

Aus der III. Medizinischen Klinik
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

**Expression von Adipokinen in humanem Fettgewebe nach
Inkubation mit Erythropoietin (EPO)**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin,
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Cora Langenbuch

aus Hamburg.

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 06. Mai 2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebas

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1.1	Arbeitshypothese	5
1.2	Fragestellung	5
2	Einleitung	6
3	Material und Methoden	11
3.1	Material und Bezugsquellen.....	11
3.2	Ethikantrag.....	14
3.3	Molekularbiochemische Methoden	14
3.3.1	Probengewinnung	14
3.3.2	Fettgewebekultur	14
3.3.3	RNA-Isolierung	15
3.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	16
3.3.5	Reverse Transkription	16
3.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
3.4	Auswertung und Statistik	19
4	Ergebnisse	21
4.1	Adiponektin mRNA-Expression in humanem Fettgewebe.....	21
4.2	IL-6 mRNA-Expression in humanem Fettgewebe.....	24
4.3	TNF- α mRNA-Expression in humanem Fettgewebe	27
4.4	VEGF mRNA-Expression in humanem Fettgewebe	30
5	Diskussion	33
6	Zusammenfassung	38
7	Abkürzungsverzeichnis	39
8	Abbildungsverzeichnis	40
9	Literaturverzeichnis	41
10	Danksagung	46
11	Lebenslauf	47
12	Eidesstattliche Erklärung	48

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

1.1 Arbeitshypothese

Patienten mit Typ-2-Diabetes sind von vielen Spätschäden bedroht. Sie leiden oft frühzeitig unter Atherosklerose. Die Atherosklerose wird heute als inflammatorische Erkrankung verstanden [1], für die Adipositas ein wesentlicher Risikofaktor ist. [2][3] Obwohl das Fettgewebe schon lange mit Diabetes mellitus, dem metabolischen Syndrom und der Atherogenese in Verbindung gebracht wird, zeigen erst neuere Erkenntnisse, dass ihm auch eine Funktion als endokrines Organ zukommt [4][5]. Vom Fettgewebe werden eine Reihe von Proteinen, die sog. Adipokine, sezerniert. Zu ihnen zählen u.a. IL-6, TNF- α und VEGF [6][7][8][9], die als proinflammatorische Zytokine für die Atherosklerose-Entstehung mitverantwortlich gemacht werden. [10] Das Adipokin Adiponektin scheint dagegen antiinflammatorische und endothelprotektive Eigenschaften zu haben. [11]

Das Medikament Erythropoietin (Epo) hat bekannte antiatherogene Eigenschaften. [12] [13] Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI), die aufgrund einer renalen Anämie routinemäßig mit Epo behandelt wurden, wiesen bei erhöhten Adiponektin-Spiegeln ein erniedrigtes kardiovaskuläres Risiko auf. [14] Wir vermuten, dass Epo eine direkte Wirkung auf das Fettgewebe hat. Möglicherweise kann Epo über die Korrektur der renalen Anämie hinaus durch Beeinflussung der Adipokinproduktion zu einer Reduktion der Inflammation führen und auf diese Weise einen Schutzfaktor vor der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der Atherosklerose darstellen. Vielleicht wäre in Zukunft ein potentieller Einsatz von Epo zur endothelprotektiven Therapie denkbar.

1.2 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von (Erythropoietin) Epo auf die Adipokin-Expression anhand viszeraler und subkutaner Fettgewebeproben von normal- und übergewichtigen Patienten *in vitro* zu untersuchen. Folgende Adipokine wurden untersucht: Adiponektin, TNF- α , IL-6, und VEGF.

2 Einleitung

Von Diabetes mellitus sind in Deutschland ungefähr 8% der Bevölkerung betroffen. Ca. 95% dieser Patienten leiden an einem Typ-2-Diabetes.

Dieser Erkrankung liegt eine Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe zugrunde, die erhöhte Insulinspiegel für die zelluläre Glukoseverwertung erforderlich machen. Diese Hyperinsulinämie führt zur Downregulation der Insulinrezeptoren und durch Steigerung des Hungergefühls zu Adipositas, was die Insulinresistenz weiter verstärkt. Später nimmt die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas progredient ab, wodurch sich ein zunehmender Insulinmangel entwickelt. Die eingeschränkte Insulinsekretion und die Insulinresistenz führen zum Vollbild des Diabetes.

Der Diabetiker ist von vielen Spätschäden, die vor allem durch Mikro- und Makroangiopathien hervorgerufen werden, bedroht. Die diabetesspezifischen Mikroangiopathien, bei denen es zur Verdickung der kapillären Basalmembran kommt, führen zu Glomerulosklerose, Retinopathie, Neuropathie und neuropathischem diabetischen Fuß sowie an den Koronararterien zur *small vessel disease*. Die makroangiopathischen Veränderungen sind nicht diabetesspezifisch. Jedoch tritt die Arteriosklerose der großen und mittleren Arterien bei Diabetikern schon frühzeitig auf und schreitet schneller voran als bei nichtdiabetischen Patienten. Für Diabetiker ist das Risiko einer Arteriosklerose an Koronar-, Hirn- und peripheren Arterien 2 bis 4 mal höher im Vergleich zur übrigen Bevölkerung. [15]

Die Begriffe Arteriosklerose und Atherosklerose werden im Deutschen häufig synonym verwendet. Im Englischen ist *arteriosclerosis* der Oberbegriff für degenerative Veränderungen der Arterienwand, dessen häufigste Manifestationsform die Atherosklerose ist. Laut WHO ist Atherosklerose als variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia definiert. Jede Arterie kann von Atherosklerose befallen sein. Am häufigsten manifestiert sie sich

an den Koronararterien, den hirnversorgenden sowie den peripheren Arterien. Sie kann am Herzen zur Angina Pectoris bzw. zum Myokardinfarkt, an den Hirnarterien zum Schlaganfall (bzw. TIA/PRIND) und peripher zu Claudicatio intermittens und Gangrän führen.

Ebenso wie Diabetes wird Atherosklerose heute als eine inflammatorische Erkrankung verstanden. [16][17][18] Nach der Common-soil-Hypothese entwickeln sich beide Erkrankungen auf dem metabolischen Syndrom verbunden mit subklinischer chronischer Inflammation. [19] Nach der Response-to-injury-Hypothese kommt es bei der Atheroskleroseentstehung aufgrund mechanischer, chemischer, immunologischer oder toxischer Einflüsse zu einer Schädigung des Endothels. Die resultierende endotheliale Dysfunktion führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen an endothelialen Zellen, die die Adhäsion und Invasion von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten in die Intima ermöglichen. Darüber hinaus kommt es zu einer Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen. Durch Lipidaufnahme der Makrophagen kommt es zur Bildung von Schaumzellen. Diese bilden zusammen mit den T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen die *fatty streaks*, aus denen sich die für die Atherosklerose typischen Plaques entwickeln können.

Als ein Risikofaktor für Atherosklerose gilt vor allem die viszerale Adipositas. Insbesondere in Kombination mit gestörtem Kohlenhydratstoffwechsel (z.B. Insulinresistenz oder Diabetes mellitus), Hypertriglyzeridämie und arteriellem Hypertonus (beim sog. metabolischen Syndrom) besteht hohe Atherogenität. Obwohl Fettsucht als Risikofaktor für Atherosklerose seit langem bekannt ist, zeigen erst neuere Erkenntnisse, dass dem Fettgewebe auch eine bedeutende Rolle als endokrines Organ zugesprochen werden kann. Es dient nicht nur der Speicherung von Triglyzeriden als Energiereserven, sondern produziert und sezerniert darüber hinaus auch eine Reihe von Proteinen, die sog. Adipokine. [7][4][5] Verschiedene Adipokine beeinflussen die Entstehung einer Atherosklerose. [7][20] Zu ihnen zählen Adiponektin, VEGF, IL-6 und TNF- α . [7][8][9][20] Die Stoffwechselaktivität variiert je nach Lokalisation des Fettgewebes. Man unterscheidet insbesondere das viszerale und das subkutane Fettgewebe. [21][22] Das viszerale Fettgewebe setzt mehr proinflammatorische Adipokine frei. [23] Die Höhe der einzelnen Adipokinkonzentrationen hängt mit der

Menge des Gesamtkörperfettes zusammen. [7] Während die Adiponektinexpression mit steigendem BMI sinkt, ist die Konzentration der übrigen bekannten Adipokine proportional zum Gesamtkörperfett. [7][23]

Das Adipokin Adiponektin (ADPN) wird ausschließlich in Adipozyten exprimiert. [24] Es ist ein aus 244 Aminosäuren bestehendes Protein, das Homologien zu Kollagen VIII und X sowie Komplementfaktor C1q aufweist [24], weswegen es auch *adipocyte complement-related protein* (Acrp 30) genannt wird [7][25]. Es liegt in hoher Konzentration im Plasma vor (2-25µg/ml). [24] Die Plasmakonzentration ist bei Adipösen niedriger als bei Normalgewichtigen [26]. Man vermutet, dass die verminderte Adiponektinkonzentration bei übergewichtigen Patienten eine Rolle bei der Atherogenese spielt. [24] Neuere Untersuchungen an Frauen haben gezeigt, dass niedrige Adiponektinkonzentrationen stärker mit KHK als mit Übergewicht korrelieren. [27] Adiponektin scheint antiatherosklerotisch zu wirken, indem es die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen hemmt. [11] Patienten unter EPO-Therapie haben höhere Plasmaadiponektinkonzentrationen als unbehandelte Patienten. [14][28]

VEGF (auch VEGF-A genannt) gehört zur VEGF-Familie und gilt als Hauptregulator von Angiogenese und vaskulärer Permeabilität. [29] VEGF steht für *vascular endothelial growth factor*. Neben dem Fettgewebe wird das Zytokin VEGF auch in nahezu allen anderen durchbluteten Geweben exprimiert. [6] Die VEGF mRNA-Expression wird durch Hypoxie induziert. [30] Man vermutet, dass VEGF über proinflammatorische und angiogene Mechanismen eine Rolle bei der Atherogenese spielt. [6]

Interleukin-6 (IL-6) und TNF-alpha gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen. IL-6 gehört zur Familie der 20kDa Polypeptid-Zytokine, das von einer Reihe verschiedener Zellen wie Fibroblasten, Adipozyten, Monozyten und Endothelzellen sezerniert wird [8], wovon ca. 10% auf das Fettgewebe fallen [7]. Es spielt eine Rolle in der Immunabwehr, Hämatopoese und Akuten-Phase-Reaktion. [31]

TNF- α gehört zur *TNF Ligand Superfamily*. TNF- α steht für *tumour necrosis factor- α* . Es wird von Adipozyten sowie einer Vielzahl weiterer Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten sezerniert. [7]

Sowohl die IL-6- als auch die TNF-alpha-Konzentrationen sind bei Adipositas erhöht. [8][24] Beide Zytokine spielen eine Rolle bei der Insulinresistenz. [7] Man nimmt an, dass sie auch eine Rolle bei der Atherogenese spielen. [7][8] Sowohl erhöhte IL-6-Spiegel als auch erhöhte TNF- α -Spiegel gehen mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität einher. [7][32]

Ein Medikament mit bekannten antiatherogenen Eigenschaften ist Erythropoietin (Epo). [12] Es wird routinemäßig zur Behandlung von renaler Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz (CNI) eingesetzt. Diese Patienten haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose. Eine Epo-Behandlung senkt ihr Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis und auf diese Weise auch die Mortalität. [12][33] Es gibt Hinweise darauf, dass dies nicht allein auf die Minderung der Anämie zurückzuführen ist. [12][34][35] Die Epo-Wirkung beschränkt sich dabei nicht auf hämatopoetische Zellen, sondern erstreckt sich auch auf andere periphere Zellen. [34][36][37] Untersuchungen einer italienischen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Therapie mit Epo neben der Minderung des kardiovaskulären Risikos auch zu erhöhten Adiponektin-Spiegeln führt. [14]

Erythropoietin (Epo) ist ein 30,4 kDa großes Glykoprotein, das hauptsächlich in der Niere gebildet wird. Es dient dazu, die Hämoglobinkonzentration des Blutes im Normbereich zu halten bzw. nach Hämorrhagie wieder anzuheben. Bei sinkendem Hämoglobinspiegel während einer unkomplizierten Anämie kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Epo-Spiegels, wobei der O₂-Gehalt im Gewebe die kontrollierende Größe ist. [38] Epo führt über eine negative Rückkopplung zur Verhinderung von Apoptose und auf diese Weise zu einer gesteigerten Erythropoese, wodurch es zu einem Anstieg des Hkt-Wertes kommt und damit zu einer Erhöhung der Sauerstoffkapazität.

Die unter Epo-Behandlung erhöhten Konzentrationen des Adipokins Adiponektin in einer Studie lassen vermuten, dass Epo auch eine direkte Wirkung auf das menschliche Fettgewebe hat. Möglicherweise kann Epo die Expression verschiedener Adipokine beeinflussen. Die Bedeutung der Adipokine bei der Atherogenese und die Senkung des Atheroskleroserisikos unter Epo-Therapie führen zu der Frage, ob Epo durch Beeinflussung der Adipokinexpression die Atherosklerosebildung günstig beeinflussen kann. Möglicherweise kann Epo über eine Veränderung der Adipokinexpression im Fettgewebe die Inflammation reduzieren und auf diese Weise der Atherosklerose entgegenwirken. Denkbar wäre neben einer erhöhten Expression des antiinflammatorischen und endothelprotektiven Adipokins Adiponektin ebenfalls eine Reduktion inflammatorischer Adipokine wie TNF- α , IL-6 und VEGF unter dem Einfluss von Epo.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand viszeraler und subkutaner Fettgewebeproben von normal- und übergewichtigen Patienten den Einfluss von Epo auf die Expression der Adipokine Adiponektin, IL-6, TNF- α und VEGF zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Bezugsquellen

Chemikalien:

Produkt	Firma
Aqua dest.	
c-DNA-Synthese-Kit	Invitrogen
Chloroform	Merck
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	Sigma
dNTP-Mix (100mM dCTP, 100mM dATP, 100mM dGTP, 100mM dTTP)	Gibco BRL
DTT	Invitrogen
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) (+1g/L D-Glucose +L-Glutamine +Pyruvate)	Gibco BRL
Dulbecco's PBS	Gibco BRL
Ethanol absolut	Merck
FBS (fötales Rinderserum)	Gibco BRL
Hepes 1M	Invitrogen
Isopropanol	Fluka
L-Glutamin	Gibco BRL
LightCycler Kit-FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
MgCl ₂	Invitrogen
NeoRecormon® (Epoetin beta)	Roche
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Random Hexamer	Invitrogen
RNase H	Invitrogen
RNase out	Invitrogen
RT-Puffer (PCR-MgCl ₂)	Invitrogen
Superscript II RT	Invitrogen

SYBR-Premix	Takara
-------------	--------

Primer:

MWG Biotech AG

Gen	Primersequenzen forward und reverse	Effizienz	Produkt	
			BP	MT (°C)
S27	5'-CCA GGA TAA GGA AGG AAT TCC TCC TG-3' 5'-CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG-3'	1,81	319	82,8
Adiponektin	5'-GGA GCT GTT CTA CTG CTA-3' 5'-GGA CCA ATA AGA CCT GGA-3'	1,78	215	89,7
VEGF	5'-AGA AGG AGG AGG GCA GA-3' 5'-CCT CAG TGG GCA CAC A-3'	3,51	202	86,4
TNF- α	5'-GAA AGG ACA CCA TGA GCA-3' 5'-GAG AGG TCC CTG GGG AA-3'	2,16	224	88,6
IL-6	5'-GCC AGA GCT GTG CAG A -3' 5'-TGC CGA AGA GCC CTC A -3'	1,69	215	86,4

Verbrauchsmaterialien:

Produkt	Firma
6-Well-Platten	Sarstedt
Einmal-Kunststoffpipetten	Falcon BD
Etiketten	Apli
Falcon-Röhrchen	Falcon BD
Filter-tip Pipettenspitzen für PCR	Sarstedt
Handschuhe	Hartmann
LC Glaskapillaren	Roche

Petrischalen	Sarstedt
Phenolfeste Röhrchen	Plus
Pipettenspitzen	Sarstedt
Safe-Lock-Tubes (0,5ml)	Eppendorf
Safe-Lock-Tubes (1,5ml)	Eppendorf
Tissue	Wepa
UVetten	Eppendorf

Geräte:

Produkt	Firma
Abzug	C+P Möbelsysteme
Autoklav	System
Eismaschine	Scotsman
Heizblock Tri-Block DB-3	Techne
Kühlblock für LC	Roche
Kühlschrank	Liebherr
LightCycler	Roche
Magnetrührer/Heizplatte	IKAMAG
Minizentrifuge	National Labnet CO.
Photometer	Eppendorf
Pipetteboy	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten für PCR	Eppendorf
Pipetten für Westernblot	Gilson
Relative Quantification Software 1.0	Roche
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Heraeus
Spatel	
steriles Besteck (Pinzette, Schere)	
Termal Cycler Trio-Thermoblock	Biometra
Tiefkühlschrank (-20°)	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80°C) IUF 8520	Romulus Holding

Ultra Turrax	IKA-Werke
Vortex	Janke&Kunkel IKA-Labortechnik
Waage	Mettler
Zentrifuge	Heraeus
Zentrifuge	Hettich

3.2 Ethikantrag

Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt (OB-036/05).

3.3 Molekularbiochemische Methoden

3.3.1 Probengewinnung

Intraoperativ wurde von 29 Patienten, die nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis gegeben haben, subkutanes und/oder viszerale Fettgewebe entnommen (subkutan: n=25; viszeral: n=23). Keiner der Patienten litt an einer endokrinen Störung. Das mittlere Alter der Patienten betrug 58,52 Jahre ($\pm 13,11$ Jahre). Der Body Mass Index war bei 12 der Patienten unter 25 kg/m^2 . 17 Patienten hatten einen BMI größer 25 kg/m^2 , davon waren 10 Patienten präadipös (BMI 25-30 kg/m^2) und 7 adipös (BMI >30 kg/m^2). Das Gewebe wurde sofort in ein 50 ml Kunststoffröhrchen mit Pufferlösung überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

3.3.2 Fettgewebekultur

Alle Arbeitsschritte wurden unter der reinen Werkbank durchgeführt:

Von dem entnommenen Fettgewebe wurden jeweils 1,2 g abgewogen und auf vier Wells einer mit Medium gefüllten 6-Wellplatte verteilt (300 mg Gewebe pro Well). Der Rest wurde verworfen. Es folgte die mechanische Zerkleinerung der Gewebeproben mittels steriler Pinzette und Schere. Das entnommene Fettgewebe wurde für 72 h bei 37°C und 5% CO_2 in Kultur gehalten. Als Kulturmedium wurde pro Well 3 ml steriles

Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) + 1000 mg/l Glucose + L-Glutamine + Pyruvate der Firma Invitrogen mit dem Zusatz von 10 ml 1M HEPES-Puffer, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml FCS verwendet. Alle 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Das Gewebe wurde für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit 10 IU Epo/ml Kulturmedium (entsprechend 83 ng Epo/ml Kulturmedium) inkubiert. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Bei der 24h-Probe wurde nach 48 h beim Mediumwechsel Epo zugefügt, so dass die Inkubation in den letzten 24 h der Kulturzeit erfolgte. Die 48h-Probe erhielt beim Mediumwechsel nach 24 h und 48 h Epo, was eine Inkubationszeit von 48 h bis zur Ernte gewährleistete. Die 72h-Probe erhielt von Beginn an bei jedem Mediumwechsel Epo. Die unbehandelte Probe erhielt bei jedem Mediumwechsel – genauso wie die 24h- und 48h-Probe vor Beginn der Epo-Inkubation – jeweils diejenige Menge an PBS, die der Menge an Epo der behandelten Proben entsprach. (Um – abgesehen von der Epo-Inkubation – für alle Proben eine gleiche Behandlung zu gewährleisten, wurde der Puffer, in dem das Epo verdünnt wurde, auch den unbehandelten Proben gegeben.)

Nach 72 h wurde das Fettgewebe – nach Absaugen des Mediums – mit jeweils 1 ml PBS gespült und in ein mit 1 ml TriReagent gefülltes Röhrchen überführt. Danach erfolgte die Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung.

3.3.3 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die Fettgewebsproben mit dem TriReagent in den phenolfesten Röhrchen bei Raumtemperatur aufgetaut.

Das im TriReagent enthaltene Guanidinisothiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert RNasen und andere Enzyme aufgrund seines chaotropen Charakters. Im ebenfalls enthaltenen Phenol lösen sich Proteine und DNA. Das Fettgewebe wurde mittels UltraTurrax homogenisiert und anschließend bei 12.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes und 5 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 0,2 ml Chloroform pro ml TriReagent dazugegeben. Nach einer Viertelstunde bei Raumtemperatur wurde erneut bei 12.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (15 min). Dabei erzielt man eine Auftrennung des Gemischs in drei Phasen: Die untere organische Phase, die Proteine enthält, die DNA-haltige Interphase sowie die wässrige, obere

Phase, in der sich die RNA befindet. Nach Abpipettieren der oberen RNA-haltigen Phase erfolgte die Zugabe von jeweils 0,5 ml Isopropanol, um die RNA zu fällen. Das anschließende Waschen des entstandenen RNA-Pellets (zur Entfernung von Salz- und Isopropanolresten) erfolgte nach weiteren 10 min bei Raumtemperatur und nochmaligem Zentrifugieren (10 min bei 12.000 g und 4°C) mit 70%igem Ethanol. Zuletzt wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und für 10 min auf 65 °C erwärmt, um eine vollständige Lösung der RNA zu erzielen. Danach erfolgte die Lagerung der so gewonnenen Gesamt-RNA bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung.

3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA zu bestimmen, wurde ihre optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Hier liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren für ultraviolettes Licht. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht ca. 40 ng/µl einzelsträngiger RNA. Daraus ergibt sich zur Berechnung der RNA-Konzentration folgende Formel:

RNA-Konzentration [ng/µl]=OD₂₆₀ x Verdünnung[ng/µl] x 40.

Um Verunreinigungen durch z.B. Salze oder Proteine auszuschließen, wurde die Extinktion bei 230 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ dient ebenfalls als Maß für die Reinheit der Probe.

3.3.5 Reverse Transkription

Um die Expression eines bestimmten Gens auf RNA-Ebene mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen zu können, muss die (Gesamt-)RNA zunächst mithilfe der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben werden.

Für die cDNA-Synthese wurden für jede Fettprobe jeweils 1,5 µg der entsprechenden RNA zusammen mit 1 µl Desoxynucleosidtriphosphat-Mix (10 mM dNTP-Mix), 1,5 µl Primer und DEPC-Wasser (ad 10 µl) in ein Tube pipettiert. Es wurden Random Hexamer Primer verwendet, weil diese aus einem Mix aus jeweils sechs Oligonukleotiden in zufälligen Kombinationen bestehen und an jedem Ort der RNA binden können und somit zu einer höheren Ausbeute als spezifische Primer führen. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, wurde der Ansatz dann für 5 min bei 65°C in den Heizblock gestellt und anschließend 1 min auf Eis wieder heruntergekühlt,

wobei es zur Anlagerung der Random Hexamere an die RNA kommt. Es folgte die Zugabe von jeweils 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 2 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl DEPC-Wasser und 1 µl RNase out. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren sowie 2-minütiger Inkubation bei 25 °C wurde pro Tube 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase (RT) dazugegeben, um die Strangbildung zu katalysieren. Die Tubes kamen anschließend für 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42°C und zuletzt 15 min bei 70°C in den Heizblock. Schließlich wurde noch jeweils 1 µl RNase H hinzugefügt, um die mRNA-Stränge zu verdrängen, so dass man am Ende nur noch ds-cDNA vorliegen hat. Nach 20 min bei 37°C wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Dazu werden zunächst in der Denaturierungsphase DNA-Doppelstränge durch Erhitzen geschmolzen. Im folgenden Annealingschritt wird die Temperatur wieder gesenkt, was den im Überschuss zugegebenen Oligonukleotidprimern ein Hybridisieren an komplementären Stellen der DNA-Einzelstränge ermöglicht. Da die Strangverlängerung immer in 5'-3'-Richtung und somit an zwei komplementären DNA-Einzelsträngen gegenläufig erfolgt, werden für die beiden Einzelstränge zwei verschiedene Primer benötigt: ein forward und ein reverse Primer, die dem Randbereich jeweils eines Target-DNA-Einzelstranges am 3'-Ende komplementär sind. Schließlich wird für die Elongationsphase die Temperatur wieder auf ca. 70 °C erhöht – was dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase entspricht. Diese verlängert die neuen DNA-Stränge, indem sie ausgehend von den Primern einen komplementären zweiten DNA-Einzelstrang aus Desoxyribonukleotiden synthetisiert, wobei der Einzelstrang der Target-DNA als Matrize dient. Hierfür muss dem PCR-Ansatz neben den erforderlichen Nukleotiden und der hitzestabilen DNA-Polymerase auch Puffer und Mg²⁺, das für die Aktivität der Polymerase benötigt wird, zugesetzt werden.

Auf diese Weise erhält man nach einem Zyklus die doppelte Anzahl an Kopien der Zielsequenz. Bei wiederholtem Durchlaufen von Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Target-DNA.

3.3.6.1 Quantitative Real-Time PCR

Die Real-time PCR wurde mit dem Light Cycler der Firma Roche durchgeführt. Es erfolgte eine relative Quantifizierung, indem die Genexpression der zu untersuchenden Zielgene mit der Expression eines Housekeeping-Gens verglichen wurde. Als Housekeeping-Gene bezeichnet man Gene, die in allen Zellen kontinuierlich angeschaltet sind und ständig in annähernd konstanten Mengen exprimiert werden, da sie für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels benötigt werden. Somit dienen sie als Kontrolle der Effizienz der cDNA-Synthese und Referenz für die Proben. Hier wurde als externer Standard das Housekeeping-Gen S27 verwendet.

Für jede Probe wurde 1 µl cDNA zusammen mit jeweils 0,25 µl forward und 0,25 µl reverse Primer, 4,75 µl DEPC-Wasser sowie 6,25 µl SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) in eine Glaskapillare gegeben, wobei die Kapillaren bis zum Start der PCR im Metalladapter des auf 4 °C vorgekühlten Kühlblocks blieben. Der SYBR[®] Premix enthält neben einer thermostabilen DNA Polymerase (TaKaRa Ex Taq[™] HS), einem Desoxynucleosidtriphosphat-Mix (dNTP Mixture) und Mg²⁺ den Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 2500 g kamen die Kapillaren im Probenkarussell in den Light Cycler.

Die Real-Time-PCR erfolgte dann nach folgendem Ablauf:

Die Denaturierungstemperatur betrug 95 °C. Für die Annealingphasen wurde die Temperatur für 15 s auf 60 °C gesenkt. Nach dem Elongationsschritt (12 s bei 72 °C) wurde jeweils die Fluoreszenz gemessen.

Der zur Detektion der amplifizierten DNA-Abschnitte verwendete Farbstoff (SYBR Green I) interkaliert sequenzunabhängig zwischen den Basen von DNA-Doppelsträngen, so dass es bei Zunahme der Menge der PCR-Produkte zu einer proportionalen Zunahme des Fluoreszenzsignals kommt.

Als Maß für die Quantifizierung der Ausgangsmenge an vorhandener Ziel-DNA wird der Crossing Point (CP) verwendet. Der CP bezeichnet den Zyklus, an dem erstmals detektierbare Fluoreszenz auftritt und die exponentielle Phase der Amplifikation beginnt. Am CP befinden sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu

synthetisierter Ziel-DNA. Die Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt wurde, um diese Menge zu erreichen, gibt Aufschluss über die relative Ausgangsmenge der Ziel-DNA.

Da der fluoreszierende Farbstoff sowohl an spezifischen als auch an unspezifischen PCR-Produkten bindet, wurde im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätsbestimmung durchgeführt. Dabei wird die Temperatur ermittelt, bei der die DNA-Doppelstränge denaturieren. Dazu wird die Temperatur langsam von 50 °C auf 95 °C erhöht. Beim Schmelzen der DNA wird das SYBR Green I wieder freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt ab. Der Schmelzpunkt ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der DNA-Doppelstränge geschmolzen sind und ist abhängig von Sequenz, Länge und GC-Gehalt der DNA-Stränge. Unspezifische PCR-Produkte wie Primerdimere haben einen niedrigeren Schmelzpunkt. Somit lässt sich jedem PCR-Produkt ein spezifischer Schmelzpunkt zuordnen und das gewünschte Amplifikationsprodukt kann von unerwünschten Nebenprodukten unterschieden werden.

Mit der quantitativen Real-time PCR wurde von allen Proben die relative Menge an spezifischen Sequenzen in der c-DNA von Adiponektin, VEGF, IL-6, TNF- α und dem Housekeeping-Gen S27 gemessen.

3.4 Auswertung und Statistik

Von allen Proben wurde die relative Menge der Targetgene und des Referenzgens S27 mithilfe der Second-Derivate-Maximum-Methode von der LightCycler Software bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle diente jeweils als Kalibrator und wurde auf den Wert 1 gesetzt. Es wurde der Quotient aus der target/reference ratio von den behandelten Proben und des entsprechenden Kalibrators gebildet.

Mithilfe der Relative Quantifikation Software wurde eine Effizienzkorrektur durchgeführt. Die Effizienzkorrektur beruht auf den Daten relativer Standardkurven, welche auf die Effizienz des Targets und des Referenzgens schließen lassen. Sie dient dazu, Ungenauigkeiten aufgrund unterschiedlicher Effizienzen der einzelnen Primer zu verringern. Die Ergebnisse sind als Mediane mit den 25%- und 75%-Perzentilen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman ANOVA und dem

nicht parametrischen Wilcoxon-Test. Signifikanzen (gekennzeichnet mit *) wurden bei $p \leq 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Epo auf die mRNA-Expression von Adiponektin, IL-6, TNF- α und VEGF in humanem Fettgewebe untersucht. Dazu wurde intraoperativ viszerales und subkutanen Fettgewebe von normalgewichtigen (BMI < 25 kg/m²) und übergewichtigen Patienten (BMI > 25 kg/m²) im Rahmen eines chirurgischen Eingriffes entnommen. Bei den übergewichtigen Patienten (BMI > 25 kg/m²) wurde zusätzlich noch zwischen einem BMI unter 30 kg/m² (präadipös 25-30 kg/m²) und einem BMI über 30 kg/m² (adipös) unterschieden.

Das Gewebe wurde insgesamt 72 h in Kultur gehalten und entweder als Kontrolle unbehandelt belassen oder für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit 10 IU Epo/ml Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA nach Standardprotokoll isoliert. Nach Umschreibung in cDNA wurde eine relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR mit spezifischen Primern für Adiponektin, IL-6, TNF- α und VEGF durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman ANOVA und dem nicht parametrischen Wilcoxon-Test.

4.1 Adiponektin mRNA-Expression in humanem Fettgewebe

Nach der Behandlung mit Epo zeigten sich weder im viszeralen noch im subkutanen Fettgewebe signifikante Veränderungen der Adiponektin mRNA-Expression.

Beim viszeralen Fettgewebe ergaben sich nach Epo-Inkubation keine signifikanten Veränderungen der Adiponektin mRNA-Expression (Friedmans ANOVA $p=0,256$ für BMI < 25 kg/m², $p=0,129$ für BMI > 25 kg/m², $p=0,724$ für BMI 25-30 kg/m² bzw. $p=0,165$ für BMI > 30 kg/m²). (Abb. 1)

Keine Inkubationszeit mit Epo führte in diesem Gewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe bei den Normalgewichtigen ($p=0,401$ nach 24 h, $p=0,767$ nach 48 h und $p=0,636$ nach 72 h), Übergewichtigen ($p=0,930$ nach 24 h, $p=0,424$ nach 48 h und

p=0,530 nach 72 h), Präadipösen (p=0,753 nach 24 h, p=0,917 nach 48 h und p=0,128 nach 72 h) oder Adipösen (p=0,680 nach 24 h, p=0,500 nach 48 h und p=0,500 nach 72 h) zu einer signifikanten Änderung der Adiponektin mRNA-Expression.

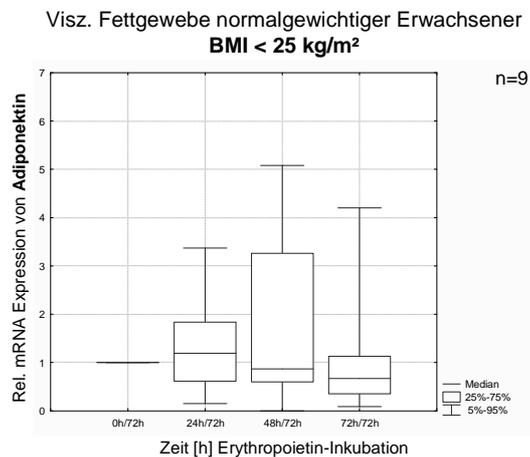


Abb. 1a

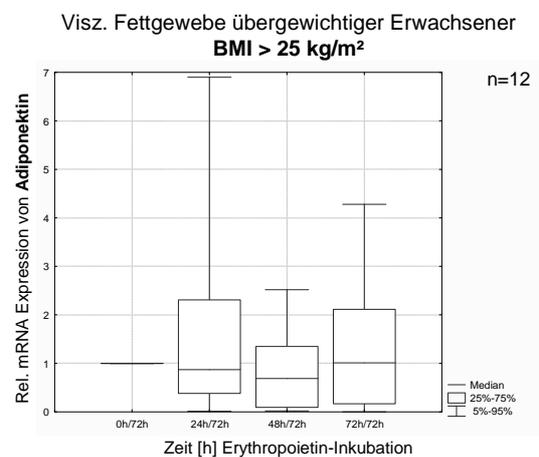


Abb. 1b

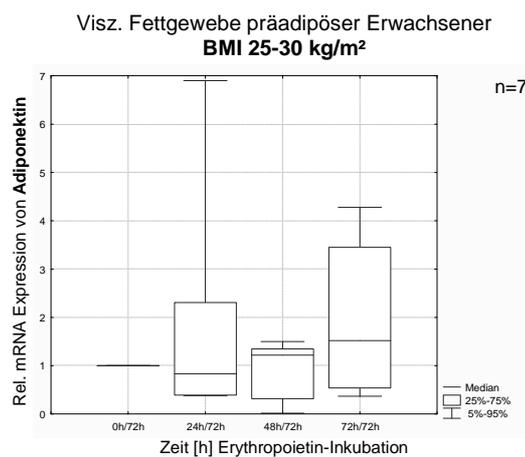


Abb. 1c

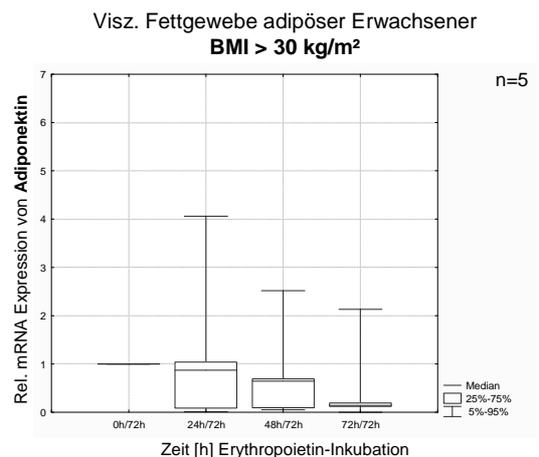


Abb. 1d

Abb. 1: Relative Adiponektin mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

Beim subkutanen Fettgewebe ergaben sich nach Behandlung mit Epo keine signifikanten Veränderungen der Adiponektin mRNA-Expression (Friedmans ANOVA p=0,415 für BMI < 25 kg/m², p=0,127 für BMI > 25 kg/m², p=0,572 für BMI 25-30 kg/m² bzw. p=0,098 für BMI > 30 kg/m²). (Abb. 2)

Keine Inkubationszeit mit Epo führte beim subkutanen Fettgewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe bei den Normalgewichtigen ($p=0,374$ nach 24 h, $p=1,000$ nach 48 h und $p=0,260$ nach 72 h), Übergewichtigen ($p=0,272$ nach 24 h, $p=0,213$ nach 48 h und $p=0,534$ nach 72 h), Präadipösen ($p=0,128$ nach 24 h, $p=0,116$ nach 48 h und $p=0,237$ nach 72 h) oder Adipösen ($p=0,893$ nach 24 h, $p=0,686$ nach 48 h und $p=0,273$ nach 72 h) zu einer signifikanten Änderung der Adiponektin mRNA-Expression.

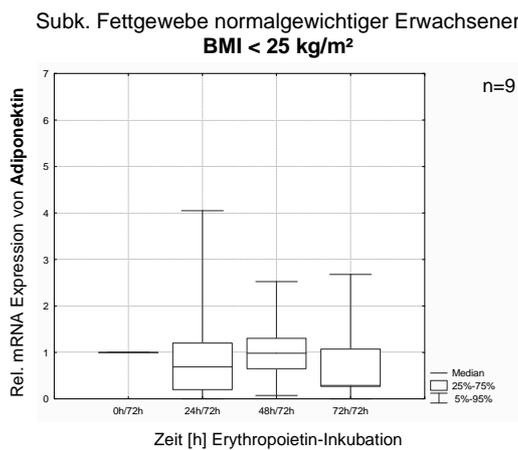


Abb. 2a

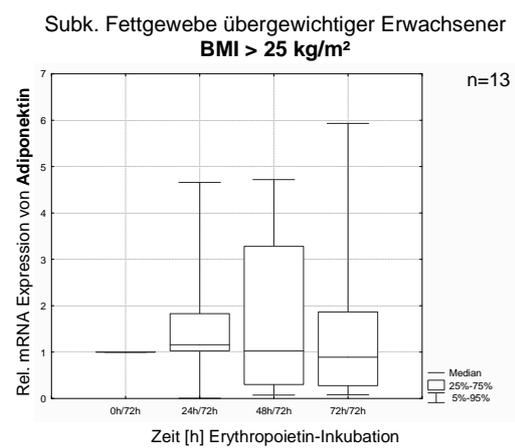


Abb. 2b

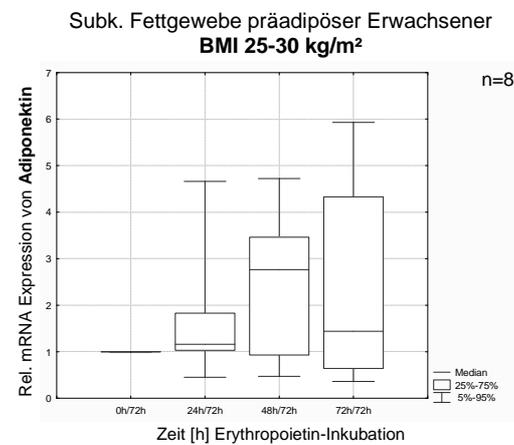


Abb.2c

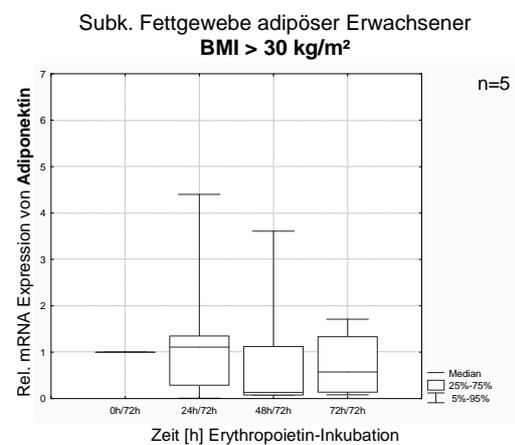


Abb. 2d

Abb. 2: Relative Adiponektin mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

4.2 IL-6 mRNA-Expression in humanem Fettgewebe

Die Epo-Behandlung des viszeralen Fettgewebes von Patienten mit einem BMI kleiner 25 kg/m^2 ($n=8$) ergab keine signifikanten Veränderungen der IL-6 mRNA-Expression (Friedmans ANOVA $p=0,740$). (Abb. 3a) Hier kam es im Vergleich zur unbehandelten Probe weder nach 24 h ($p=0,327$), nach 48 h ($p=0,779$) noch nach 72 h ($p=0,779$) Epo-Inkubation zu einer signifikanten Veränderung der IL-6 mRNA-Expression.

Bei Patienten mit einem BMI größer 25 kg/m^2 ($n=13$) zeigte sich nach Epo-Inkubation eine signifikante Reduktion der IL-6 mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe (Friedmans ANOVA $*p=0,036$). (Abb. 3b) Es zeigte sich hier eine signifikante Erniedrigung der IL-6 mRNA-Expression nach 24 h Epo-Inkubation um 50% ($*p=0,046$) und nach 72 h Epo-Inkubation um 80% ($*p=0,028$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die mRNA-Expression von IL-6 nach Behandlung mit Epo für 48 h war im Vergleich zur unbehandelten Probe in diesem Gewebe um 59% nicht signifikant erniedrigt ($p=0,055$).

Von den Patienten mit einem BMI größer 25 kg/m^2 waren 8 präadipös (BMI 25-30 kg/m^2). In dieser Gruppe ergab sich im viszeralen Fettgewebe eine signifikant verringerte IL-6 mRNA-Expression um 47% nach 24 h Epo-Inkubation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($*p=0,039$). Nach Behandlung des Fettgewebes mit Epo für 48 h und 72 h kam es in diesem Gewebe zu keiner signifikanten Veränderung der IL-6 mRNA-Expression ($p=0,327$ bzw. $p=0,161$). Im Friedman ANOVA Test ergab sich im Fettgewebe Präadipöser für die IL-6 mRNA-Expression unter Epo-Einfluss keine Signifikanz ($p=0,127$). (Abb. 3c)

Bei den 5 adipösen Patienten (BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$) reduzierte die Inkubation mit Epo die IL-6 mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe nach 72 h in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle signifikant um 80% ($*p=0,043$), nach 48 h Epo-Inkubation erfolgte eine Erniedrigung der mRNA-Expression von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle um 79% ($p=0,080$). Nach 24 h Epo-Inkubation erfolgte keine signifikante Änderung der IL-6 mRNA-Expression im viszeralem Fettgewebe ($p=0,500$). (Abb. 3d) Im Friedman

ANOVA Test ergab sich im Fettgewebe Adipöser für die IL-6 mRNA-Expression unter Epo-Einfluss keine Signifikanz ($p=0,178$).

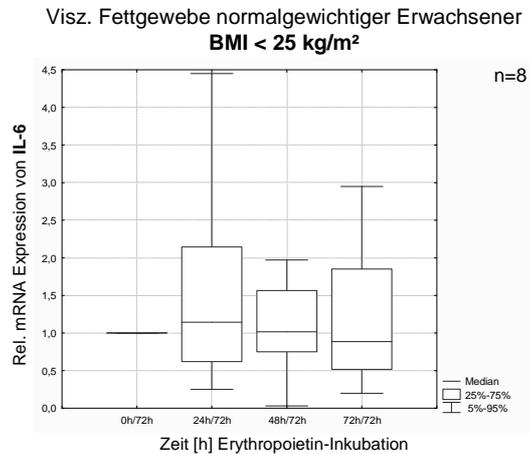


Abb. 3a

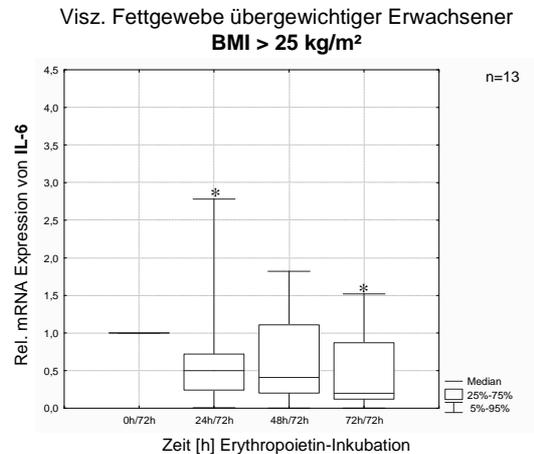


Abb. 3b

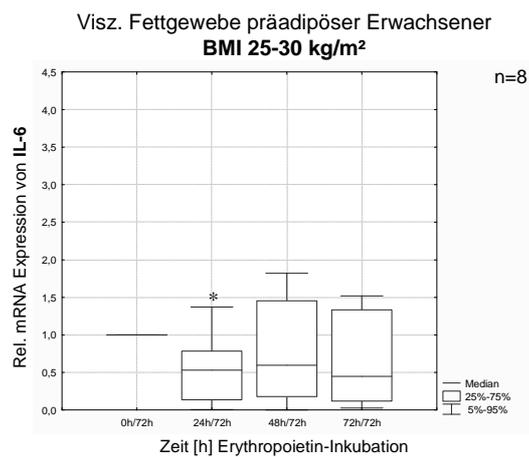


Abb. 3c

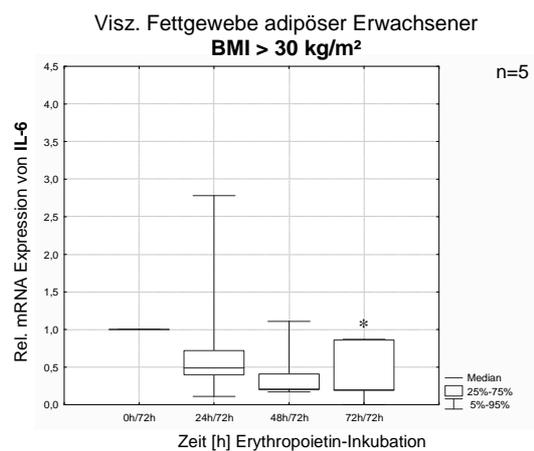


Abb. 3d

Abb. 3: Relative IL-6 mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

Beim subkutanen Fettgewebe ergaben sich nach Epo-Inkubation keine signifikanten Veränderungen der IL-6 mRNA-Expression (Friedmans ANOVA $p=0,740$ für BMI < 25 kg/m², $p=0,689$ für BMI > 25 kg/m², $p=0,564$ für BMI 25-30 kg/m² bzw. $p=0,983$ für BMI > 30 kg/m²). (Abb. 4a-d)

Keine Inkubationszeit mit Epo führte beim subkutanen Fettgewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe bei den Normalgewichtigen ($p=0,203$ nach 24 h, $p=0,960$ nach 48 h und $p=0,0,960$ nach 72 h), Übergewichtigen ($p=0,552$ nach 24 h, $p=0,110$ nach 48 h und $p=0,463$ nach 72 h), Präadipösen ($p=0,463$ nach 24 h, $p=0,345$ nach 48 h und $p=0,753$ nach 72 h) oder Adipösen ($p=0,600$ nach 24 h, $p=0,225$ nach 48 h und $p=0,753$ nach 72 h) zu einer signifikanten Änderung der IL-6 mRNA-Expression.

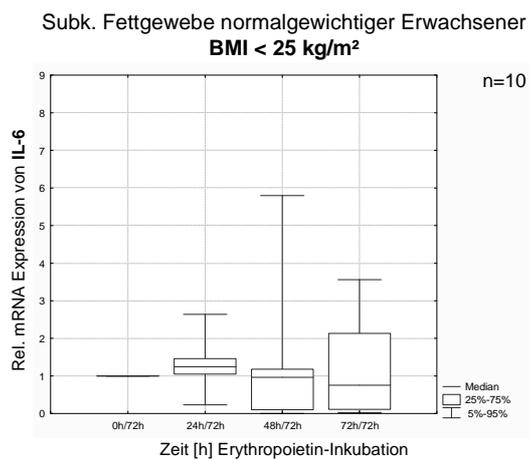


Abb. 4a

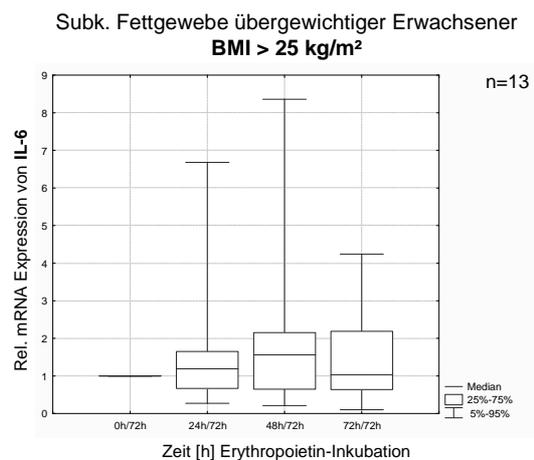


Abb. 4b

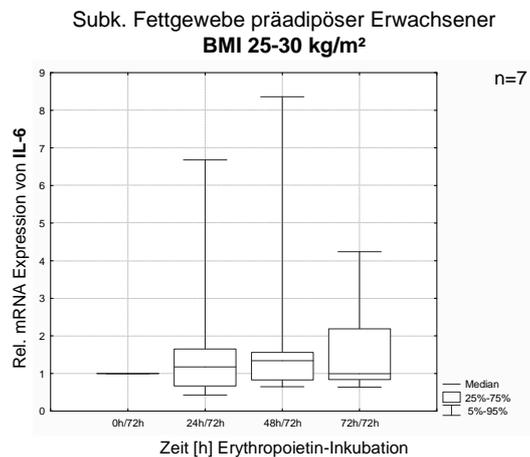


Abb. 4c

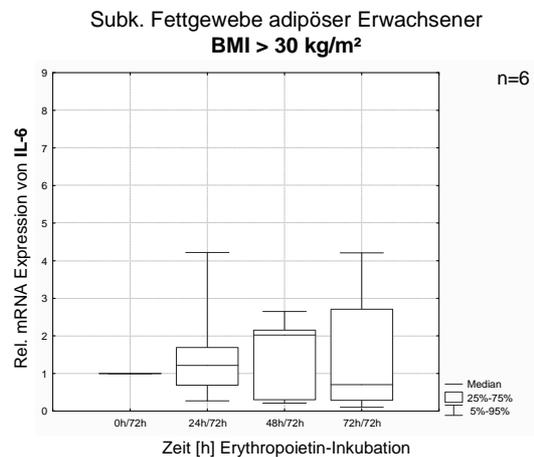


Abb. 4d

Abb. 4: Relative IL-6 mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

4.3 TNF- α mRNA-Expression in humanem Fettgewebe

Die Behandlung mit Epo des viszeralen Fettgewebes von Patienten mit einem BMI kleiner 25 kg/m^2 ($n=8$) ergab keine signifikanten Veränderungen der TNF- α mRNA-Expression (Friedmans ANOVA $p=0,834$). (Abb. 5a) Hier kam es im Vergleich zur unbehandelten Probe weder nach Behandlung mit Epo für 24 h ($p=0,674$), für 48 h ($p=0,208$) noch für 72 h ($p=0,499$) zu einer signifikanten Veränderung der TNF- α mRNA-Expression.

Im viszeralen Fettgewebe der Patienten mit BMI über 25 kg/m^2 ($n=11$) zeigte sich in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle eine Erniedrigung der TNF- α mRNA-Expression von 45% nach 24 h ($p=0,074$), 52% nach 48 h ($*p=0,050$) und 44% nach 72 h ($*p=0,050$) Epo-Inkubation (Friedmans ANOVA $p=0,129$). (Abb. 5b)

Von den übergewichtigen Patienten waren 4 adipös ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$), bei dem viszeralen Fettgewebe dieser Patienten ($n=4$) zeigte sich nach 24 h bzw. 48h unter Epo-Inkubation eine Erniedrigung der TNF- α mRNA-Expression um 71,5% ($p=0,068$) bzw. 69,0% ($p=0,068$). Nach 72h Epo-Inkubation ergab sich keine Änderung der TNF- α mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe ($p=0,144$). Im Friedmans ANOVA Test ergaben sich für die TNF- α mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe keine Signifikanzen ($p=0,129$ für BMI über 25 kg/m^2 , $p=0,507$ für BMI $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ bzw. $p=0,165$ für BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$). (Abb. 5b-d)

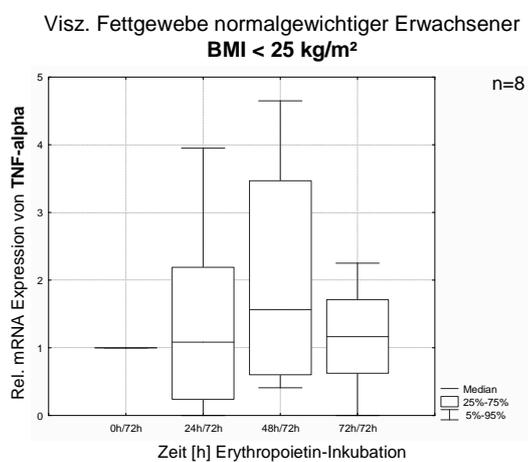


Abb. 5a

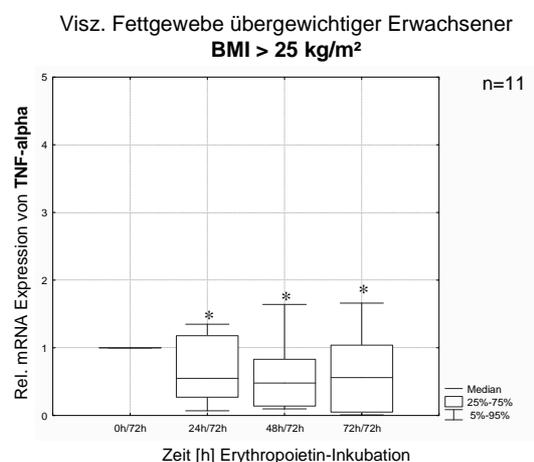


Abb. 5b

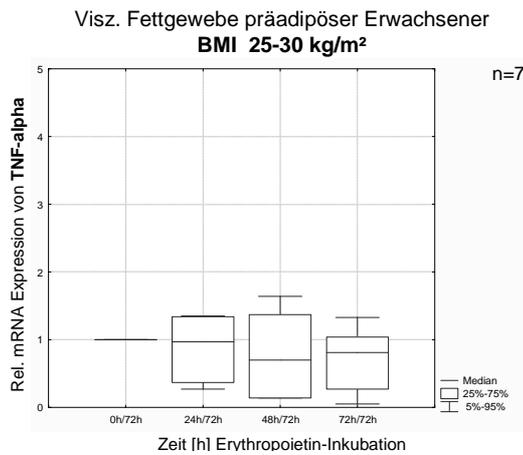


Abb. 5c

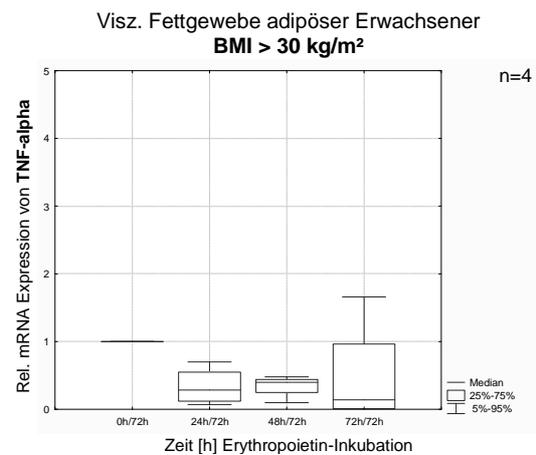


Abb. 5d

Abb. 5: Relative TNF- α mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

Beim subkutanen Fettgewebe ergaben sich nach Epo-Inkubation keine signifikanten Veränderungen der TNF- α mRNA-Expression (Friedmans ANOVA $p=0,319$ für BMI < 25 kg/m², $p=0,129$ für BMI > 25 kg/m², $p=0,431$ für BMI 25-30 kg/m² bzw. $p=0,552$ für BMI > 30 kg/m²). (Abb. 6a-d).

Keine Inkubationszeit mit Epo führte beim subkutanen Fettgewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe bei den Normalgewichtigen ($p=0,753$ nach 24 h, $p=0,173$ nach 48 h und $p=0,0,173$ nach 72 h), Übergewichtigen ($p=0,861$ nach 24 h, $p=0,790$ nach 48 h und $p=0,583$ nach 72 h), Präadipösen ($p=0,612$ nach 24 h, $p=0,345$ nach 48 h und $p=0,398$ nach 72 h) oder Adipösen ($p=0,893$ nach 24 h, $p=0,686$ nach 48 h und $p=0,715$ nach 72 h) zu einer signifikanten Änderung der TNF- α mRNA-Expression.

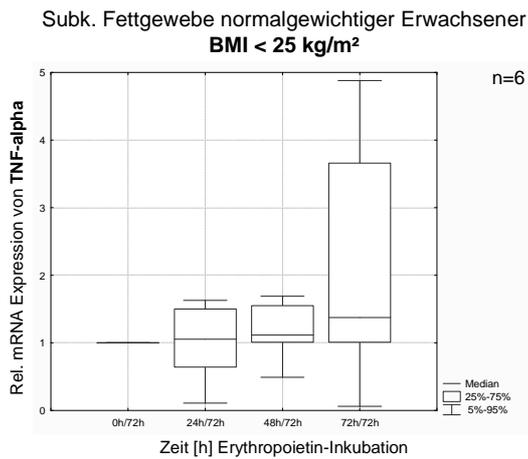


Abb. 6a

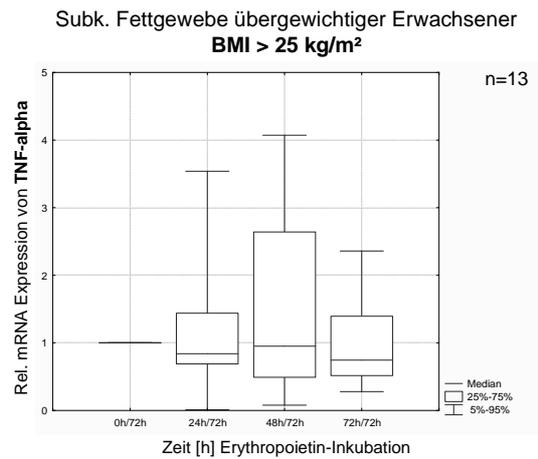


Abb. 6b

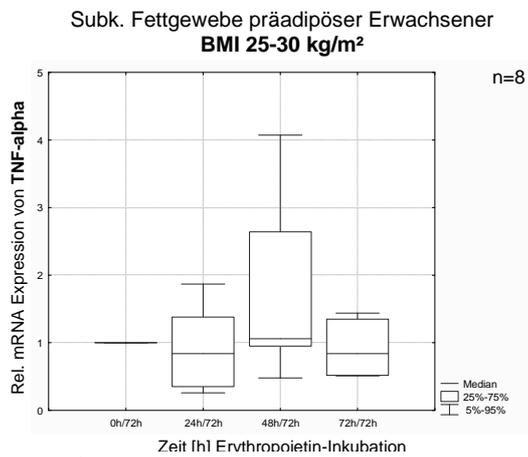


Abb. 6c

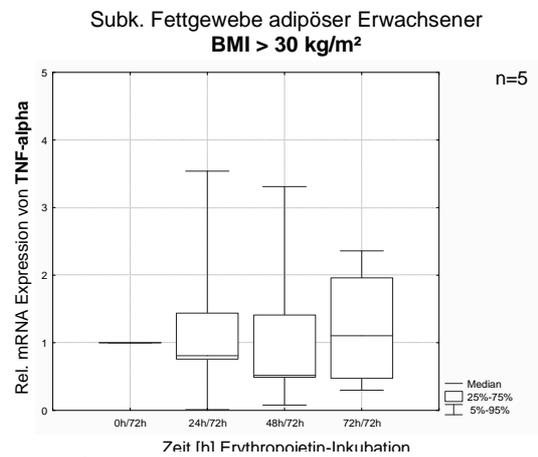


Abb. 6d

Abb. 6: Relative TNF- α mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

4.4 VEGF mRNA-Expression in humanem Fettgewebe

Die Behandlung des viszeralen Fettgewebes von Patienten mit einem BMI kleiner 25 kg/m² (n=8) mit Epo ergab keine signifikanten Veränderungen der VEGF mRNA-Expression (Friedmans ANOVA p=0,815). (Abb. 7a) Hier kam es im Vergleich zur unbehandelten Probe weder nach 24 h (p=0,161), nach 48 h (p=0,612) noch nach 72 h (p=0,674) Epo-Inkubation zu einer signifikanten Veränderung der VEGF mRNA-Expression.

Im viszeralen Fettgewebe von Patienten mit einem BMI über 25 kg/m² (n=12) zeigte sich unter Epo-Inkubation eine Erniedrigung der VEGF mRNA-Expression (Friedmans ANOVA p=0,062). (Abb. 7b) Nach 24 h Inkubation mit Epo reduzierte sich die VEGF mRNA-Expression in dieser Gruppe, in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, signifikant um 53 % (*p=0,017). Von den Gewebespendern mit einem BMI über 25 kg/m² waren 5 adipös (BMI über 30 kg/m²), bei diesen Patienten zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Inkubation mit Epo für 24 h eine um 79% (p=0,068) und nach Inkubation mit Epo für 72 h eine um 96% (p=0,080) erniedrigte mRNA-Expression für VEGF im viszeralen Fettgewebe (Friedmans ANOVA p=0,178). (Abb.7d)

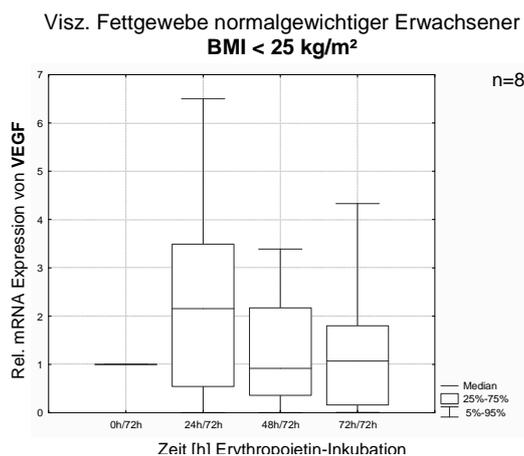


Abb. 7a

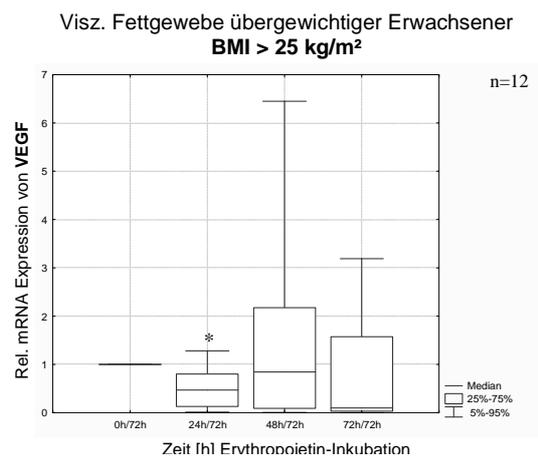


Abb. 7b

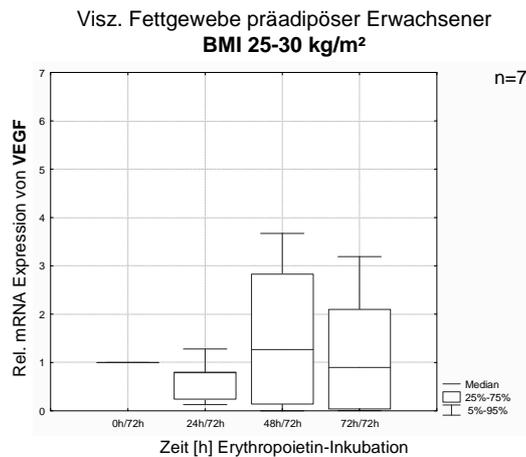


Abb. 7c

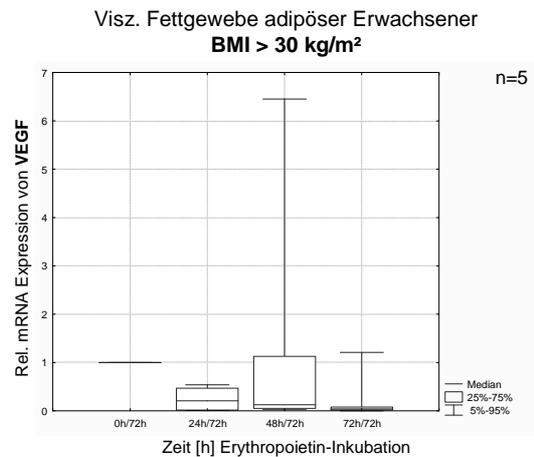


Abb. 7d

Abb. 7: Relative VEGF mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

Beim subkutanen Fettgewebe ergaben sich nach Epo-Inkubation keine signifikanten Veränderungen der VEGF mRNA-Expression (Friedmans ANOVA $p=0,532$ für BMI < 25 kg/m², $p=0,145$ für BMI > 25 kg/m², $p=0,532$ für BMI 25-30 kg/m² bzw. $p=0,472$ für BMI > 30 kg/m²). (Abb. 8a-d).

Keine Inkubationszeit mit Epo führte beim subkutanen Fettgewebe im Vergleich zur unbehandelten Probe bei den Normalgewichtigen ($p=0,241$ nach 24 h, $p=0,110$ nach 48 h und $p=0,260$ nach 72 h), Übergewichtigen ($p=0,507$ nach 24 h, $p=0,638$ nach 48 h und $p=0,866552$ nach 72 h), Präadipösen ($p=0,612$ nach 24 h, $p=0,753$ nach 48 h und $p=0,866$ nach 72 h) oder Adipösen ($p=0,893$ nach 24 h, $p=0,500$ nach 48 h und $p=0,500$ nach 72 h) zu einer signifikanten Änderung der TNF- α mRNA-Expression.

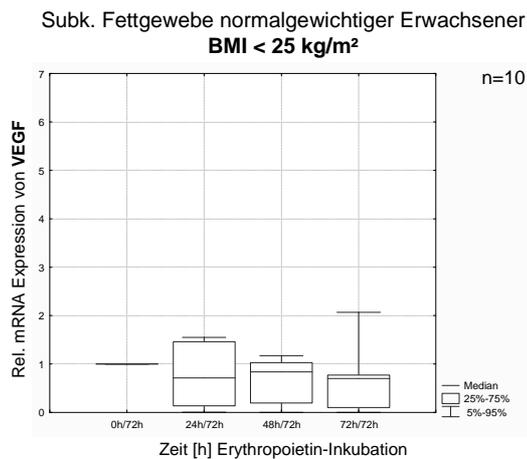


Abb. 8a

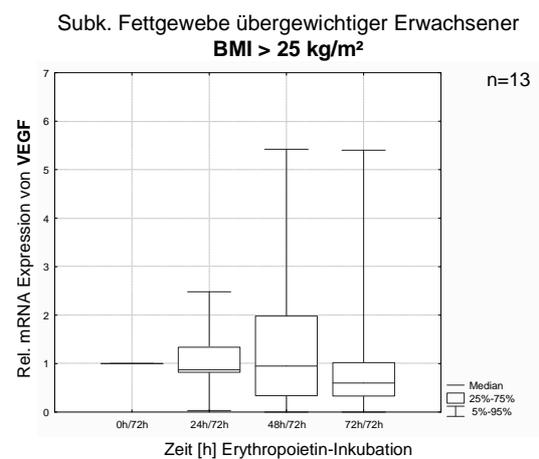


Abb. 8b

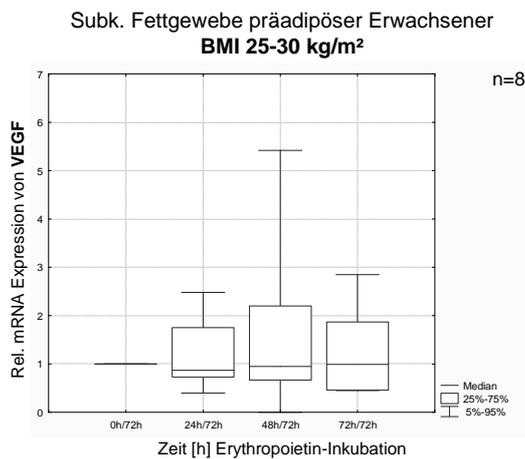


Abb. 8c

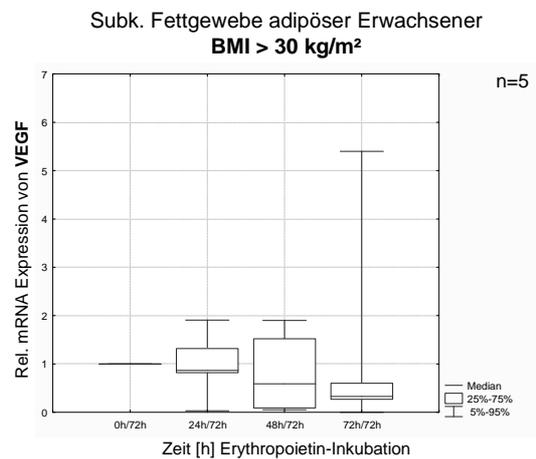


Abb. 8d

Abb. 8: Relative VEGF mRNA-Expression im subkutanen Fettgewebe nach Behandlung mit Epo für 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle (0h) normalisiert. Die BMI-Werte der Patienten lagen im Bereich von (a) unter 25 kg/m², (b) über 25 kg/m², (c) 25-30 kg/m² und (d) über 30 kg/m².

5 Diskussion

Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung [16][17][18], bei der verschiedene Zytokine eine Rolle spielen [7][20]. Zu diesen Zytokinen zählen u.a. Adiponektin, VEGF, IL-6 und TNF-alpha. [7][20] Die Konzentration von Adiponektin, einem sekretorischen Protein des Fettgewebes mit endothelprotektiven Eigenschaften, ist bei Atheroskleroseerkrankten erniedrigt, während die proinflammatorischen Zytokine VEGF, IL-6 und TNF-alpha in dieser Patientengruppe erhöht sind. [7][23] Vor allem Patienten mit Adipositas – häufig in Kombination mit Diabetes – sind von Atherosklerose betroffen.

Neben Diabetikern haben auch Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose. Patienten mit CNI, die aufgrund einer renalen Anämie routinemäßig mit Epo behandelt wurden, wiesen bei erhöhten Adiponektin-Spiegeln ein erniedrigtes kardiovaskuläres Risiko auf. [14] Die Senkung der kardiovaskulären Mortalität und die Konzentrationserhöhung des endothelprotektiven Adipokins Adiponektin unter Epo-Therapie lassen vermuten, dass Epo über die antianämische Wirkung hinaus auch einen Einfluss auf die Adipokin-Sekretion hat und somit potentiell zur endothelprotektiven Therapie eingesetzt werden könnte.

In dieser Studie wurde der Einfluss von Epo auf die mRNA-Expression verschiedener Adipokine untersucht, die bei Entzündungsprozessen bzw. der Atherosklerose eine Rolle spielen. Hierzu wurde subkutanes und viszerales Fettgewebe mit Epo inkubiert und anschließend –nach RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA– mittels quantitativer Real-Time PCR die mRNA-Expression für Adiponektin, VEGF, IL-6 und TNF-alpha gemessen.

Diese Arbeit beschäftigt sich erstmalig mit dem direkten Einfluss von Epo auf das Fettgewebe. Die bisherigen Forschungsergebnisse beziehen sich v. a. auf die Wirkung von subkutan oder intravenös appliziertem Epo auf den Serum-/Plasmaspiegel verschiedener Adipokine in vivo. In dieser Studie wurde die Wirkung von Epo auf humanes Fettgewebe in vitro untersucht. Da die meisten Adipokine im Fettgewebe nicht

allein von den Adipozyten, sondern vor allem auch von den sog. *non-fat cells*, wie Fibroblasten, Monozyten oder Makrophagen, gebildet werden [42], wurde in dieser Studie anstelle einer reinen Adipozytenkultur eine Fettgewebekultur durchgeführt [43]. Da die Stoffwechselaktivität des menschlichen Fettgewebes in Abhängigkeit von der Lokalisation von unterschiedlicher Ausprägung ist, muss zwischen dem viszeralen und subkutanen Fettgewebe unterschieden werden.

Beim subkutanen Fettgewebe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression der untersuchten Adipokine. Lediglich beim subkutanen Fettgewebe adipöser Patienten ergab sich in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle eine Erniedrigung der Adiponektin mRNA-Expression, die allerdings nicht signifikant war. Beim viszeralen Fettgewebe führte die Inkubation mit Epo bei den Proben übergewichtiger Patienten zu einer signifikanten Reduktion der IL-6, TNF- α und VEGF mRNA-Expression. Bei viszeralem Fettgewebe normalgewichtiger Patienten ergab sich für keine der untersuchten Adipokine eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression.

Wie oben erwähnt, wurden bei Dialyse-Patienten unter Epo-Therapie in einer Studie höhere Plasmaadiponektinspiegel gemessen als bei Dialyse-Patienten ohne Epo-Therapie. [14][28] Dies lässt die Vermutung zu, dass die Adiponektin-Sekretion von Adipozyten durch Epo stimuliert wird. Die vorliegende Arbeit konnte allerdings keine erhöhte Adiponektin-Sekretion im Fettgewebe unter Epo-Inkubation nachweisen. Es deutete sich vielmehr eine leichte Erniedrigung der Adiponektin-Sekretion bei adipösen Patienten im subkutanen Fettgewebe an, die allerdings nicht signifikant war. Eine andere Studie zeigte, dass Patienten mit CNI zwar erhöhte Adiponektin-Spiegel im Vergleich zu gesunden Patienten haben, im Gegensatz dazu die Adiponektin-Genexpression bei diesen Patienten aber herunterreguliert ist. [44] Ursache für die erhöhten Adiponektin-Spiegel ist hierbei am ehesten die verminderte Clearance-Funktion beim Nierenversagen. Wenn man davon ausgeht, dass die erhöhten Adiponektin-Spiegel bei Dialyse-Patienten nicht auf eine gesteigerte Adiponektin mRNA-Expression, sondern auf eine verminderte Ausscheidung über die Niere zurückzuführen ist, könnte man eine negative Feedback-Reaktion auf die erhöhten Adiponektin-Spiegel vermuten. Wir wissen nicht, wie Epo in diesen Mechanismus

eingreift. Aber da Epo die Nierenfunktion verbessert, wäre ein überschießender Anstieg der Adiponektin mRNA-Sekretion als Reaktion auf wieder fallende Adiponektin-Spiegeln aufgrund verbesserter Clearance-Funktion denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde allein der Einfluss von Epo auf das Fettgewebe in vitro untersucht. Hier zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Adiponektin mRNA-Expression durch Epo.

Auch wenn Epo nicht für eine Senkung der Adiponektin mRNA-Sekretion sorgt, wäre ein potenzieller Einsatz zur endothelprotektiven Therapie denkbar. Nicht die Höhe der antiinflammatorischen Adipokine an sich, sondern vielmehr das Verhältnis von pro- zu antiinflammatorischen Zytokinen scheint für die Entwicklung einer Atherosklerose ausschlaggebend zu sein. Auch die Senkung der proinflammatorischen Adipokine (IL-6, TNF- α und VEGF) würde das Verhältnis zugunsten des antiinflammatorischen Adipokin Adiponektin verschieben.

Beim viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Patienten zeigt diese Studie eine signifikante Reduktion der IL-6 mRNA-Expression nach Inkubation mit Epo. Auch für TNF-alpha zeigt sich nach 48 h bzw. 72 h unter Epo-Inkubation beim viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Patienten eine signifikante Senkung der mRNA-Expression. Auch nach 24 h erzielt Epo in diesem Gewebe eine Reduktion der TNF- α mRNA-Expression, die allerdings nicht signifikant ist.

Die Konzentrationen der beiden proinflammatorischen Adipokine IL-6 und TNF- α sind bei fettleibigen Patienten höher als bei Normalgewichtigen. [8][24] Die erhöhte Expression dieser beiden Adipokine bei Patienten mit Adipositas bewirkt möglicherweise, dass Veränderungen der Expression hier leichter nachzuweisen sind. Adipositas geht mit einem erhöhtem Risiko für Atherosklerose einher. Eine Reduktion der erhöhten IL-6 und TNF- α -Sekretion im viszeralen Fettgewebe Übergewichtiger könnte möglicherweise zu einer Senkung des Atheroskleroserisikos führen.

In dieser Studie führt die Inkubation von viszeralem Fettgewebe mit Epo für 24 Stunden bei den Proben adipöser Patienten zu einer signifikanten Reduktion der VEGF mRNA-Expression. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Untersuchungen an Fettgewebekulturen normalgewichtiger Kinder. [45] Im Gegensatz dazu wurde die

VEGF mRNA-Expression im Tierversuch durch Epo heraufreguliert. [46] Andere Studien konnten wiederum keine Änderung der VEGF-Spiegel unter dem Einfluss von Epo nachweisen. [47][48] Möglicherweise kann eine Reduktion der VEGF-Expression das Atheroskleroserisiko reduzieren. In der Literatur gibt es Beispiele für eine Zunahme von VEGF unter dem Einfluss von Epo. [46][49] Allerdings liegen keine weiteren Daten über Fettgewebe unter Epo-Einfluss vor. VEGF wird abgesehen vom Fettgewebe in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert. Auch wenn Epo die VEGF-Expression in der vorliegenden Studie im viszeralen Fettgewebe hemmt, scheint es in anderen Geweben einen gegenteiligen Effekt zu haben. Es bleibt abzuwarten, ob die Reduktion der VEGF-Expression im viszeralen Fettgewebe unter Epo-Einfluss in Studien mit größerem Stichprobenumfang bestätigt werden kann.

Diese Studie zeigt eine Reduktion der mRNA-Expression von IL-6, TNF- α und VEGF im viszeralen Fettgewebe adipöser Patienten durch die Behandlung mit Epo. Die Adiponektin mRNA-Expression scheint von Epo unabhängig zu sein. Damit verändert sich das Verhältnis von anti- zu proinflammatorischen Adipokinen zugunsten des antiinflammatorischen und endothelprotektiven Adipokins Adiponektin. Somit scheint zumindest im viszeralen Fettgewebe das Milieu für die Entstehung bzw. das Fortschreiten einer Atherosklerose unter dem Einfluss von Epo ungünstiger zu sein als in unbehandeltem Fettgewebe. Da die untersuchten Adipokine – abgesehen von Adiponektin – außer vom Fettgewebe auch in erheblichem Maß von anderen Geweben sezerniert werden, müssen weitere Studien ergeben, ob sich der Einfluss von Epo dort ebenso auswirkt.

Aufgrund der begrenzten Anzahl des schwierig zu erhaltenden Untersuchungsmaterials beruhen diese Ergebnisse auf geringen Fallzahlen. Es bleibt abzuwarten, ob sie in Studien mit größerem Stichprobenumfang bestätigt werden können.

Diese Arbeit zeigt, dass Epo einen Einfluss auf die Adipokin-Expression hat. Die vorliegenden Ergebnisse am viszeralen Fettgewebe deuten darauf hin, dass Epo nicht nur der Korrektur der renalen Anämie dient, sondern durch Reduktion der Inflammation auch der Entstehung bzw. dem Fortschreiten einer Atherosklerose entgegenwirken

kann. Es bleibt abzuwarten, ob sich dieser Effekt in weiteren Untersuchungen bestätigt und therapeutisch nutzbar machen lässt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Erythropoietin (Epo) auf die Adipokin-Expression in humanem Fettgewebe untersucht. Epo hat bekannte antiatherogene Eigenschaften. Bislang wurde dies allein der Verbesserung der Mikrozirkulation bzw. Minderung der Hypoxie zugeschrieben. Wir vermuten, dass Epo darüber hinaus auch einen direkten Einfluss auf die Adipokinexpression im Fettgewebe hat und durch Reduktion der Inflammation über eine Beeinflussung der Adipokinproduktion einen Schutzfaktor vor der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der Atherosklerose darstellt. Während der Einfluss von Epo in dieser Studie keine Änderung der Adipokinexpression im Fettgewebe Normalgewichtiger bewirkte, zeigte sich im Fettgewebe Übergewichtiger eine Reduktion proinflammatorischer Adipokine. Nach Inkubation mit Epo kam es im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Patienten zu einer Reduktion der inflammatorischen Adipokine IL-6, TNF- α und VEGF. Die mRNA-Expression von Adiponektin änderte sich hier unter der Epo-Behandlung nicht. Im subkutanen Fettgewebe übergewichtiger Patienten führte die Inkubation mit Epo bei keinem der untersuchten Adipokine zu einer veränderten mRNA-Expression. Den untersuchten Adipokinen IL-6, TNF- α , VEGF und Adiponektin wird eine Rolle bei der Atherogenese zugesprochen. Während man von IL-6, TNF- α und VEGF annimmt, dass sie die Atherosklerose begünstigen, scheint Adiponektin einen Schutzfaktor vor Atherosklerose darzustellen. Bei der Atheroskleroseentstehung hat Inflammation eine große Bedeutung. Die unter Epo-Einfluss reduzierte mRNA-Expression von inflammatorischen Adipokinen im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Patienten kann Hinweis auf eine antiinflammatorische Wirkung von Epo sein. Durch diesen antiinflammatorischen Effekt könnte Epo einen Schutzfaktor vor der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der Atherosklerose darstellen. Diese Arbeit lässt erstmalig vermuten, dass Epo über die Verbesserung der Mikrozirkulation hinaus durch Reduktion inflammatorischer Adipokine auch ein antiatherogener Effekt zugesprochen werden kann.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Arcp 30	30 kDa adipocyte complement-related protein
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CP	Crossing Point
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EPO	Erythropoietin
FCS	fötale Kälberserum (engl. fetal calf serum)
G	Guanin
IL-6	Interleukin-6
KHK	Koronare Herzkrankheit
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rel. mRNA-Expression von Adiponektin im viszeralen Fettgewebe	22
Abb. 2: Rel. mRNA-Expression von Adiponektin im subkutanen Fettgewebe	23
Abb. 3: Rel. mRNA-Expression von IL-6 im viszeralen Fettgewebe	25
Abb. 4: Rel. mRNA-Expression von IL-6 im subkutanen Fettgewebe	26
Abb. 5: Rel. mRNA-Expression von TNF- α im viszeralen Fettgewebe	27
Abb. 6: Rel. mRNA-Expression von TNF- α im subkutanen Fettgewebe	29
Abb. 7: Rel. mRNA-Expression von VEGF im viszeralen Fettgewebe	30
Abb. 8: Rel. mRNA-Expression von VEGF im subkutanen Fettgewebe	32

9 Literaturverzeichnis

- [1] Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C (2006) Inflammation and atherosclerosis *Annu Rev Pathol* 1:297-329
- [2] Kahn CR. (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43(8): 1066-1084
- [3] Hamann A, Münzberg H, Algenstaedt P, Tafel J. (2001) Molecular principles of obesity. *Herz* 26(3): 178-184
- [4] Kahn BB, Flier JS (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481
- [5] Havel PJ (2002) Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 13:51-9
- [6] Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49(10):1015-26
- [7] Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology* 64:355-365
- [8] Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B (2002) Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? *Kidney International* 61:S103-108
- [9] Matsumoto T, Mugishima H (2006) Signal Transduction via Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors and Their Roles in Atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 13:130-135
- [10] Stenvinkel P (2003) Anaemia and inflammation: what are the implications for the nephrologist? *Nephrol Dial Transplant* 18 [Suppl 8]: viii17-viii22
- [11] Kadowaki T, Yamauchi T (2005) Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocrine Reviews* 26(3):439-451
- [12] Locatelli F, Conte F, Marcelli D (1998) The impact of haematocrit levels and erythropoietin treatment on overall and cardiovascular mortality and morbidity—the experience of the Lombardy Dialysis Registry. *Nephrol Dial Transplant* 13:1642-1644

- [13] Anders H-J (2005) Chronische Niereninsuffizienz. *Med Klin* 100:714-21(Nr.11)
- [14] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonnano G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) Adiponectin, Metabolic Risk Factors, and Cardiovascular Events among Patients with End-Stage Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 13(1):134-141
- [15] Beckmann JA, Creager MA, Libby P (2002) Diabetes and atherosclerosis. Epidemiology, pathophysiology and management. *JAMA* 287(19):2570-2581
- [16] Arici M, Walls J (2001) End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: Is C-reactive protein the missing link? *Kidney International* 59:407-414
- [17] Ross R (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2):115-126
- [18] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G (2003) Inflammation and Atherosclerosis in End-Stage Renal Disease. *Blood Purif* 21:29-36
- [19] Stern MP (1995) Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* 44:4369-374
- [20] Kimura K, Hashiguchi T, Deguchi T, Horinouchi S, Uto T, Oku H, Setoyama S, Maruyama I, Osame M, Arimura K (2007) Serum VEGF-As a prognostic factor of atherosclerosis *Atherosclerosis* 194 :182-188
- [21] Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrin Rev* 21:697-738
- [22] Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E (2006) Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2(4) :367-73
- [23] Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (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):2273-2282
- [24] Wiecek A, Kokot F, Chudek J, Adamczak M (2002) The adipose tissue-a novel endocrine organ of interest to the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 17:191-195
- [25] Mora S, Pessin JE (2002) An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* 18:345-356

- [26] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
- [27] Zyriax B-C, Algenstaedt P, Hess UF, Schöffauer M, Bamberger C, Boeing H, Windler E (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* doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.033
- [28] Zepf K, Voelker C, Westphal M, Müller-Wiefel D (2004) Does serum adiponectin (ADPN) prevent early arteriosclerosis in children with chronic renal failure. *Pediatric Nephrology* 19(9):C149
- [29] Rega G, Kaun C, Demyanets S, Pfaffenberger S, Rychli K, Hohensinner PJ, Kastl SP, Speidl WS, Weiss TW, Breuss JM, Furnkranz A, Uhrin P, Zaujec J, Zilberfarb V, Frey M, Roehle R, Maurer G, Huber K, Wojta J (2007) Vascular Endothelial Growth Factor is Induced by the Inflammatory Cytokines Interleukin-6 and Oncostatin M in Human Adipose Tissue In Vitro and in Murine Adipose Tissue In Vivo. (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1587-1595
- [30] Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S (2006) Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters* 580:2879-2887
- [31] Matsuda T, Hirano T (1990) Interleukin 6 (IL-6). *Biotherapy* 2 :363-373
- [32] Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R (1999) Association of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 106:506-12
- [33] Hsu CY, McCulloch CE, Curhan GC (2002) Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency among adults in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Soc Nephrol* 13:504-10
- [34] Fliser D, Bahlmann FD, deGroot K, Haller H (2006) Mechanisms of Disease: erythropoietin-an old hormone with a new mission? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(10):563-72
- [35] Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Fliser D (2004) Erythropoietin: is it more

- than correcting anaemia? *Nephrol Dial Transplant* 19: 20-22
- [36] Brines M, Cerami A (2006) Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: Biology and clinical promise. *Kidney Int* 70(2):246-50
- [37] Pfeilschifter J, Huwiler A (2004) Erythropoietin Is More than Just a Promoter of Erythropoiesis. *J Am Soc Nephrol* 15:2240-2241
- [38] Jelkmann W (2006) Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 78:183-205
- [39] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ (1998) Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 32[5 Suppl 3]:S112-S119
- [40] Shik J, Parfrey PS (2005) The clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(6):550-557
- [41] Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlichs C, Achenbach S, Nonnast-Daniel B, Amann K (2005) Atherosclerosis and Vascular Calcification in Chronic Renal Failure. *Kidney Blood Press Res* 28:280-289
- [42] Fain JN (2006) Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. *Vitamins and Hormones* 74:443-477
- [43] Algenstaedt P, Rosenblatt N, Kolb I, Krützelmann A, Schwarzloh B, Böttcher A, Wiesner L, Greten H, Hansen-Algenstaedt N (2004) A New Model of Primary Human Adipocytes Reveals Reduced Early Insulin Signalling in Type 2 Diabetes. *Horm Metab Res* 36:531-537
- [44] Marchlewska A, Stenvinkel P, Lindholm B, Danielsson A, Pecoits-Filho R, Lönnqvist F, Schalling M, Heimbürger O, Nordfors L (2004) Reduced gene expression of adiponectin in fat tissue from patients with end-stage renal disease. *Kidney International* 66:46-50
- [45] Möller K, Bieschke D, Schwarzloh B, Friedrich M, Algenstaedt P, Müller-Wiefel DE (2007) Expression of Adipocytokines in Human Adipose Tissue by Erythropoiesis Stimulating Factor (ESF). *Pediatr Nephrol* 22:1445
- [46] Westenbrink BD, Lipšic E, van der Meer P, van der Harst P, Oeseburg H, Du Marchie Sarvaas GJ, Koster J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2007) Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. *Eur Heart J* 28:2018-2027

-
- [47] Ocaña A, Rodriguez-Barbero A, Pericacho M, Bellido L, Seijas R, Lopez R, Delgado C, de Prado DS, Cruz-Hernandez JJ, Lopez-Novoa JM (2007) Human recombinant erythropoietic agents do not induce changes in circulating levels of endoglin and vascular endothelial growth factor in anemic cancer patients. *Cancer Lett* 255(1):71-6
- [48] Aguilera A, Selgas R (2004) Effect of recombinant human erythropoietin on inflammatory status in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19[Suppl 5]:v46-v53
- [49] Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, Gonzales Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S, Caramelo C (1998) Role of Vascular Endothelial Growth Factor on Erythropoietin-Related Endothelial Cell Proliferation. *J Am Nephrol* 9:1998-2004
- [50] Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 2007
- [51] Wheeler DC (1996) Cardiovascular disease in patients with chronic renal failure. *Lancet* 348:1673-1674

10 Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. Petra Algenstaedt für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Agnes Wieczorek danke ich für die gute Zusammenarbeit und großartige Unterstützung im Labor.

Bei Dr. Kristina Möller und Dr. Jonas Hector bedanke ich mich für viele hilfreiche Ratschläge und Anregungen.

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

Meinen Mitdotorandinnen Diana Bieschke und Justyna Celer danke ich für die Einarbeitung und gute Zusammenarbeit.

Den Kollegen von der anästhesistischen und chirurgischen Abteilung, allen voran Herrn Dr. O. Mann und Herrn Dr. T. Strate, danke ich für die gute Kooperation und Hilfe bei der Probengewinnung.

Claudia Mientki danke ich fürs Korrekturlesen, wofür auch Stefan Pichel erheblicher Dank gebührt, dem ich darüber hinaus auch für die vielen Hilfestellungen in Sachen Computer danke.

Besonderer Dank geht an meine Familie. Besonders meinen Eltern danke ich für die – insbesondere auch finanzielle – Unterstützung während der Doktorarbeit und des gesamten Studiums.

11 Lebenslauf

	<p>Cora Langenbuch 07.10.1977 Hamburg</p> <p>Fischergrube 72 23552 Lübeck</p>
seit 04/2008	<p>Klinische Weiterbildung Assistenzärztin, Innere Medizin Sana Kliniken Lübeck</p>
<p>seit 01/2007</p> <p>01/2007 1999-2006</p>	<p>Studium der Humanmedizin Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe für Signaltransduktion, III. Medizinische Klinik, UKE Approbation Medizinstudium Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf</p>
<p>3. Tertial 2. Tertial 1. Tertial</p>	<p>Praktisches Jahr Dermatologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Chirurgie, AK Eilbek Innere Medizin, Ev. Amalie-Sieveking Krankenhaus</p>
<p>2004</p> <p>2003</p> <p>2002</p>	<p>Famulaturen Anästhesiepraxis Rechtsmedizin Innere Medizin Radiologie Dermatologie Innere Medizin</p>
<p>2004 1998 1994/95</p>	<p>Auslandsaufenthalte Famulatur in Cochabamba, Bolivien AuPair in Montreal, Kanada Austauschjahr in Iowa, USA</p>
<p>1997 1988-1997 1983-1988</p>	<p>Schulbildung Abitur in Hamburg Gymnasium St. Georg in Horn Grundschule Archenholzstraße</p>

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: _____