

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

Adipozytokine
bei Adipositas und Typ-2-Diabetes:
Systemische und lokale Proteinkonzentrationen
im Vergleich

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Anna Christina Krüzelmann
aus Hamburg

Hamburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss:3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	4
2. EINLEITUNG	5
2.1 Hintergrund	5
2.2. Adiponectin	9
2.3. Resistin	11
2.4. Leptin	13
2.5. TNF- α	14
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. verwendete Reagenzien, Antikörper und Geräte	17
3.1.1. Reagenzien	17
3.1.2. Antikörper	17
3.1.3. Geräte	18
3.2. Proteinisolierung	19
3.2.1. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	19
3.3. Western Blot	20
3.3.1. Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel	20
3.3.2. Semi-Dry Western Blotting	21
3.3.3. Immunodetection und Chemilumineszenzmessung	22
3.4. ELISA	23
3.5. RIA	23
3.6. Genehmigung	24
3.7. Statistik und Auswertung	24
4. ERGEBNISSE	26
4.1. Adiponectin	26

4.2. Resistin	30
4.3. Leptin	33
4.4. TNF-α	36
5. DISKUSSION	38
6. ZUSAMMENFASSUNG	43
7. LITERATURVERZEICHNIS	44
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	55
9. DANKSAGUNG	56
10. ERKLÄRUNG	57
11. LEBENSLAUF	58

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das metabolische Syndrom bezeichnet einen Symptomkomplex aus pathologischer Glucosetoleranz, Insulinresistenz beziehungsweise Typ-2-Diabetes, stammbetonter Adipositas, Fettstoffwechselstörungen im Sinne einer Hyper- und Dyslipidämie und essentieller arterieller Hypertonie, und stellt ein großes gesundheitsmedizinisches Problem dar.

Zwischen der Insulinresistenz und dem Body Mass Index konnte eine direkte Korrelation festgestellt werden, so dass Adipositas einen der größten Risikofaktoren für die Entstehung einer Insulinresistenz und die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes darstellt. Auf der Suche nach den Mechanismen der Pathogenese von Adipositas und Typ-2-Diabetes wurden in den letzten Jahren verschiedene vom Fettgewebe synthetisierte Adipozytokine entdeckt.

Ziel dieser Studie war es, die Proteinexpression verschiedener Adipozytokine wie Adiponectin, Resistin, Leptin und TNF- α im Serum von Typ-2-Diabetikern, Adipösen und Kontrollpersonen im Vergleich zur lokalen Konzentration im Fettgewebe zu analysieren, um damit einen Parameter zu gewinnen, der die Möglichkeit bietet, die lokale metabolische Situation darzustellen und als klinischer Verlaufparameter gegebenenfalls einsetzbar ist. So könnten Subgruppen von Typ-2-Diabetikern aufgrund unterschiedlicher Adipozytokinkonstellationen erhoben werden und es könnten sich neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

2. Einleitung

2.1 Hintergrund

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung, die unter dem Leitbefund der Hyperglykämie, den Typ-1 und Typ-2-Diabetes beinhaltet. Klassifiziert wird der Diabetes mellitus nach der World Health Organisation (WHO) [1] und der American Diabetes Association (ADA) [2]. Die Diagnose des Diabetes mellitus wird durch zu hohe Nüchternblutglucosewerte oder einen pathologischen Glucosetoleranztest gestellt [1], [2].

Weltweit sind derzeit über 170 Millionen Menschen von Diabetes mellitus betroffen. Für das Jahr 2010 wird von einem Wachstum um 50% ausgegangen, wobei besonders Afrika, Asien und Süd Amerika betroffen sein werden [3]. Während der Typ-1-Diabetes nur etwa 10% aller Diabetiker betrifft, sind über 80% aller Diabetiker am Typ-2-Diabetes erkrankt [4].

Der Typ-1-Diabetes manifestiert sich meist im Kindes- und Jugendalter. Die Prävalenz beträgt in Deutschland ca. 5% [4]. Pathogenetisch kommt es durch einen Autoimmunprozeß zu einer Zerstörung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas. Daraus resultiert ein vollständiger Funktionsverlust der Langerhans'schen Inseln und damit ein absoluter Insulinmangel. Die Therapie besteht in der Gabe von Insulin nach dem Vorbild der physiologischen Insulinsekretion (Intensivierte Insulintherapie).

Die Pathogenese des Typ-2-Diabetes ist nicht abschließend geklärt. Zum einen besteht eine genetische Veranlagung, die insbesondere durch die hohe Konkordanz der Erkrankung bei monozygoten, genetisch-identischen Zwillingen betont wird. 91% der Zwillinge haben konkordant einen manifesten Typ-2-Diabetes, und viele der diskordanten, nicht manifesten diabetischen Zwillinge weisen Störungen der Insulinsekretion auf [5]. Verschiedene Familienstudien zeigen, dass Verwandte von Typ-2-Diabetikern ebenfalls zu 25-50% einen Typ-2-Diabetes haben [6], [7].

Des Weiteren spielen neben der Vererbung auch Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle in der Entstehung des Typ-2-Diabetes, so zum Beispiel die Ernährung und die Fettverteilung [8]. Hervorzuheben ist der Zusammenhang zwischen Adipositas und Typ-2-Diabetes [9], [10], [11], [12], [13].

Adipositas ist als übermäßige Vermehrung oder Bildung von Fettgewebe definiert [14]. Der Body Mass Index (BMI) -definiert als das Körpergewicht in Kilogramm geteilt durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat- dient der indirekten Abschätzung der Fettmasse, ein Wert $<25 \text{ kg/m}^2$ gilt als normal. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Prävalenz der Adipositas Grad 1 ($25 \text{ kg/m}^2 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) 40%, der Adipositas Grad 2 ($30 \text{ kg/m}^2 < \text{BMI} < 40 \text{ kg/m}^2$) 16% und der Adipositas Grad 3 ($\text{BMI} > 40 \text{ kg/m}^2$) 1% [15]. Weltweit geht man von ca. 250 Millionen Übergewichtigen aus, und diese Zahl soll bis 2025 auf 300 Millionen ansteigen [16].

Adipositas und Typ-2-Diabetes sind Teil des metabolischen Syndroms, das als heterogener Symptomkomplex aus pathologischer Glucosetoleranz,

Insulinresistenz beziehungsweise Typ-2-Diabetes, stammbetonter Adipositas, Fettstoffwechselstörungen im Sinne einer Hyper- und Dyslipidämie und essentieller arterieller Hypertonie besteht [17], [18], [19], und zunehmend an bevölkerungsmedizinischer Bedeutung gewinnt [20]. Die erhöhte Sterblichkeit ergibt sich hauptsächlich durch arteriosklerotische Komplikationen wie Myokardinfarkt und Apoplex oder Karzinome [3], [10]. Aufgrund der hohen Begleit- und Folgemorbidität beansprucht der Diabetes mellitus zwischen 5-10% aller Ausgaben in den Gesundheitssystemen der Industrieländer [21].

Die Entwicklung des Typ-2-Diabetes beruht zum einen auf einer Insulinresistenz von Muskel-, Leber- und Fettzellen [22], [23], als auch auf einer Insulinsekretionsstörung der pankreatischen β -Zellen [24]. Initial besteht eine Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe (Muskel-, Leber- und Fettgewebe), die einen erhöhten Insulinspiegel zur zellulären Glucoseverwertung erfordert. Daraus resultiert eine vermehrte Insulinsekretion der β -Zellen im Pankreas und eine Hyperinsulinämie. Folgen der Hyperinsulinämie sind ein gesteigertes Hungergefühl, welches die Entstehung der Adipositas begünstigt, sowie eine Verminderung der Sensibilität und Dichte der Insulinrezeptoren im Zielgewebe (Muskel-, Leber- und Fettgewebe). In einem Circulus vitiosus ergibt sich daraus eine Steigerung der Insulinsekretion und eine Verstärkung der Insulinresistenz. Schließlich erschöpfen die pankreatischen β -Zellen und es kommt zu einer Erschöpfung der endogenen Insulinproduktion.

Der Typ-2-Diabetes entwickelt sich somit aus der Kombination von Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes-Genen [25]. Diese These ließ

sich in gezielten Kreuzungen, bei denen Modelle mit Adipositas und Insulinsekretionsstörungen kombiniert wurden, belegen [26].

Die Behandlung des Typ-2-Diabetes besteht zu Beginn vorrangig aus einer Gewichtsnormalisierung (Ernährungsumstellung, körperliche Aktivität). Je nach Schweregrad bedarf es zusätzlich einer medikamentösen Therapie.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Pathogenese von Adipositas und Typ-2-Diabetes hat sich in den letzten Jahren insbesondere das Interesse am Fettgewebe als Speicherorgan, entscheidend für die Energiefreisetzung, die thermische Isolation und die Polsterung verschiedener Organe, auf die Funktion als endokrines Organ, das in der Lage ist verschiedene Hormone auf endokrinem, parakrinem oder autokrinem Weg zu sezernieren, verschoben [27]. Dabei konnten verschiedene vom Fettgewebe sezernierte Adipozytokine identifiziert werden [12].

Ziel dieser Untersuchung war es, die Proteinexpression verschiedener Adipozytokine wie Adiponectin, Resistin, Leptin und TNF- α im Plasma von Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen, mit den lokalen Konzentrationen im Fettgewebe zu vergleichen, um damit einen Parameter zu gewinnen, der die Möglichkeit bietet von der systemischen Konzentration im Plasma auf die lokale metabolische Situation im Fettgewebe zu schließen, und damit als klinischer Verlaufparameter gegebenenfalls einsetzbar ist. Darüber hinaus ließe sich der Typ-2-Diabetes eventuell aufgrund unterschiedlicher Adipozytokinkonstellationen in verschiedene Phänotypen unterteilen, und damit neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

Zur Bestimmung der lokalen Proteinexpression, und damit Repräsentation der lokalen metabolischen Situation, wurde intraoperativ Fettgewebe von normalgewichtigen, adipösen und diabetischen Patienten entnommen. Die Ergebnisse wurden mit den systemischen Proteinkonzentrationen aus dem Plasma der Patienten korreliert, um eine Aussage über den Zusammenhang zwischen systemischer Konzentration im Plasma und lokaler Expression im Fettgewebe zu erheben. Die Proteinexpression von Adiponectin und Resistin wurde mittels RIA, die Leptinkonzentration mittels ELISA und die Expression von TNF- α mittels Western Blot bestimmt.

Im folgenden möchte ich nun detailliert auf die verschiedenen Adipozytokine eingehen.

2.2. Adiponectin

Adiponectin wurde erstmalig 1995 erwähnt [28] und von vier unterschiedlichen Gruppen identifiziert. Dadurch sind auch verschiedene Namen bekannt: adipocyte complement-related protein 30 (Acrp30) [28], adipose most abundant gene transcript (apM1) [29], AdipoQ [30] und gelatin-binding protein (gbp28) [31]. Der bekannteste Name allerdings ist Adiponectin [32], [33].

Es handelt sich hierbei um ein ca. 35 kD schweres Protein, bestehend aus 247 Aminosäuren [45]. Im Plasma formt Adiponectin mit anderen Komplexen ein großes multimeres Molekül, das für die Funktion ausschlaggebend ist. Adiponectin zeigt eine Strukturhomologie zu TNF- α und den Kollagenen 8 und 10 [34]. Verschiedene Polymorphismen des Adiponectingens sind gefunden worden, von denen besonders zwei positiv mit Adipositas und Insulinresistenz korrelieren [35]. Erst kürzlich sind Adiponectin Rezeptoren identifiziert [36] und in dem Zusammenhang

erhöhte Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) Konzentrationen, sowie erhöhte PI 3-Kinase Aktivität gemessen worden [37].

Funktionell wirkt Adiponectin über die AMP-Kinase, supprimiert die hepatische Glukoneogenese und die Lipolyse, und steigert dadurch die Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel und die Fettsäureoxidation [38], [39], [40]. Ebenso wird bei der Wirkung von Metformin und Glitazonen eine Beteiligung der AMP-Kinase vermutet und so die antidiabetische Wirkung erklärt [41], [42]. Eine weitere wichtige Aufgabe von Adiponectin ist der antiinflammatorische, protektive Effekt, wodurch Adiponectin zum Beispiel der Bildung einer Arteriosklerose, durch Effekte auf die Monocytenadhäsion am Endothel, die Myeloiddifferenzierung, die Cytokinproduktion und Phagozytose, vorbeugt [33].

Bei adipösen Patienten und Typ-2-Diabetikern lässt sich sowohl eine signifikante Erniedrigung der Adiponectinkonzentration im Plasma [43], [32], als auch eine verminderte m-RNA Expression von Adiponectin im Fettgewebe [30] nachweisen. Des weiteren kann nachgewiesen werden, dass Adiponectin signifikant negativ mit dem BMI, dem Plasmaglucosegehalt und dem Triglyceridgehalt im Serum korreliert [34]. Bei Gewichtsabnahme steigen die Adiponectinlevel an und bei fettreicher Diät sinken sie im Gegensatz dazu ab [43]. So kann gezeigt werden, dass db/db-Mäuse, die einen genetischen Leptinrezeptordefekt aufweisen, nicht nur nach Leptingabe ihr Gewicht reduzieren, sondern auch nach Gabe von Adiponectin [44], wobei höhere Dosen keinen additionalen Effekt zeigen [34]. Adiponectin Knockout-Experimente zeigen einen gestörten Fettsäuremetabolismus und nach hochkalorischer Diät eine Insulinresistenz. Durch exogene Adiponectinzufuhr ist dieser Zustand reversibel [45].

Die bisherigen Ergebnisse liefern damit einen interessanten Einblick in die enge Verknüpfung zwischen der Adiponectinexpression und der Insulinresistenz. Adiponectin ist eng gekoppelt mit der Insulinsensitivität und bietet potentiell neue therapeutische Optionen in der kausalen Therapie des Typ-2-Diabetes.

2.3. Resistin

Resistin wird auch als Adipocyte Secreted Factor (ADSF) [46] oder Found in Inflammatory Zone 3 (FIZZ3) [47] bezeichnet.

Resistin ist ein Cystein-reiches aus 94 Aminosäuren bestehendes Dimer, welches über Disulfidbrücken verbunden ist und fast ausschließlich vom weißen Fettgewebe sezerniert wird [48]. Es ist ein ca. 20 kD schweres adipozytäres Signalmolekül [46] und gehört zu einer Proteingruppe die bei Mäusen auch Resistin-Like Molecules (RELMS) und FIZZ Proteine beinhaltet [47], [49]. Allerdings wird nur Resistin von Adipozyten sezerniert. Das humane Resistin wurde auf Chromosom 19 identifiziert [46], wobei die Aminosäuresequenz des Proteins nur zu 59% mit dem der Maus identisch ist [50], [51]. Die Expression des Gens in humanem Fettgewebe ist wesentlich geringer als die Konzentration des Mausgens im Fettgewebe der Maus [51]. Die Unterschiede der Expression und der Codierungslokalisierung im Chromosom zwischen Menschen und Nagern lassen eventuell auf verschiedene endokrine Bedeutungen des weißen Fettgewebes schließen [52].

Obwohl die Funktion von Resistin noch nicht verstanden ist, gibt es Hinweise darauf, dass es in der Insulinresistenzentstehung, sowie in der Adipozytendifferenzierung eine Rolle spielt [48], [46]. Bei diätinduzierter Adipositas, sowie in ob/ob- (fehlende Leptinsynthese) und db/db- (Leptinrezeptordefekt) Mausmodellen lassen sich erhöhte

Resistinkonzentrationen messen [46]. Veränderungen im BMI korrelieren signifikant positiv mit Veränderungen von Resistinkonzentrationen im Plasma [53]. Des Weiteren zeigt sich unter Behandlung mit Glitazonen eine Verminderung der Resistinexpression [54], [52]. Die Genexpression, sowie die Serumkonzentrationen sind während des Fastens reduziert, und eine Behandlung mit Antikörpern gegen Resistin ergibt eine Verminderung der Insulinresistenz und verbessert die Glukoseaufnahme in die Zellen [46]. Eine weitere Studie zeigt, dass Resistin und resistin-like-molecule- β eine schwere hepatische Insulinresistenz hervorrufen [55].

Im Gegensatz dazu wird auch eine verminderte Resistinexpression im Fettgewebe adipöser, insulinresistenter Mausmodelle gefunden [56]. Andere Untersuchungen schreiben Resistin eine Bedeutung in der Entzündungsreaktion zu [47], [57], [58]. Des Weiteren kann eine erhöhte Expression in der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung nachgewiesen werden [50], [59].

Man erhoffte sich mit diesem neuen Protein die lange gesuchte Verbindung zwischen Adipositas und der Entstehung des Typ-2-Diabetes gefunden zu haben [50], [46]. Die Wirkung von Resistin auf verschiedene Zielgewebe wie Muskel, Leber und ZNS beim Menschen bleibt allerdings noch unklar. Bisher wird deklariert, dass Resistin die Kapazität besitzt die Insulinwirkung in der Leber zu beeinträchtigen, in welchem Ausmaß es jedoch Einfluss auf die Insulinresistenzentstehung nimmt bleibt noch offen [55].

2.4. Leptin

Leptin (grch.: leptos = dünn) ist ein 16 kD schweres Proteohormon bestehend aus 167 Aminosäuren. 1994 wurde das auf Chromosom 7 (7q31) lokalisierte ob-Gen charakterisiert [27], [60].

Leptin wird hauptsächlich in Adipozyten von subkutanem und visceralem Fettgewebe produziert und dann in den Blutkreislauf abgegeben [27]. Leptinrezeptoren sind in hypothalamischen Regionen identifiziert worden und sind bedeutend in der Nahrungsregulation [61], [62]. Weitere Leptinrezeptoren sind auch peripher in Adipozyten [63], pankreatischen β -Zellen, Hepatozyten [64] und Muskelzellen [65] nachgewiesen worden [66].

Leptin moduliert über diese Rezeptoren die Insulinsekretion. So kann zum Beispiel eine direkte Inhibition der basalen Insulinsekretion bei hohen Leptinkonzentrationen aufgezeigt werden [67]. Hingegen fallen Mäuse mit einem Defekt im ob-Gen, die kein Leptin im Fettgewebe synthetisieren können, durch Hyperphagie, Adipositas, Insulinresistenz und Sterilität auf [68]. Durch exogene Leptingabe kann bei diesem Gendefekt eine vollständige Normalisierung des Krankheitsbildes bewirkt werden [69], [70]. Auch bei Menschen die sehr niedrige Leptinspiegel bei massiver Adipositas aufwiesen wird dieser Defekt gefunden [71].

Leptin führt zu einer Gewichtsreduktion durch Appetitsuppression, zu erhöhtem Energieverbrauch und zu einer Reihe von Effekten im Immunsystem, im neuroendokrinen System und in der Reproduktion [72], [73], [74], [75].

Leptinlevel unterliegen einem zirkadianen Rhythmus und sind zwischen Mitternacht und frühem Morgen am höchsten. Man vermutet, dass die pulsatile Sekretion damit während der nächtlichen Schlafenszeit das Verlangen nach Nahrung unterdrückt [76].

Allerdings weisen viele Modelle mit Adipositas assoziierter Insulinresistenz bei Menschen und Mäusen deutlich erhöhte Leptinspiegel im Blut und eine gesteigerte Leptinexpression im Fettgewebe auf, ohne dass ein Gendefekt nachzuweisen ist [77]. Es handelt sich hierbei also nicht um eine Leptindefizienz oder genetisch determinierte Leptinrezeptordefizienz. Die Annahme einer Leptinresistenz liegt somit nahe, wobei die Mechanismen, die bei Adipösen und Typ-2-Diabetikern zu erhöhten Leptinleveln führen noch nicht geklärt sind. Erklärungsansätze ergeben sich zum einen da Leptin um zentral wirken zu können, die Blut-Hirn-Schranke überwinden muss. Es zeigen sich dabei erniedrigte Liquorkonzentrationen von Leptin bei Adipösen im Vergleich zur Leptinkonzentration im Plasma, so dass eventuell der Transport des Proteins in den Liquorraum frühzeitig gesättigt ist [78].

Es wurde gezeigt, dass der Serumleptinwert positiv mit dem BMI [79] und dem Alter bei Gesunden und Typ-2-Diabetikern [80] korreliert und die Applikation von Leptin zu einem Abfall des Plasmainsulins und zu einem Anstieg der Blutglukose führt [81].

Die Rolle einer Leptinresistenz, neben einer genetisch determinierten Leptinrezeptordefizienz, in der Entstehung der Insulinresistenz beim Typ-2-Diabetiker bleibt noch weiter zu untersuchen. Zusammenfassend lässt sich Leptin jedoch eine wichtige Regulationsfunktion bei der Nahrungsaufnahme und Verstoffwechslung auf verschiedenen Ebenen zuweisen.

2.5. TNF- α

Der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Cytokin und wurde 1988 identifiziert [82], [83]. Es ist ein 26 kD großes

Protein und wird von Makrophagen und Monozyten produziert [84]. Zur gleichen Zeit wurde in Zusammenhang mit der Untersuchung der Kachexie auch Cachetin entdeckt [85]. Der Vergleich von TNF- α und Cachetin ergab, dass sie identisch sind [86].

1993 konnte dann die Expression von TNF- α auch im Fettgewebe nachgewiesen werden [101]. Seit der Entdeckung ist bekannt, dass TNF- α weit mehr als ein Tumor Nekrose Faktor ist und verschiedene Zielzellen und -gewebe erreicht. TNF- α nimmt unterschiedliche Funktionen in der Immun- und Entzündungsreaktion, der Synthese und Sekretion im Fettgewebe und als Mediator der Insulinresistenz beim Typ-2-Diabetes ein [87].

Verschiedene Theorien lassen vermuten, dass TNF- α in hohen Konzentrationen in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes involviert ist [88]. Bei adipösen und insulinresistenten Patienten werden erhöhte m-RNA Expressionen von TNF- α im Fettgewebe und Skelettmuskel gemessen [89]. Dabei korreliert die Expression von TNF- α negativ mit der Insulinsensitivität [90]. Ergänzend zeigen verschiedene Polymorphismen im TNF- α Locus eine positive Korrelation mit der Insulinresistenz [91] und eine Inhibition der Insulinsignalkaskade [92].

Verschiedene in vitro Studien untersuchten, in welcher Weise TNF- α die Insulinsignalkaskade beeinflusst. Dabei wirkt TNF- α hauptsächlich über zwei Rezeptoren: p75 und p55 [93]. Außerdem stimuliert TNF- α die Produktion von verschiedenen Molekülen wie Leptin [94] und freien Fettsäuren [95] in Adipozyten und beeinflusst auf diesem Wege zusätzlich die Insulinresistenzentstehung.

Eine direkte Applikation von TNF- α führt zu einer Insulinresistenz [96]. Die Neutralisation von TNF- α bei insulinresistenten, adipösen Tieren hingegen ergibt eine verbesserte periphere Glukoseaufnahme [101].

Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie durch Infusion eines TNF- α -Antikörpers die Insulinresistenz bei Menschen und Nagern nicht verbessert werden [97], [98]. Eine weitere Untersuchung ergab keinen Effekt einer Behandlung mit TNF- α auf die Insulinkaskade im Skelettmuskel [99]. Knockout-Experimente zeigen, dass adipöse Mäuse ohne TNF- α -Produktion die gleichen Insulinlevel aufweisen wie die Kontrollgruppen, adipöse Wildtypen allerdings weisen eine deutliche Hyperinsulinämie auf [100].

Zusammenfassend sei deshalb darauf hingewiesen, dass sich in Bezug auf Wirkung und Wichtigkeit von TNF- α in der Pathogenese der Insulinresistenz viele Studien widersprechen. Bei Ratten kann schließlich gezeigt werden, dass erhöhte TNF- α Expression eine Insulinresistenz bedingen, die Bedeutung beim Menschen bedarf aber noch der Aufklärung [101] und viele Fragen über den Einfluss von TNF- α in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes bleiben noch offen.

3. Material und Methoden

3.1. verwendete Reagenzien, Antikörper und Geräte

3.1.1. Reagenzien

Na-Vanadat, Na-Pyrophosphat, Na-Fluoride, Glycin, Sodium-phosphat, HCL, 2-Propanol, Methanol, Tris-HCL, Tris-Base, NaCl, Magermilch, (Merk, Darmstadt, Deutschland); TWEEN 20, Mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); ECL Western Blotting Detection Reagenz (Amershan Life Science, Buckinghamshire, Grossbritannien); Bench Marktm Prestained Protein Ladder (Gibco BRL-Life Technologies, MD, USA); Leupeptin, Aprotinin, PMSF, HEPES, EDTA, Triton X-100 (Sigma; St.Louis, MO, USA); BCA-Protein Assay (Pierce, IL, USA); DTT (Gibco, BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); Glycin (ICN Biomedicals, Ohio, USA); SDS (Bio-Rad, Hercules; CA, USA); BSA Fraktion V (Serva, Heidelberg, Deutschland).

SDS-Gel:

40% Acrylamid/N,N', Methylenbisacrylamid-37,5:1, Ammoniumpersulfat (APS), N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (Temed), Bromphenolblau, SDS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Tris-HCL (Merk, Darmstadt, Deutschland); Glycerol (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.1.2. Antikörper

Adiponectin Antikörper	125I-adiponectin/ adiponectin antibody, Human Adiponectin RIA Kit, Linco Research Inc., Missouri, USA.
------------------------	---

Resistin Antikörper	rabbit polyclonal anti-human resistin antibody, Human Resistin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic.
Leptin Antikörper	mouse anti-human leptin, ELISA Development System human Leptin, R&D Systems, Minneapolis, USA.
TNF- α Antikörper	n-19, anti human TNF- α , Santa Cruz Biotechnology, California, USA.

3.1.3. Geräte

Reinraumwerkbank VBM 400 (The Baker Company, Inc., Stanford, Kent., USA); Zentrifuge Hettich-Universal (Tuttlingen, Deutschland); Stickstofftank 35 VHC (TaylorWharton, IN, USA); -80°C Tiefkühlschrank IUF 8520 (Romulus Holding, NY, USA); Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland); Proteingelkammer (Bio-Rad, Herkules, CA, USA); Vortexer, VF2 (Jahnke& Kunkel); Tisch-Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K (Hettich, Tuttlingen, Deutschland); Wasserbad Typ1002 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland); Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); Magnetrührer/Heizplatte

(Ikamag RCT, Steufen, Deutschland); Heizblock Tri-Block DB-3 (Techne, Cambridge, England); Überkopfschüttler (Heidolph, Kelkheim, Deutschland); Microcomputer Electrophoresis Power Supply E714 (Consort, Turnhout, Belgien); SemiDry-Blotgerät (Biometra); Power Supply Power Pac 300 (BioRad, Hercules, CA, USA); Absorptionsspektrometer (Pharmacia Biotech, VA, USA); pH-Meter CG 820 (Schott Geräte GmbH, Hofheim, Deutschland); Waage PM 4600 (Mettler, Gießen, Deutschland); Autoklav (Webeco); Eismaschine (Scotsman).

Die sterilen Kulturgefäße und Kunststoff-Einmalartikel stammten von der Firmen Costar (Cambridge, MA, USA), Falcon (Oxnard, CA, USA) und Nunc (Roskilde, Dänemark); Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); Filterpapier (Whatmanpaper); Trans-Blot pure Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); Hyperfilm-ECL (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Großbritannien).

3.2. Proteinisolierung

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Das Fettgewebe wurde in Lysispuffer zerteilt. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation wurde dann der Überstand zur Proteinbestimmung verwendet.

3.2.1. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Lysate wurde der BCA Protein Assay (Pierce, IL, USA) verwendet. Das Protein bildet mit Cu^{2+} Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex in Biuret-Reaktion. Dabei werden die Cu^{2+} Ionen zu Cu^+ Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure

(BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Bei den durchgeführten Proteinbestimmungen wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standard verwendet. 3µl der zu bestimmenden Proteinprobe wurden mit 7µl H₂O auf 10µl und anschließend mit 200µl BCA Reagenz aufgefüllt und dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben durch photometrische Messung bei 550nm bestimmt. Sämtliche Maßnahmen waren Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode der linearen Regression berechnet.

3.3. Western Blot

3.3.1. Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel

Die Auftrennung der Proteine wurde mittels der SDS-PAGE durchgeführt. Dabei wurde die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine unter denaturierten Bedingungen genutzt, unter denen die negativ geladenen SDS-Polypeptid-Komplexe, proportional dem Logarithmus ihrer Masse zur Anode wandern [102], [103]. Als Proteinstandard wurde der HRP Proteinmarker von 6.5kD -165kD (HRP Protein Marker Detection Reagents, BioLabs Inc., New England, USA) und der Bench Mark 11kD - 221kD (Bench MarkTM Prestained Protein Ladder, Gibco BRL-Life Technologies, MD, USA) eingesetzt. Das SDS-Gel bestand aus einem Trenngel, das mit einem Sammelgel überschichtet wurde. Sowohl Trenngel als auch Sammelgel wurden aus einer 40%-igen Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37, 5:1) -Stocklösung hergestellt. Dabei wurde die Konzentration des Trenngels, entsprechend der Größe der zu analysierenden Proteine zwischen 10% und 12,5% Polyacrylamid gewählt. Das Sammelgel enthielt einen 4%-Acrylamid-Mix. Als Trenn- bzw.

Sammelpuffer wurde Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) eingesetzt. Das Trenngel enthielt 1,5M Tris [pH 8,8]. Das Sammelgel bestand aus 0,5M Tris [pH 6,8]. Die Polymerisation wurde durch Zusatz von 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Der Elektrophorese Puffer bestand aus 25mM Tris-Base [pH 8,3], 192mM Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden entweder sofort auf das Gel geladen oder bei -20°C tiefgefroren und dann bevor sie auf das Gel geladen wurden, nochmals bei 100°C für fünf Minuten denaturiert.

3.3.2. Semi-Dry Western Blotting

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry Western Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und dort gebunden werden. Der Proteintransfer erfolgte in einer horizontalen Blotting-Apparatur, in der zwei flache Elektroden-Platten angeordnet waren, die mindestens die Größe eines oder mehrerer Gele aufwiesen. Das Gel wurde zuerst im Transfer-Puffer eingeweicht. Der Puffer enthielt 48mM Tris-Base, 1,3mM SDS und 20% Methanol. Das Methanol diente dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen. Dann wurde das Gel luftblasenfrei auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt und beidseitig mit Filterpapier (Whatmanpapier), das ebenfalls mit Pufferlösung getränkt wurde und so als Ionen-Reservoir diente, ummantelt. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen die beiden Elektrodenplatten gelegt, so dass die Nitrocellulose-Membran sich auf der Anodenseite befand. Der Proteintransfer erfolgte gekühlt bei einer konstanten Stromstärke von

2,5mA/cm² Nitrocellulose-Membran für ca. eine Stunde. Die Vollständigkeit des Protein-Blottings konnte mit Hilfe des vorgefärbten Molekulargewicht-Standards überprüft werden.

3.3.3. Immunodetection und Chemilumineszenzmessung

Die im Western-Blotting immobilisierten Proteine wurden mit Hilfe entsprechender Antikörper und nachfolgender Markierung des Antikörper-Antigen-Komplexes mittels zweitem Antikörper und Enhanced Chemilumineszenz bzw. Enhanced Chemilumineszenz Plus (ECL, Amershan Life Science, Buckinghamshire, Großbritannien) visualisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur in TBS (bestehend aus 25mM Tris-Base [pH 7,4] und 127mM NaCl) inklusive 5% Magermilch geblockt. Die anschließende Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper wurde unter vorsichtigem Schütteln in 1%-iger BSA/TBS Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde der Blot für jeweils fünf Minuten mit TBS, TBS/T (bestehend aus TBS und 0,1% TWEEN 20) und wieder mit TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper als Kontrolle für eine Stunde in 1%-iger BSA/TBS-Lösung. Nachfolgend wurde der Blot dreimal für je fünf Minuten wie beim vorherigen Waschgang mit TBS bzw. TBS/T gewaschen, um wiederum nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zur Detektion der Banden wurde die Membran nach dem letzten Waschgang entweder für eine Minute mit ECL Reagenz oder für fünf Minuten mit ECL-Plus-Lösung inkubiert. Während dieses Vorganges kommt es zur Oxidation von Luminol durch eine Peroxidase, wodurch eine

Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wird, bei der sich das Luminol in einem angeregten Zustand befindet und beim Zurückkehren in den Grundzustand Licht emittiert [104]. Unmittelbar nach der Inkubationszeit wurde der Blot luftblasenfrei in eine Folie geschlagen und auf einen Hyperfilm ECL (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Großbritannien) in der Dunkelkammer unterschiedlich lange (zwischen fünf Sekunden bis zu fünf Minuten) exponiert. Der Blot wurde zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.4. ELISA

Die Proben wurden in micro titer wells, die mit rabbit polyclonal anti-human resistin antibody (Human Resistin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic) bzw. mouse anti-human leptin (ELISA Development System human Leptin, R&D Systems, Minneapolis, USA) beschichtet waren, eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen und mit zugefügtem biotin-labeled polyclonal antihuman resistin antibody/ biotinylated mouse anti-human leptin und captured resistin/ leptin inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde streptavidin-horseradish peroxidase conjugate zugefügt und wieder eine Stunde lang inkubiert. Nun wurde zum übriggebliebenen Konjugat H₂O₂-tetramethylbenzidine hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von acidic solution gestoppt und die Absorbance des resultierenden gelben Produktes bei 450nm gemessen. Dabei war die Absorbance proportional zu der Konzentration von Resistin/ Leptin in der Probe.

3.5. RIA

Die verdünnten Proben wurden mit Assay Puffer, ¹²⁵I-adiponectin und adiponectin antibody (Human Adiponectin RIA Kit, Linco Research Inc.,

Missouri, USA) inkubiert. Nach vortexen und Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht wurde am nächsten Tag rabbit carrier und precipitating reagent hinzugefügt. Die Proben wurden wiederholt zentrifugiert, der Überstand sofort dekantiert und für eine Minute im gamma counter gemessen.

3.6. Genehmigung

Die Arbeit wurde vom Ethik Komitee genehmigt: (OB/12/2000).

3.7. Statistik und Auswertung

Die matched paired Analyse wurde in Berücksichtigung von Alter und Geschlecht durchgeführt. Die einzelnen Gruppen wurden nach dem BMI in Normalgewichtige ($BMI < 30$) ($n = 46$), Adipöse ($BMI > 30$) ($n = 23$) und zusätzlich in Patienten mit Typ 2 Diabetes ($n = 88$) eingeteilt. Der BMI wurde als Gewicht (Kilogramm) dividiert durch die Körpergröße (Meter) zum Quadrat, berechnet. Die Blutproben wurden vor dem operativen Eingriff entnommen. Standardlaborparameter wurden erhoben und nach Zentrifugation gewonnenes Serum wurde in ELISA und RIA eingesetzt.

Zur Auswertung der Western Blots wurden die Banden mit Hilfe des Durchlicht-Scanners (SnapScan 1236, Fa. AGFA) und der Software FotoSnapShop[®] eingescannt. Die anschließende Bildverarbeitung der Blots erfolgte mittels Adobe Photoshop[®]. Die Banden wurden daraufhin mit Hilfe des Software-Programmes NIH-Image[®] densitometrisch gemessen und ausgewertet. Untersuchungen und Diagramme wurden mit dem Programm EXEL[®] erstellt. Um repräsentative Daten zu erhalten, wurden die Proben zweimal wiederholt.

Alle gezeigten Werte stellen Durchschnittswerte \pm der Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean, SEM) dar. Die Signifikanzauswertung wurde mit Hilfe des Wilcoxon Tests für ungepaarte Stichproben und die Korrelation mittels Spearman R aus dem Programm nichtparametrischer Verfahren von STATISTICA[®] durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

Es wurden Blut- und Fettgewebsproben von insgesamt 157 Patienten aus der Abteilung für Orthopädie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf untersucht. Die Patienten gaben vorher ihr schriftliches Einverständnis. Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und malignen Tumoren wurden von der Studie ausgeschossen. Alle 157 Patienten waren Kaukasier.

Während orthopädischer Operationen wurde subkutanes Fettgewebe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff gelagert bis es anschließend bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt wurde. Die Expression von Adiponectin wurde mittels RIA, Leptin- und Resistinkonzentrationen mittels ELISA und die Expression von $\text{TNF-}\alpha$ mittels Western Blot analysiert.

4.1. Adiponectin

Im folgenden sind die Untersuchungsergebnisse systemischer Adiponectinspiegel im Serum und lokaler Adiponectinkonzentrationen im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen dargestellt. Gemessen wurden die Konzentrationen mittels RIA.

Es kann gezeigt werden, dass sowohl systemische als auch lokale Adiponectinkonzentrationen bei Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erniedrigt sind. Des weiteren kann eine signifikant positive Korrelation zwischen lokalen und systemischen Adiponectinkonzentrationen aufgezeigt werden.

Abbildung 4.1.1. zeigt einen Mittelwert des systemischen Serumspiegels von Adiponectin bei Kontrollpersonen (n=15) von 62,36µg/ml. Im Serum der Adipösen (n=12) lässt sich eine signifikante Verminderung (p=0,0028) des Adiponectinspiegels um 74% (16,09µg/ml) im Vergleich zu Kontrollpersonen nachweisen. Des weiteren zeigt sich ein signifikant (p=0,001) verminderter Adiponectinspiegel im Serum von Typ-2-Diabetikern (n=69) um 89% (6,73µg/ml) im Vergleich zu Kontrollpersonen.

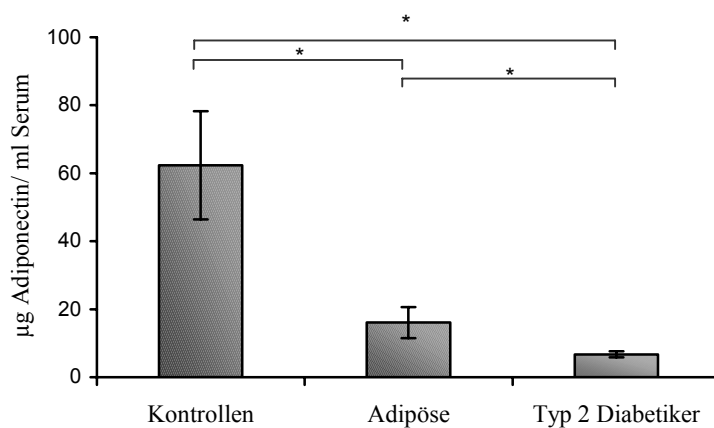


Abbildung 4.1.1. Adiponectinspiegel [µg/ml] im Serum von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

In Abbildung 4.1.2. wird die gleiche Tendenz in lokalen Adiponectinkonzentrationen im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen dargestellt.

Bei Kontrollpersonen (n=14) wird ein Mittelwert von 480,08ng Adiponectin/ mg Fettgewebe gemessen. Im Vergleich zu den Kontrollpersonen zeigt sich bei Adipösen (n=12) eine signifikante (p=0,04) Konzentrationsminderung von Adiponectin im Fettgewebe um 63% (177,85ng/mg). Des weiteren kann auch bei Typ-2-Diabetikern (n=11) eine signifikante (p=0,01) Abnahme der Adiponectinkonzentration um 77% im

Fettgewebe (111,02ng/mg) im Vergleich zu Kontrollpersonen nachgewiesen werden.

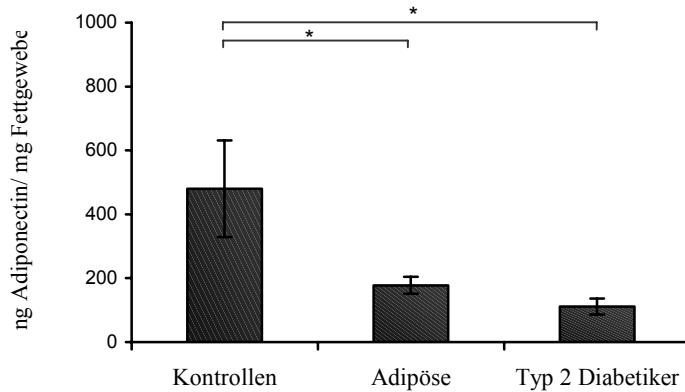


Abbildung 4.1.2. Adiponectinkonzentration [ng/mg] im Fettgewebe von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

In der folgenden Abbildung 4.1.3. wird zusammengefasst dargestellt, dass die systemischen Adiponectinspiegel im Serum von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern signifikant positiv ($p=0,01$) mit den lokalen Adiponectinkonzentrationen im Fettgewebe der gleichen Patienten korrelieren.

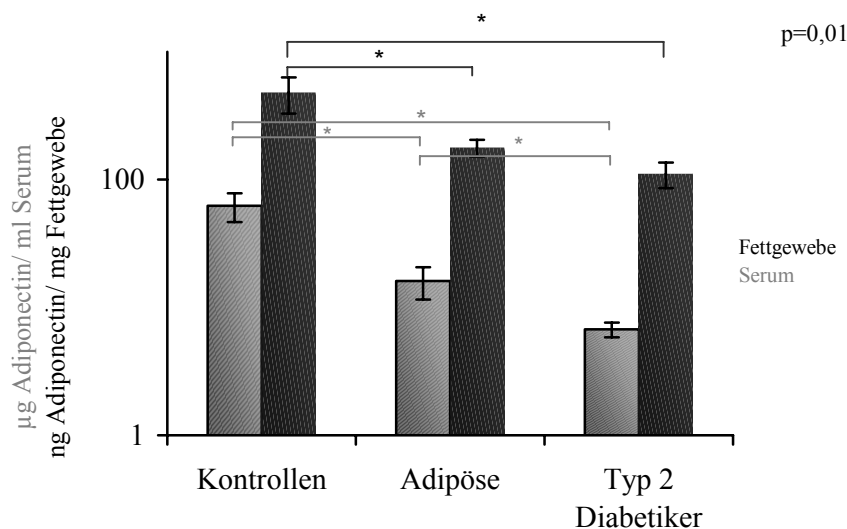


Abbildung 4.1.3. Adiponectinexpression im Serum [$\mu\text{g/ml}$] und im Fettgewebe [ng/mg] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

In Ergänzung zeigt Abbildung 4.1.4. bei Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern eine signifikant negative Korrelation ($p=0,004$) zwischen dem BMI und den Adiponectinspiegeln im Serum.

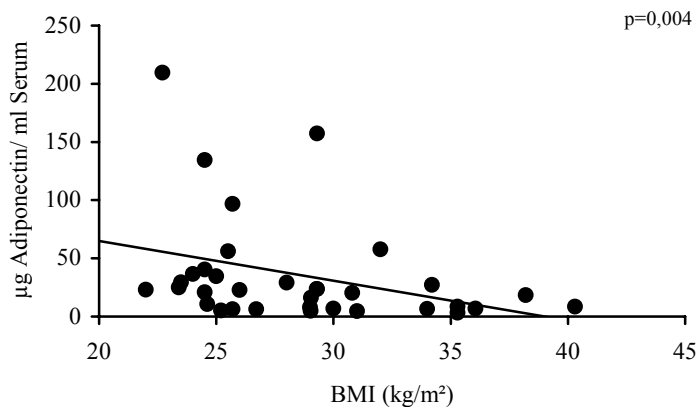


Abbildung 4.1.4. Korrelation der Adiponectinspiegel im Serum [$\mu\text{g/ml}$] mit dem BMI [kg/m^2] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Abbildung 4.1.5. demonstriert bei Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern eine signifikant negative Korrelation ($p=0,05$) zwischen dem BMI und den Adiponectinkonzentrationen im Fettgewebe.

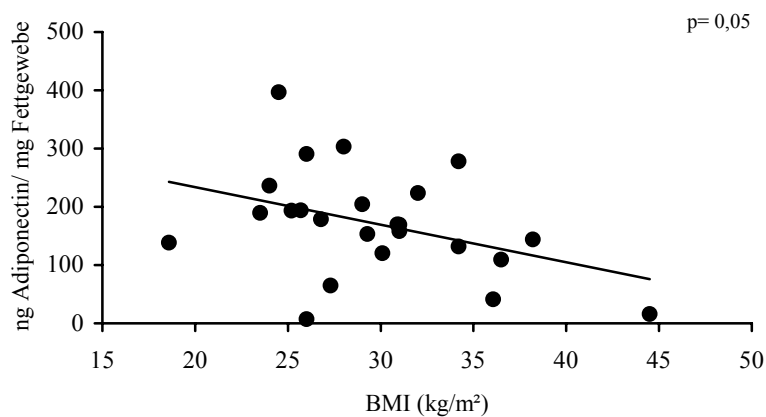


Abbildung 4.1.5. Korrelation der Adiponectinkonzentrationen im Fettgewebe [ng/mg] mit dem BMI [kg/m²] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

4.2. Resistin

Die Untersuchungsergebnisse systemischer Resistinspiegel im Serum und lokaler Resistinkonzentrationen im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen sind mittels ELISA erhoben worden.

Es können verminderte systemische Resistinspiegel im Serum und eine verminderte lokale Resistinkonzentration im Fettgewebe von Adipösen im Vergleich zu Kontrollen aufgezeigt werden. Bei Typ-2-Diabetikern hingegen zeigen sich erhöhte systemische Resistinspiegel im Serum und erhöhte lokale Resistinkonzentrationen im Fettgewebe im Vergleich zu Kontrollen. Es können hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Des Weiteren kann keine Korrelation zwischen der lokalen und der systemischen Resistinexpression bei Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen erhoben werden.

Abbildung 4.2.1. zeigt einen durchschnittlichen systemischen Resistinspiegel von 129,53ng/ml im Serum der Kontrollpersonen (n=11). Bei Adipösen (n=5) ist der systemische Serumspiegel von Resistin im Vergleich zu Kontrollpersonen um 10% (117,09ng/ml) vermindert. Bei Typ-2-Diabetikern (n=53) lässt sich hingegen ein erhöhter systemischer Resistinspiegel (15%, 149,56ng/ml) im Vergleich zu Kontrollpersonen nachweisen. Es zeigen sich hier jedoch keine signifikanten Unterschiede.

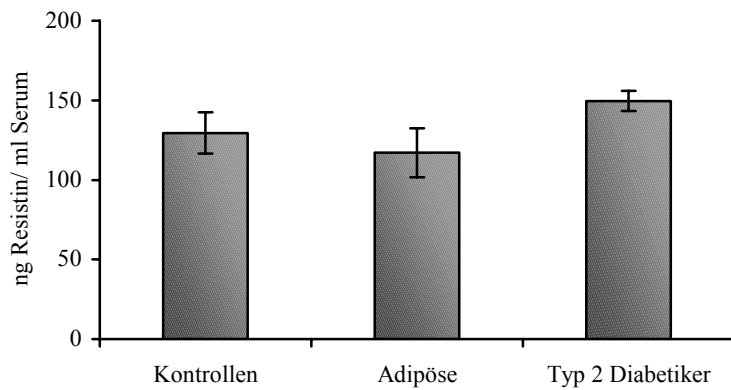


Abbildung 4.2.1. Resistinspiegel im Serum [ng/ml] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Die Ergebnisse aus dem Fettgewebe sind in Abbildung 4.2.2 dargestellt. Bei Kontrollpersonen (n=6) zeigt sich ein Mittelwerte von 3,37ng Resistin/ mg Fettgewebe. Im Vergleich dazu lässt sich bei Adipösen (n=5) eine Abnahme der Resistinkonzentration um 37% (2,13ng/ml) im Fettgewebe nachweisen. Bei Typ-2-Diabetikern (n=7) zeigt sich hingegen eine Zunahme der Resistinkonzentration von 32% (4,47ng/ml) im Fettgewebe verglichen mit Kontrollpersonen.

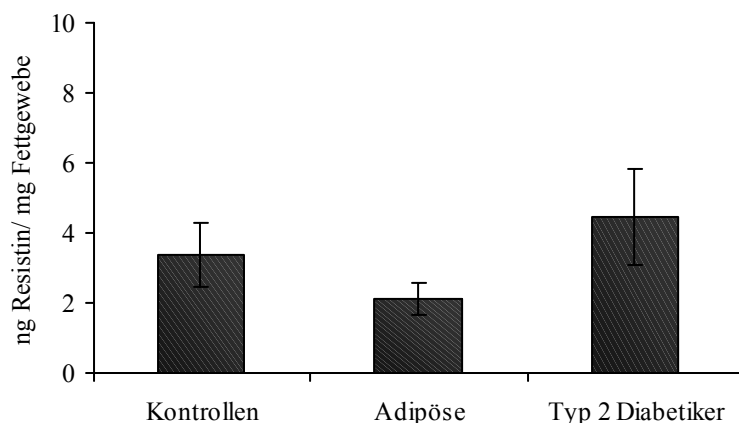


Abbildung 4.2.2. Resistinkonzentrationen im Fettgewebe [ng/mg] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Daraus ergibt sich keine Korrelation ($p=0,4$) zwischen systemischen Resistinspiegeln im Serum und lokalen Resistinkonzentrationen im Fettgewebe von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern, wie in Abbildung 4.2.3. dargestellt.

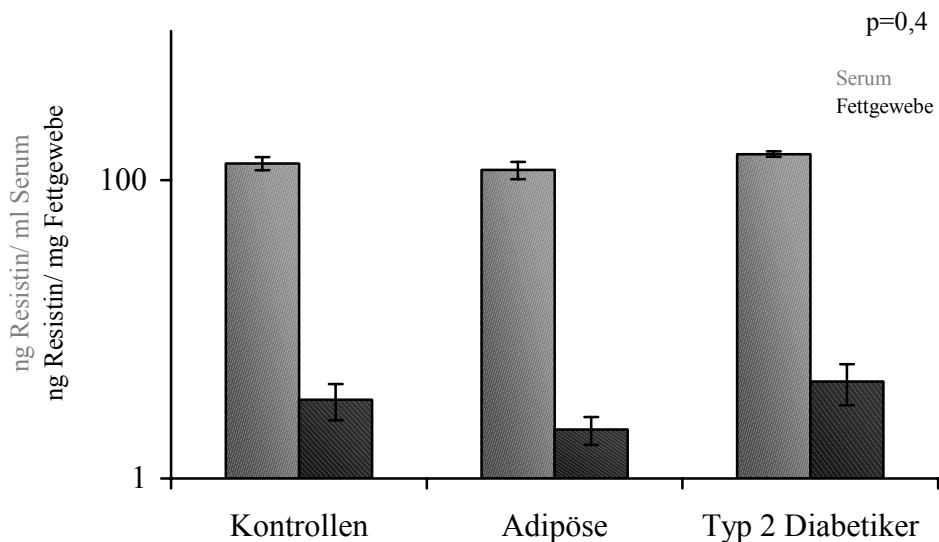


Abbildung 4.2.3. Resistinexpression im Serum [ng/ml] und im Fettgewebe [ng/mg] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Abbildung 4.2.4. stellt die signifikant negative Korrelation ($p=0,03$) systemischer Resistinspiegel im Serum von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern zum BMI dar.

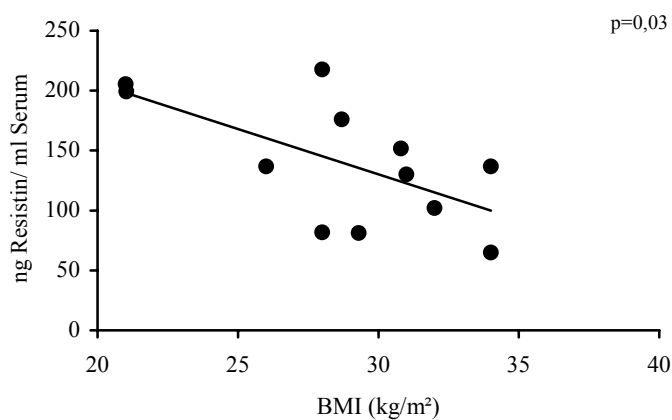


Abbildung 4.2.4. Korrelation der Resistinkonzentrationen im Serum [ng/ml] mit dem BMI [kg/m²] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

4.3. Leptin

In diesem Patientenkollektiv ergeben sich im Serum sowohl bei Adipösen als auch bei Typ-2-Diabetikern signifikant erhöhte Leptinspiegel im Vergleich zu Kontrollpersonen. Die Ergebnisse wurden mittels ELISA erhoben.

Im Fettgewebe kann jedoch keine signifikante Konzentrationserhöhung von Leptin zwischen Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen gezeigt werden. Im Vergleich zu den Kontrollpersonen sind die Leptinkonzentrationen im Fettgewebe von Typ-2-Diabetikern geringer erhöht als bei Adipösen im Vergleich zu den Kontrollen.

Es ergab sich daraus folgend keine Korrelation zwischen der systemischen und der lokalen Leptinexpression.

Wie zu erwarten war, zeigt Leptin in dieser Untersuchung eine signifikant positive Korrelation der systemischen Serumspiegel und der lokalen Konzentrationen im Fettgewebe von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern mit dem BMI.

Abbildung 4.3.1. zeigt, dass im Serum von Adipösen (n=6) um 333% signifikant (p=0,028) erhöhte Leptinspiegel (19,26µg/ml) im Vergleich zu den Kontrollpersonen (n=26) (5,78µg/ml) erhoben wurden. Bei Typ-2-Diabetikern (n=8) zeigen sich um 477% signifikant (p=0,012) höhere Leptinspiegel (27,59µg/ml) als bei Kontrollpersonen.

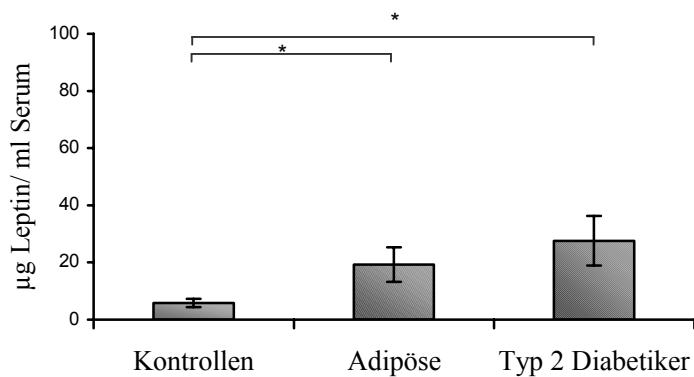


Abbildung 4.3.1. Leptinspiegel im Serum [µg/ml] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Im Fettgewebe zeigen sich bei Adipösen (n=8) um 247% erhöhte Leptinkonzentrationen (59,75ng/mg) im Vergleich zu den Kontrollpersonen (n=6) (24,20ng/mg). Bei Typ-2-Diabetikern (n=6) sind die Leptinkonzentrationen im Fettgewebe um 42% (34,48ng/mg) im Gegensatz zu den Kontrollpersonen erhöht.

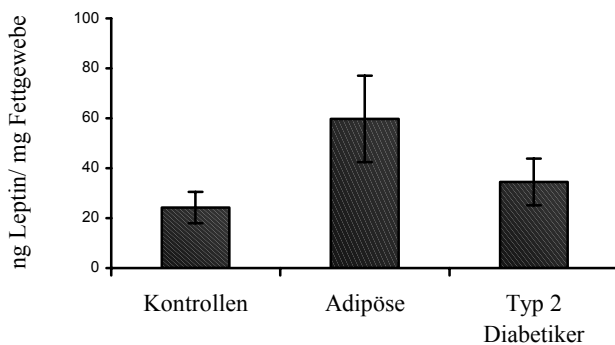


Abbildung 4.3.2. Leptinkonzentrationen im Fettgewebe [ng/ml] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Abbildung 4.3.3. zeigt, dass keine Korrelation ($p=0,85$) zwischen systemischen Leptinspiegeln im Serum und lokalen Leptinkonzentrationen

im Fettgewebe bei Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern aufgezeigt werden kann.

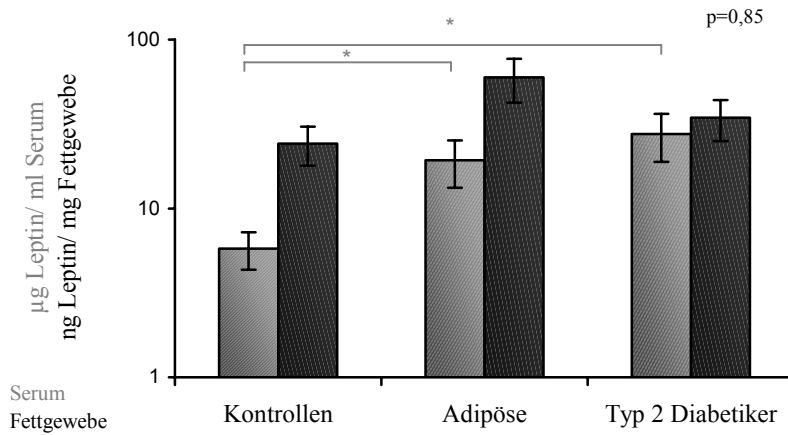


Abbildung 4.3.3. Leptinexpression im Plasma [$\mu\text{g}/\text{ml}$] und im Fettgewebe [ng/ml] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Wie zu erwarten war, wird in Abbildung 4.3.4. dargestellt, dass der BMI mit den systemischen Leptinspiegeln im Serum ($p=0,05$) von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern signifikant positiv korreliert.

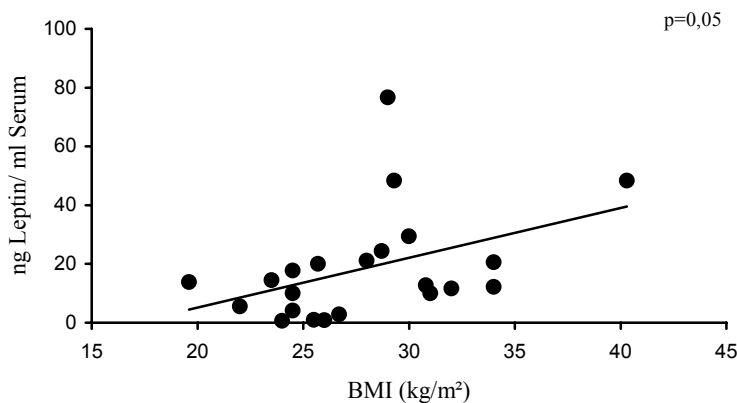


Abbildung 4.3.4. Korrelationen der Leptinspiegel im Serum [ng/ml] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern mit dem BMI [kg/m^2].

Des weiteren korrelieren auch die lokalen Leptinkonzentrationen im Fettgewebe bei Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern signifikant positiv ($p=0,05$) mit dem BMI, dargestellt in Abbildung 4.3.5.

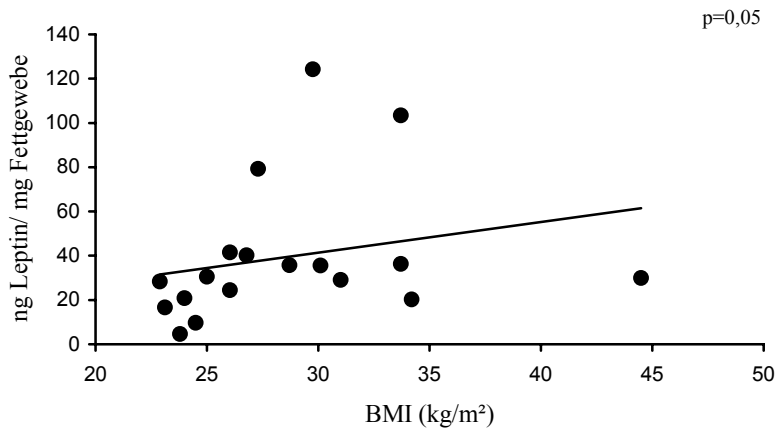


Abbildung 4.3.5. Korrelationen der Leptinkonzentrationen im Fettgewebe [ng/ml] von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern mit dem BMI [kg/m²].

4.4. TNF- α

In Bezug auf TNF- α wurden in dieser Studie die lokalen Konzentrationen im Fettgewebe von Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen mittels Western Blot bestimmt.

Hierbei können signifikant erhöhte lokale TNF- α Konzentrationen im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen gemessen werden. Des weiteren wird eine signifikant positive Korrelation zwischen TNF- α und dem BMI aufgezeigt.

Im folgenden stellt die Abbildung 4.4.1. die signifikant ($p=0,01$) erhöhte Konzentration von TNF- α (94%) im Fettgewebe von Adipösen ($n=8$, relative Proteinkonzentration 1,97) im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($n=9$, relative Proteinkonzentration 1,02) dar. Bei Typ-2-Diabetikern ($n=9$) (relative Proteinkonzentration 1,49) wird eine signifikante ($p=0,05$) Erhöhung um 46% gegenüber den Kontrollpersonen nachgewiesen.

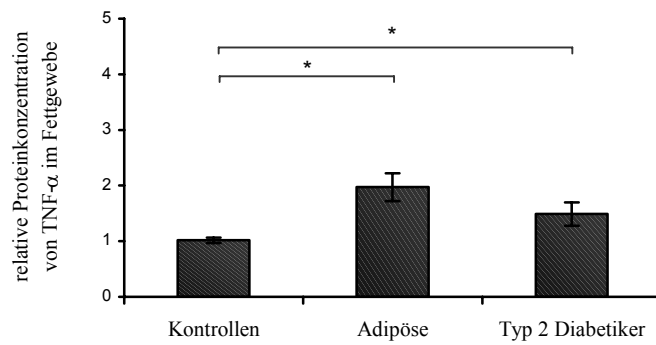


Abbildung 4.4.1. relative Proteinkonzentration von TNF- α im Fettgewebe von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern.

Die lokale TNF- α Konzentration im Fettgewebe von Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen korreliert dabei signifikant positiv ($p=0,0004$) mit dem BMI, wie in Abbildung 4.4.2. dargestellt.

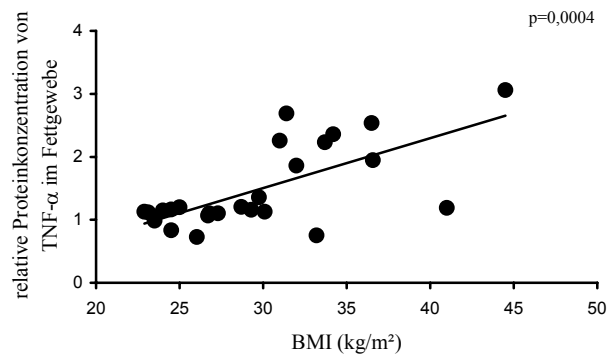


Abbildung 4.4.2. Korrelation der relativen Proteinkonzentration von TNF- α im Fettgewebe von Kontrollpersonen, Adipösen und Typ-2-Diabetikern mit dem BMI [kg/m²].

5. Diskussion

Die Analyse der systemischen und lokalen Proteinexpression der verschiedenen Adipozytokine ergab einen Einblick in die Rolle der Adipozytokine in der komplexen Pathogenese der Adipositas, der Insulinresistenz und des Typ-2-Diabetes. Aus den erhobenen Korrelationen zwischen den lokalen und systemischen Proteinexpressionen ergibt sich die Möglichkeit bei Bestimmung des Serumspiegels eines Faktors auf die direkte lokale metabolische Situation im Fettgewebe zu schließen. Daraus resultiert ein klinisch einsetzbarer Parameter zur Verlaufs- und Therapiekontrolle.

In Bezug auf Adiponectin wurde schon aufgrund der negativen Korrelation zwischen Adiponectin und dem BMI gefolgert, dass Adiponectin einen passenden Biomarker für die Progression des metabolischen Syndroms darstellen könnte [105]. Hypoadiponectinämie ist eng verknüpft mit der Glucoseaufnahme, dem Grad der Insulinresistenz, der Hyperinsulinämie und mit Adipositas [106].

In Ergänzung dazu kann diese Studie demonstrieren dass die lokale und systemische Adiponectinexpression bei Adipösen und Typ-2-Diabetikern signifikant erniedrigt sind und damit kann die Verknüpfung der Hypoadiponectämie mit Adipositas und Typ-2-Diabetes noch unterstrichen werden. Zusätzlich kann eine signifikant positive Korrelation zwischen der lokalen und systemischen Adiponectinexpression aufgezeigt werden.

Die systemischen Adiponectinspiegel im Serum eignen sich somit direkt die lokale metabolische Situation im Fettgewebe zu repräsentieren und die Funktion von Adiponectin als Progressionsparameter des metabolischen Syndroms kann weiter unterstützt werden.

Die Bedeutung von Resistin in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes ist bisher umstritten. Im Tierversuch können sowohl bei diätetisch induzierter Adipositas, als auch in genetischen Adipositasmodellen, im Fettgewebe von Mäusen erhöhte Resistinlevel gemessen werden, die unter Therapie mit TZD's supprimiert werden [52]. In Ergänzung dazu zeigt eine andere Studie eine signifikant höhere Resistinexpression in humanem Fettgewebe von Adipösen im Vergleich zu Kontrollen und eine positive Korrelation mit dem BMI. Veränderungen der Serumresistinlevel ergeben eine positive Korrelation zu Veränderungen des BMI [53]. Die Erkenntnis das Resistin vom Fettgewebe sezerniert wird, wird als weiterer Hinweis auf die Verknüpfung mit der Pathogenese des Typ-2-Diabetes gewertet [107].

Im Gegensatz dazu zeigen andere experimentelle Adipositasmodelle eine Suppression der Resistinexpression [56]. Adipöse Ratten weisen signifikant niedrigere Resistinkonzentrationen als Kontrollen auf und das Vorkommen von Resistin in immunokompetenten Zellen bei Ratten und Menschen wurde detektiert [108]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass Resistin und Resistin-like-molecule- β eine schwere hepatische Insulinresistenz induzieren, ohne dass Hinweise auf eine periphere Insulinresistenz gegeben sind [55]. Zusammenfassend wird somit die Rolle von Resistin bisher kontrovers diskutiert und andere Einflussgebiete, zum Beispiel im Immunsystem angedeutet.

Diese Studie zeigt verminderte systemische Resistinspiegel im Serum, sowie reduzierte lokale Resistinkonzentrationen im Fettgewebe von Adipösen im Vergleich zu Kontrollpersonen. Bei Typ-2-Diabetikern ist eine Erhöhung der Resistinspiegel im Serum und im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollen gemessen worden. Es können jeweils keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen

werden und es kann keine Korrelation zwischen der systemischen und der lokalen und Resistinexpression erhoben werden.

Ein direkter Zusammenhang von Resistin in der Pathogenese der Insulinresistenz in Verbindung mit dem metabolischen Syndrom und einem erhöhtem BMI kann damit nicht bestätigt werden. Eine kausale Funktion lässt sich nicht vermuten. Des Weiteren ist Resistin nicht qualifiziert als Parameter die lokale metabolische Situation im Fettgewebe anhand der systemischen Serumspiegel zu repräsentieren.

Seitdem Leptin 1994 entdeckt wurde [60], haben viele Studien die außerordentliche Bedeutung von Leptin in der Regulation des Körpergewichtes und im Energiehaushalt beschrieben [109].

Wie bereits bekannt [79] zeigt Leptin auch in dieser Untersuchung eine signifikant positive Korrelation der systemischen Spiegel im Serum und der lokalen Konzentrationen im Fettgewebe mit dem BMI. In diesem Patientenkollektiv ergibt sich jedoch im Fettgewebe keine signifikante Veränderung von Leptin zwischen Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen. Im Vergleich zu den Kontrollpersonen sind die Leptinkonzentrationen im Fettgewebe von Typ-2-Diabetikern geringer erhöht als bei Adipösen im Vergleich zu den Kontrollen. Im Serum hingegen kann sowohl bei Adipösen als auch bei Typ-2-Diabetikern eine signifikante Erhöhung der Leptinspiegel im Vergleich zu den Kontrollpersonen erhoben werden. Allerdings ergibt sich daraus keine Korrelation zwischen den systemische Leptinspiegeln im Serum und den lokalen Konzentrationen im Fettgewebe bei Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen.

Die Ergebnisse aus dem Fettgewebe und die positive Korrelation zum BMI unterstreichen die Regulationsfunktion von Leptin im Energiehaushalt und

die primäre Bedeutung bei der Entstehung der Adipositas. In Hinsicht auf die Pathogenese des Typ-2-Diabetes zeigten bereits andere Studien, dass die Plasmakonzentration von Leptin unabhängig vom Plasmainsulin und der Insulinresistenz ist [110]. In Ergänzung dazu weisen auch diese Daten daraufhin, dass Leptin in Bezug auf den Typ-2-Diabetes eher eine untergeordnete Rolle spielt. Bei fehlender Korrelation zwischen systemischen Leptinspiegeln im Serum und lokalen Leptinkonzentrationen im Fettgewebe eignen sich die Serumspiegel nicht als repräsentativer Parameter der lokalen metabolischen Situation im Fettgewebe.

Die Bedeutung von TNF- α in der Entstehung und Manifestation der Insulinresistenz wird kontrovers diskutiert. Bei adipösen Frauen wurden erhöhte TNF- α Level im Fettgewebe detektiert [89]. Allerdings können keine Effekte auf die Insulinsignalkaskade unter der Behandlung mit TNF- α im Skelettmuskel nachgewiesen werden [99]. TNF- α Knockout-Mäuse mit diätinduzierter Adipositas zeigen die gleichen reduzierten Insulinlevel wie die Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu kann beim adipösen Wildtyp eine signifikante Hyperinsulinämie nachgewiesen werden [87]. Bei Ratten konnte klar aufgezeigt werden, dass erhöhte TNF- α Level eine Insulinresistenz hervorrufen.

In dieser Studie können ebenfalls signifikant erhöhte TNF- α Spiegel im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu Kontrollpersonen gemessen werden. Es wird eine signifikant positive Korrelation zwischen TNF- α und dem BMI aufgezeigt.

Die Korrelation zwischen TNF- α und dem BMI kann bestätigt werden. Es können jedoch höhere TNF- α Konzentrationen im Fettgewebe von Adipösen als bei Typ-2-Diabetikern nachgewiesen werden, sodass die

Funktion von TNF- α in der Pathogenese der Insulinresistenz ungeklärt bleibt.

Zusammengefasst kann in dieser Studie dargestellt werden, dass die systemischen Serumspiegel von Adiponectin, Resistin und Leptin nicht alle geeignet sind auf die lokale metabolische Situation im Fettgewebe zu schließen.

Insbesondere in Bezug auf Adiponectin können unsere Daten die Bedeutung in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes unterstreichen und Adiponectin als möglichen Indikator der Insulinresistenzentstehung auszeichnen. Die systemischen Adiponectinkonzentrationen im Serum von Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen sind geeignet die lokale metabolische Situation im Fettgewebe zu repräsentieren.

6. Zusammenfassung

Das metabolische Syndrom, Adipositas und Typ-2-Diabetes gewinnen zunehmend an bevölkerungsmedizinischer Bedeutung. Adipositas stellt einen der größten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes dar.

Ziel dieser Studie war es, die Proteinexpression von Adiponectin, Resistin, und Leptin sowohl systemisch im Serum als auch lokal im Fettgewebe von Adipösen, Typ-2-Diabetikern und Kontrollpersonen mittels RIA und ELISA zu analysieren. Des Weiteren wurden mittels Western Blot die Proteinexpression von TNF- α im Fettgewebe von Adipösen und Typ-2-Diabetikern untersucht.

Eine kausale Bedeutung von TNF- α in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes kann in dieser Studie nicht nachvollzogen werden. Die systemischen Serumspiegel von Leptin und Resistin repräsentieren die lokale metabolische Situation im Fettgewebe nicht. Der Zusammenhang zwischen erhöhter Leptinexpression und Adipositas kann weiter betont werden. Adiponectin weist eine signifikant positive Korrelation zwischen systemischen Spiegeln im Serum und lokalen Konzentrationen im Fettgewebe auf.

Damit unterstreichen diese Daten die Bedeutung von Adiponectin in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes. Der Serumspiegel von Adiponectin eignet sich aufgrund der strengen Korrelation die metabolische Situation im Fettgewebe zu repräsentieren.

In Zukunft ließe sich nun möglicherweise die systemische Adiponectinexpression im Serum als klinischer Verlaufsparemeter einsetzen und darüber hinaus könnten sich neue kausale Therapieoptionen ergeben.

7. Literaturverzeichnis

1. Consultation W. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. In: World Health Organisation; 1999; Geneva; 1999.
2. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20:1183, 1997
3. Zimmet P AK, Shaw J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787, 2001
4. Stapperfield M. SW: Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland. *Deutsches Diabetes Forschungsinstitut*, 2001
5. Barnett AH EC, Leslie RCG, Pyke DA: Diabetes in identical twins. *Diabetologia* 20:87-93, 1981
6. Pincus G WP: On the inheritance of diabetes mellitus. *Am J M Sci* 186:1-14, 1933
7. Pierce M KH, Bradley C: Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* 12:6-13, 1995
8. Larsson B VJ, Bjorntorp P, Guy-Grand B, Rebuffe-Scrive M, Vague P,: Obesity and prospective risk for associated diseases. *Metabolic Complications of the Human Obesities, Elsevier, Amsterdam*:21-29, 1985
9. Algenstaedt P RN, Kolb I, Krützelmann A, Schwarzloh B, Böttcher A, Wiesner L, Greten H, Hansen-Algenstaedt N: A new model of primary human adipocytes reveals reduced early insulin signalling in type 2 diabetes. *Hormone Metabolic Research* 36:531-537, 2004
10. Algenstaedt P: Microvascular Alterations in Diabetic Mice Correlate with Level of Hyperglycemia. *Diabetes* 52:542-549, 2003
11. Modan M KA, Halkin H: Effect of past and present body mass index on prevalence of glucose intolerance and Type (non-insulin-dependent) diabetes and on insulin response. *Diabetologia* 29:82-89, 1986

12. Hamann A MH, Algenstaedt P, Tafel J: Molecular principles of obesity. *Herz* 26:178-84, 2001
13. Kahn CR: Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43:1066-84, 1994
14. Pschyrembel; 1998.
15. S. N. Willich AMS, E. O. Krasemann, W. Meyer-Sabellek , W. Thefeld: Epidemiologische, genetische und therapeutische Aspekte der Adipositas. *Bundesgesundheitsbl -Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz Springer-Verlag* 44:960–965, 2001
16. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization; 2000.
17. Kesaniemi YA LM, Kervinen K, Rantala A: Multiple metabolic syndrome: aspects of genetic epidemiology and molecular genetics. *Ann Med* 24:461-464, 1992
18. Beck-Nielsen HL GC: Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. *J Clin Invest* 94:1714-1721, 1994
19. GM R: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607, 1988
20. Nichols GA GH, Brown JB: Type 2 diabetes: incremental medical care costs during the 8 years preceding diagnosis. *Diabetes Care* 23:1654-1659, 2000
21. Rubin RJ, W.M. Altmau, D.N. Mendelson: Health care expenditure for people with diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol. Metab.* 74:809A-809E, 1994
22. RN B: Toward physiological understanding of glucose tolerance. *Diabetes* 38:1512-1527, 1998

23. Weyer C BC, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104:787-794, 1999
24. Kahn: Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92:593±596, 1998
25. Leiter EH HL: The poly-genetics of diabetes in mice. *Diabetes Rev* 5:131-148, 1997
26. Leiter EH RP, Flurkey K, Partke HJ, Junger E, Herberg L: NIDDM genes in mice. Deleterious synergism by both parental genomes contributes to diabetic thresholds. *Diabetes* 47:1287-1295, 1998
27. Friedman JM: Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 56:s38-46; discussion s54-75, 1998
28. Scherer Pea: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746-26749, 1995
29. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y: cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286-9, 1996
30. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-703, 1996
31. Nakano Yea: Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem.* 120:803-812, 1996
32. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83, 1999

33. Ouchi Nea: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476, 1999
34. Berg AH, Combs TP, Scherer PE: ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:84-9, 2002
35. Menzaghi Cea: A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51:2306-2312, 2002
36. Yamauchi T KJ, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al.: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769, 2003
37. Diez JJ IP: The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148:293-300, 2003
38. Yamauchi T KJ, Minokoshi Y, et al: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295, 2002
39. Tomas E TT, Saha AK, et al.: Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci* 99:16309-16313, 2002
40. Wu X MH, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ: Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52:1355-1363, 2003
41. Zhou G MR, Li Y, et al.: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174, 2001

42. Fryer LG P-PA, Carling D: The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 277:25226-25232, 2002
43. Hotta K ea: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-1599, 2000
44. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al.: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-6, 2001
45. Matsubara K MN, et al.: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine* 8:731-737, 2002
46. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-12, 2001
47. Holcomb IN, Kabakoff, R. C., Chan, B., Baker, T. W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H. B., Wright, B. D., Skelton, N. J., Frantz, G. D., Tumas, D. B., Peale, F. V., Shelton, D. L., Hebert, C. C.: FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* 19:4046-4055, 2000
48. Kim K-Hea: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 276:11252-11256, 2001
49. Stepan CM, Brown, E. J., Wright, C. M., Bhat, S., Banerjee, R. R., Dai, C. Y., Enders, G. D., Silberg, D. G., Wen, X., Wu, G. D., Lazar, M. A.: A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:502-506, 2001
50. Savage DB SC, Klenk ES, et al.: Resistin/FIZZ3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferation-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes* 50:2199-2202, 2001

51. Nagaev I S, U.: Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285:561-564, 2001
52. Stepan CM LM: Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 13:18-23, 2002
53. Azuma K KF, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T: Correlation between Serum Resistin Level and Adiposity in Obese Individuals. *Obesity Research* 11:997-1001, 2003
54. Algenstaedt P, Hamann A: [Glitazone--a new class of drugs for the treatment of type 2 diabetes]. *Dtsch Med Wochenschr* 126:951-2, 2001
55. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111:225-30, 2003
56. Way JM GC, Tong Q, Teoman Uysal K, Brown K, Harrington W, Oliver WR, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS: Adipose Tissue Resistin Expression Is Severely Suppressed in Obesity and Stimulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonists. *The Journal Of Biological Chemistry* 276:25651-25653, 2001
57. Yuan M, et al.: Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-1677, 2001
58. Hirosumi J, et al.: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336, 2002
59. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al.: Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300:472-6, 2003

60. Zhang Yea: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994
61. Tartaglia LA DM, Weng X, et al.: Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OB-R Cell* 83:1263-1271, 1995
62. Schwartz MW SR, Campfield LA, Burn P, Baskin DG,: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98:1101-1106, 1996
63. Williams LB OD, Kogon BE, et al.: Leptin increases basal and insulin-stimulated glucose uptake into human subcutaneous adipocytes. *Diabetes* 47, 1998
64. Aiston S AL: Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes* 48:15-20, 1999
65. Berti L KM, Capp E, Häring H: Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C₂C₁₂ myotubes: evidence for a PI3-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40:606-609, 1997
66. Kieffer TJ HR, Habener JF: Leptin receptors expressed on pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:522-527, 1996
67. Emilsson V LY-L, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M: Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46:313-316, 1997
68. Ingalis AM, Dickie, M.M., Snell, G.D.,: Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered* 41: 317- 318, 1950
69. Halaas JLaF, J.: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546, 1995)
70. Pelleymounter MAea: Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543, 1995

71. Montague CT FI, Whitehaed JP,: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903-908, 1997
72. Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-70, 1998
73. Ahima RS, Saper, C. B., Flier, J. S., Elmquist, J. K.: Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front. Neuroendo-crinol.* 21:263-307, 2000
74. Ahima RS, and Flier, J. S.: Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62:413-437, 2000
75. Caprio M, Fabbrini, E., Isidori, A. M., Aversa, A., Fabbri, A.: Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* 2:65-72, 2001
76. Madhur K. Sinha eaS, M. K. et al.: Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97:1344-1347, 1996
77. Maffei Mea: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1:1155-1161, 1995
78. Schwartz MW, Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E. J. & Porte, D., Jr.: Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2:589-593, 1996
79. Jequier E: Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 967:379-88, 2002
80. Considine R Vea: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295, 1996
81. Sivitz WI, Walsh, S. A., Morgan, D. A., Thomas, M. J., Haynes, W. G.: Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 138:3395-3401, 1997
82. L O: Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230:630-633, 1985

83. Shirai T YH, Ito H, Todd CW, Wallace RB: Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature* 313:803-806, 1985
84. Beutler B. CA: Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr Rev* 9:57-66, 1988
85. Beutler B MJ, Le Trang N, Pekala P, Cerami A: Purification of cachectin, a lipoprotein lipase suppressing hormone secreted by endotoxin-induced raw 246.7 cells. *J Exp Med* 161:984-995, 1985
86. Beutler B GD, Hulmes JD, Chang M, Pan Y, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A: Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554, 1985
87. Hotamisligil GS, Spiegelman, B. M.: TNF- α A key component of obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-1278, 1994
88. Hotamisligil GS: The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245:621-5, 1999
89. Bullo M, Garcia-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernandez M, Del Castillo D, Argiles JM, et al.: TNF α expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:652-8, 2002
90. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G: Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-51, 2001
91. Fernandez-Real JMea: The TNF- α gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46:1468-1472, 1997

92. Liu LS, Spelleken, M., Rohrig, K., Hauner, H., Eckel, J.: Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47:515-522, 1998
93. Hotamisligil GS: Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:119-125, 1999
94. Kirchgessner TG UK, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: TNF alpha contributes to obesity related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 100:2777-2782, 1997
95. Souza SC YM, Franciosa MD, Lien P, Greenberg AS: BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α . *Diabetes* 47:691-695, 1998
96. Van der Poll Tea: Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 261:457-465, 1991
97. Sethi JK, Hotamisligil, G. S. T.: he role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 10:19-29, 1999
98. Ofei F, Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., Taylor, R.: Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45:881-885, 1996
99. Nolte LA, Hansen PA, Chen MM, Schluter JM, Gulve EA, Holloszy JO: Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha does not affect insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes* 47:721-6, 1998
100. Uysal KT, Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., Hotamisligil, G. S.: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-614, 1997

101. Moller DE: Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 11:212-7, 2000
102. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
103. Hames BDR, D. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. Oxford University Press 1990.
104. Isacson U, Watermark, G.: *Anal Chim Acta* 68:339-363, 1974
105. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, et al.: Plasma adiponectin levels in overweight and obese Asians. *Obes Res* 10:1104-10, 2002
106. Weyer C FT, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al.: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935, 2001
107. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, et al.: Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2407, 2002
108. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, et al.: Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 10:1095-103, 2002
109. Tartaglia LA: The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6, 1997
110. Shoji T, Nishizawa Y, Emoto M, Maekawa K, Hiura Y, Tanaka S, et al.: Renal function and insulin resistance as determinants of plasma leptin levels in patients with NIDDM. *Diabetologia* 40:676-9, 1997

8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
APS	Ammoniumpersulfat
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
DTT	Dipropyltrytamin
EDTA	Ethylendiametetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
HRPO	Horse Raddish Peroxidase
IB	Immunoblot
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
kDa	Kilodalton
l	Liter
µg	mikrogramm
ng	nanogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramm
PMFS	Polymethylsulfonylfluorid
SEM	Standard Error of the Mean
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumor Necrose Faktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben. Ein besonderes Dankeschön geht zum einen an meine Doktormutter Frau PD Dr. med. Petra Algenstaedt, ohne deren Anregungen, Hilfe und Motivationskraft diese Arbeit nie entstanden wäre. Zum anderen möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Britta Schwarzloh bedanken, die mir während der gesamten experimentellen Arbeit im Labor immer mit Rat und Tat beiseite stand.

Ein weiterer Dank geht an die ehemalige Klinik und Poliklinik für Orthopädie des Universitätskrankenhauses Eppendorf, allen voran Dr. med. Nils Hansen-Algenstaedt, für die Bereitstellung des humanen Fettgewebes.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinem Eltern bedanken, die jederzeit für mich da waren und mich in allen Situationen unterstützt und ermuntert haben.

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als von mir angegebene 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.

11. Lebenslauf

Name: Krützelmann, Anna Christina
Geboren am: 11.06.1979 in Hamburg

Bildungsweg:

1985-1989 Grundschule Müssenredder in Hamburg
1989-1998 Gymnasium Hummelsbüttel in Hamburg
1998 allgemeine Hochschulreife in Hamburg
1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
10/2001 Intensivpraktikum Molekularbiologie (GRK 336, DFG)
11/2001 „A“-Diplom der Akupunktur
05/2005 Erteilung der Approbation und Abschluss des Studiums

Famulaturen:

03/2001 Labormedizin; Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, Deutschland
08/2001 Innere Medizin; Klinikum Nord, Hamburg, Deutschland
08/2002 Gynäkologie, TCM; Coal-Mining-Hospital, Tangshan, China
02/2003 Pädiatrie; Praxis Dr. Neumann, Dr. Hanke, Hamburg, Deutschland
03/2003 Neurologie; Donauspital, Wien, Österreich

Praktisches Jahr:

2004 Chirurgie, MD K. Barry
(Mayo General Hospital, Castlebar, Irland)
Neurologie, Prof. Dr. C. Weiller
(Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf)
Innere Medizin, Prof. Dr. P. Layer
(Israelitisches Krankenhaus, Hamburg)

Abstracts:

2003 Algenstaedt et al, Untersuchung der systemischen und lokalen Proteinexpression von Adipozytokinen bei Adipositas und Typ 2 Diabetes.

2004 Algenstaedt et al,
A New Model of Primary Human Adipocytes Reveals Reduced Early Insulin Signalling in Type 2 Diabetes.
In: Horm Metab Research 2004; 36: 531-537.

Facharztausbildung:

Seit 06/2005 Klinik und Poliklinik für Neurologie,
Prof. Dr. C. Gerloff, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg