S., J. Klein, et al. (2005). "Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(4): E586-90.
- Kristiansen, O. P. and T. Mandrup-Poulsen (2005). "Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?" *Diabetes* 54 Suppl 2: S114-24.
- Krzysik-Walker, S. M., J. A. Hadley, et al. (2011). "Nampt/visfatin/PBEF affects expression of myogenic regulatory factors and is regulated by interleukin-6 in chicken skeletal muscle cells." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.
- Lara-Castro, C., Y. Fu, et al. (2007). "Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease." *Curr Opin Lipidol* 18(3): 263-70.
- Li, L., G. Yang, et al. (2009). "The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in vivo." *Cytokine* 45(1): 12-9.
- Maeda, K., K. Okubo, et al. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)." *Biochem Biophys Res Commun* 221(2): 286-9.
- Maggio, M., J. M. Guralnik, et al. (2006). "Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(6): 575-84.
- Matsuzawa, Y., I. Shimomura, et al. (2003). "Importance of adipocytokines in obesity-related diseases." *Horm Res* 60 Suppl 3: 56-9.
- Mohamed-Ali, V., S. Goodrick, et al. (1997). "Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo." *J Clin Endocrinol Metab* 82(12): 4196-200.
- Moller, B. and P. M. Villiger (2006). "Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases." *Springer Semin Immunopathol* 27(4): 391-408.
- Moller, D. E. (2000). "Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." *Trends Endocrinol Metab* 11(6): 212-7.
- Morin, C. L., R. H. Eckel, et al. (1997). "High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity." *Endocrinology* 138(11): 4665-71.

- Nichols, G. A., B. Arondekar, et al. (2008). "Medical care costs one year after identification of hyperglycemia below the threshold for diabetes." *Med Care* 46(3): 287-92.
- Nieto-Vazquez, I., S. Fernandez-Veledo, et al. (2008). "Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha." *Arch Physiol Biochem* 114(3): 183-94.
- Nishida, M., T. Funahashi, et al. (2007). "Pathophysiological significance of adiponectin." *Med Mol Morphol* 40(2): 55-67.
- Ohlson, L. O., B. Larsson, et al. (1985). "The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913." *Diabetes* 34(10): 1055-8.
- Pajvani, U. B., X. Du, et al. (2003). "Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity." *J Biol Chem* 278(11): 9073-85.
- Pedersen, B. K., A. Steensberg, et al. (2003). "Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects." *Pflugers Arch* 446(1): 9-16.
- Petersen, E. W., A. L. Carey, et al. (2005). "Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1): E155-62.
- Petersen, K. F., S. Dufour, et al. (2004). "Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes." *N Engl J Med* 350(7): 664-71.
- Petersen, K. F. and G. I. Shulman (2006). "Etiology of insulin resistance." *Am J Med* 119(5 Suppl 1): S10-6.
- Pineiro, R., M. J. Iglesias, et al. (2005). "Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes." *FEBS Lett* 579(23): 5163-9.
- Popko, K., E. Gorska, et al. (2010). "Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha and the development of inflammation in obese subjects." *Eur J Med Res* 15 Suppl 2: 120-2.
- Pouliot, M. C., J. P. Despres, et al. (1992). "Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels." *Diabetes* 41(7): 826-34.
- Rexrode, K. M., A. Pradhan, et al. (2003). "Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women." *Ann Epidemiol* 13(10): 674-82.
- Ronti, T., G. Lupattelli, et al. (2006). "The endocrine function of adipose tissue: an update." *Clin Endocrinol (Oxf)* 64(4): 355-65.
- Rotter, V., I. Nagaev, et al. (2003). "Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects." *J Biol Chem* 278(46): 45777-84.

- Ruan, H. and H. F. Lodish (2003). "Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(5): 447-55.
- Ruan, H., P. D. Miles, et al. (2002). "Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance." *Diabetes* 51(11): 3176-88.
- Ryden, M. and P. Arner (2007). "Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue -- from signalling mechanisms to clinical implications." *J Intern Med* 262(4): 431-8.
- Ryder, J. W., M. Gilbert, et al. (2001). "Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations." *Front Biosci* 6: D154-63.
- Samad, F., K. T. Uysal, et al. (1999). "Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6902-7.
- Samal, B., Y. Sun, et al. (1994). "Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor." *Mol Cell Biol* 14(2): 1431-7.
- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *J Biol Chem* 270(45): 26746-9.
- Song, J. W., K. S. Song, et al. (2006). "Plasma level of IL-6 and its relationship to procoagulant and fibrinolytic markers in acute ischemic stroke." *Yonsei Med J* 47(2): 201-6.
- Sopasakis, V. R., M. Sandqvist, et al. (2004). "High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator." *Obes Res* 12(3): 454-60.
- Spath-Schwalbe, E., K. Hansen, et al. (1998). "Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men." *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1573-9.
- Spranger, J., A. Kroke, et al. (2003). "Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study." *Diabetes* 52(3): 812-7.
- Stanley, T. L., M. V. Zanni, et al. (2011). "TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 96(1): E146-50.
- Steensberg, A., G. van Hall, et al. (2000). "Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6." *J Physiol* 529 Pt 1: 237-42.

- Stouthard, J. M., R. P. Oude Elferink, et al. (1996). "Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 220(2): 241-5.
- Sutherland, J. P., B. McKinley, et al. (2004). "The metabolic syndrome and inflammation." *Metab Syndr Relat Disord* 2(2): 82-104.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* 6(10): 772-83.
- Tzanavari, T., P. Giannogonas, et al. (2010). "TNF-alpha and obesity." *Curr Dir Autoimmun* 11: 145-56.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." *Nature* 389(6651): 610-4.
- Vague, J. (1996). "Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947." *Obes Res* 4(2): 201-3.
- van Hall, G., A. Steensberg, et al. (2003). "Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans." *J Clin Endocrinol Metab* 88(7): 3005-10.
- Vozarova, B., C. Weyer, et al. (2001). "Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion." *Obes Res* 9(7): 414-7.
- Wajchenberg, B. L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome." *Endocr Rev* 21(6): 697-738.
- Wallenius, V., K. Wallenius, et al. (2002). "Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity." *Nat Med* 8(1): 75-9.
- Weigert, C., A. M. Hennige, et al. (2005). "Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(2): E251-7.
- Wenzel (1991). "Lexikon der Gentechnologie."
- WHO (2003). *Der europäische Gesundheitsbericht 2002*, WHO Regionale Veröffentlichungen (Hrsg) Europäische Schriftenreihe. 97.
- WHO (2007). "Prevalence of excess body weight and obesity in children and adolescents." *ENHIS Fact Sheet No. 2.3*.
- www.gibthai.com. "Service & Support."
- www.roche-applied-science.com. "Product Information."
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* 112(12): 1821-30.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." *Nat Med* 7(8): 941-6.
- Yokota, T., C. S. Meka, et al. (2002). "Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins." *J Clin Invest* 109(10): 1303-10.

Zhang, L. Q., D. M. Adyshev, et al. (2008). "Interactions between PBEF and oxidative stress proteins--a potential new mechanism underlying PBEF in the pathogenesis of acute lung injury." *FEBS Lett* 582(13): 1802-8.

Zyriax, B. C., P. Algenstaedt, et al. (2008). "Factors contributing to the risk of cardiovascular disease reflected by plasma adiponectin: data from the coronary risk factors for atherosclerosis in women (CORA) study." *Atherosclerosis* 200(2): 403-9.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
A	Adenin
Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-dif[3-ethylbenzthiazolin- sulfonat
AP	Alkalische Phosphatase
aP2	adipocyte fatty acid-binding protein
Arcp 30	30 kDa adipocyte complement-related protein
AS 160	160 Aminosäuren
ASS	Acetylsalicylsäure
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	cirka
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	crossing point
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
dATP	Desoxyadenosidtriphosphat
dCTP	Desoxycytosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosidtriphosphat
d.h.	das heisst
dl	Deziliter
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythyrosidtriphosphat
E	Effizienz
E. coli	Escherichia coli
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay

FBS	fetal bovine serum
evtl.	eventuell
G	Guanin
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
HMV	high molecular weight
IL-6	Interleukin-6
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat-1
IRS-2	Insulin Rezeptor Substrat 2
ISP	inflammation-sensitive plasma protein
Jak	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
IAPP	Inselamyloidpolypeptid
LMW	low molecular weight
m	Meter
MAPK	Mitochondrien aktivierte Proteinkaskade
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilber
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	messenger ribonucleic acid
mU	Milliunits
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD	optische Dichte
pCO ₂	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid

PBEF	pre-B cell colony-enhancing factor
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pg	Picogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
POD	Peroxidase
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PVN	paraventriculärer nucleus
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT-Buffer	Reverse Transkriptase Buffer
RT-PCR	realtime- polymerase chain reaction
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducer and activator of transcription
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TZD	Thiaglitazone
U	Unit
WC	waist circumference
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WHR	waist-to-hip circumference ratio
z.B.	zum Beispiel

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Das humane Fettgewebe mit seinen zellulären Komponenten und Zytokinen	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese.....	26
Abbildung 4: Quantitative Echtzeit PCR:	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Light Cyclers.....	28
Abbildung 6: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für Adiponectin	29
Abbildung 7: Schmelzkurve des Adiponectin-spezifischen PCR-Produkts	30
Abbildung 8: Elektrophoretische Auftrennung des Adiponectin-spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel.....	30
Abbildung 9: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für TNF- α	31
Abbildung 10: Schmelzkurve des TNF- α -spezifischen PCR-Produkts.....	32
Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung des TNF- α -spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel.....	32
Abbildung 12: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für Visfatin	33
Abbildung 13: Schmelzkurve des Visfatin-spezifischen Produkts.....	34
Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung des Visfatin-spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel.....	34
Abbildung 15: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für S27	35
Abbildung 16: Schmelzkurve des S27-spezifischen PCR-Produkts.....	36
Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung des S27-spezifischen PCR-Produkts im Agarosegel.....	36
Abbildung 18: Fluoreszenzreading der realtime PCR mit den Primern für Caspase... ..	38
Abbildung 19: Schmelzkurve des Caspase-spezifischen PCR-Produkts	39
Abbildung 20: Korrelation zwischen BMI und der relativen Adiponectin mRNA Expression.....	41
Abbildung 21: Korrelation zwischen BMI und der relativen Visfatin mRNA Expression.....	42
Abbildung 22: Adiponectin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden	44
Abbildung 23: TNF- α mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden	45
Abbildung 24: Visfatin mRNA Expression in humanem viszeralen Fettgewebe adipöser Probanden	46

10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Petra Algenstedt für die Bereitstellung des Themas und die langjährige Unterstützung. Sie sorgte mit ihren Ratschlägen, ihrer konstruktiven Kritik und den vielen Ideen für das Gelingen der Arbeit.

Ich danke Britta Schwarzloh für die gute Einarbeitung und die großartige Unterstützung im Labor. Ohne Ihre jahrelange Erfahrung und die vielen Tipps wäre mir eine praktische Umsetzung des Themas wohl kaum möglich gewesen.

Meinen Mitdoktoranten Dr. Jonas Hector, Johanna Göhring, Diana Bieschke und Justyna Celer danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Versuchsreihen. Die gemeinsame Probengewinnung und Betreuung der Gewebekulturen hat vieles erleichtert und mir das eine oder andere freie Wochenende beschert.

Agnes Wieczorek und Eveline Piella danke ich für die Unterstützung im Labor. Mit ihnen wurde es nie langweilig.

Den Kollegen von der Anästhesie und Chirurgie, allen voran Herrn PD Dr. Oliver Mann und Prof. Dr. Tim Strate, danke ich für die gute Kooperation bei der Probengewinnung. Ihre Zusammenarbeit hat eine Arbeit mit humanem Gewebe erst ermöglicht.

Herrn Dr. Georg Deuretzbacher gilt mein Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Hiltrud Kretzer und Willy Spettmann für die jahrelange Unterstützung und Ermutigung diese Arbeit zu Ende zu bringen und dafür mich durch alle Höhen und Tiefen des Studiums und meiner bisherigen beruflichen Laufbahn begleiten zu haben. Ohne sie wären ein Studium und eine Dissertation nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt danke ich in aller erster Linie dem wichtigsten Menschen in meinem Leben; meinem Mann Udo Schneider, der mich immer wieder darin bestärkt hat weiter zu machen und nicht aufzugeben, wenn mir mal wieder der Atem ausging. Und der mein Leben immer wieder zum Leuchten bringt.

11. LEBENSLAUF

12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: