

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Über die Bedeutung des Circulating Wnt1 inducible signalling
pathway Protein 1 (WISP1) als Marker der Adipositas und seiner
Rolle in der Pathogenese Adipositas-assoziierter Erkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Tacke

aus Bad Soden im Taunus , Deutschland

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

1.1. ABSTRACT (English)	1
1.2. ABSTRACT (Deutsch)	2
2. EINFÜHRUNG	4
2.1 Aktueller Stand der Wissenschaft	4
2.2 Molekularbiologischer Hintergrund	4
2.3 Bisherige Forschungen und eigene Ziele	5
3. METHODIK	6
3.1 Untersuchte Kohorten	6
Kohorte I	6
Kohorte II	7
Kohorte III	7
3.2 Präanalytik und Analytik	8
3.3 Statistische Analysen	9
4. ERGEBNISSE	10
4.1 Methodenetablierung	10
4.2 Humane Studien	12
4.2.1 Messzuverlässigkeit an gesunden Probanden	12
4.2.2 Stabilität gegenüber hormonellen Einflüssen	13
4.2.3 Zirkulierendes WISP1 als prädiktiver Marker für Insulinresistenz	14
5. DISKUSSION	17
6. BASISCHARAKTERISTIKA	22
7. REFERENZEN	23
8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	26
9. PUBLIKATIONEN	27
9.1 Ausgewählte Publikation	27
9.1.1 Assessment of circulating Wnt1 inducible signalling pathway protein 1 (WISP-1)/CCN4 as a novel biomarker of obesity	27
9.2 Anteilserklärung an der ausgewählten Publikation	27
9.3 Druckexemplar der ausgewählten Publikation	29
9.4 Lebenslauf	30
9.5 Komplette Publikationsliste	31
10. DANKSAGUNG	32

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
AUC	area under the curve
BMI	body mass index
IR β	β - Insulin-Rezeptor
CCN	CYR61 + CTGF + NOV
CTGF	connective tissue growth factor
CAB	capture antibody
CD14	cluster of differentiation 14
CHO	carbohydrates
CPT1 α	carnitine palmitoyltransferase 1-alpha
CRY	cryptochrome
DAB	Detection Antibody
FFS	freie Fettsäuren
FOXO1	Forkhead box O1
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
HDL	high density lipoprotein
hSkMC	Human skeletal muscle cell
IFG	impaired fasting glucose
IGT	impaired glucose tolerance
IHL	intrahepatischer Fettanteil
IGF-1	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-lik growth factor binding protein
IL1B	interleukin 1-beta
LDL	low density lipoprotein
LF/HCD	low fat / high carbohydrate diet
LPL	lipoproteinlipase
LMCT	Liquid in meal tolerance test (Flüssig-Nahrungstest)
NGT	normal glucose tolerance
NOV	nephroblastoma overexpressed or CCN3
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PER	period
PKB	Protein kinase B
PPAR γ	peroxisome proliferator-acti.vated receptors gamma
PYY	peptide YY
p70S6K	p70S6 -Kinase
RNA	ribonucleic acid
mRNA	messenger RNA
ROR	retinoid-related orphan receptor
SAT	subcutaneous adipose tissue
siRNA	Small interfering RNA
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TSP-1	Thrombospondin-Typ 1

vWC
WISP1

von Willebrand-Faktor Typ C
Wnt1 inducible signalling pathway protein 1

1.1. ABSTRACT (English)

Aims/hypothesis: WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) is a novel adipokine inducing a pro-inflammatory response in macrophages *in-vitro* and shows upregulation in obesity. Preclinical observations suggested WISP1 as a potential candidate for novel obesity therapy mediating adipose tissue inflammation. Whether circulating levels of WISP1 in humans are altered in obesity and/or T2DM and in the postprandial state, however, is unknown. We aimed to assess circulating WISP1 levels a) in paired liquid meal test and euglycemic-hyperinsulinemic clamp (cohort I, $n=26$), b) in healthy individuals (cohort II, $n=207$) and c) in individuals with different stages of obesity and glucose tolerance (cohort III, $n=253$). We further examined whether WISP1 affects insulin signalling in hepatocytes and muscle cells *in vitro*. **Methods:** Circulating plasma and serum WISP1 concentrations were measured using commercially available assays (Human WISP-1/CCN4 DuoSet ELISA). For the *in vitro* experiments we incubated primary human skeletal muscle cells (hSkMCs) and murine AML12 hepatocytes with WISP1 and insulin and then analysed insulin signalling by western blotting. **Results:** WISP1 levels were not influenced by changes of insulin and/or glucose. In healthy individuals, WISP1 was detectable in 13% of plasma samples with the intraclass correlation coefficient of 0.93 (95% CI: 0.84-0.96) and in 58.1% of the serum samples in the cohort III. Circulating WISP1 correlated positively with body mass index, body fat percentage, triglyceride levels, hip circumference and fatty liver index. No differences in WISP1 levels between individuals with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes were found. In hSkMCs) and murine AML12 hepatocytes recombinant WISP1 impaired insulin action by inhibiting phosphorylation of insulin receptor, Akt and its substrates and inhibited insulin-stimulated glycogen synthesis and suppression of gluconeogenic genes. **Conclusions/interpretation:** WISP1 is a recently identified adipokine, whose circulating concentrations are unaltered in type 2 diabetes but correlate significantly with lipid profiles and anthropometrical obesity markers. Furthermore WISP1 could intensify obesity-

progress and adipocyte hypertrophy by enhancing anabolic insulin-action. In healthy individuals, WISP1 levels are more often below the detection limit pointing WISP1 as a possibly early diagnostic biomarker of obesity.

1.2. ABSTRACT (Deutsch)

Hintergrund/Ziele: WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) wurde in jüngsten Studien als neuartiges Adipokin identifiziert, welches bei Makrophagen *in vitro* eine Entzündungsreaktion hervorruft und bei Menschen mit Adipositas assoziiert ist. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte auch erhöhte zirkulierende Konzentrationen des WISP1 bei Schwangeren mit Übergewicht und Gestationsdiabetes. Unklar blieb bislang, inwieweit auch Menschen mit Insulinresistenz, einem der zentralsten Pathomechanismen bei metabolischer Dysfunktion, erhöhte WISP1 Konzentrationen im Blut aufweisen. Derzeit lässt die Datenlage keine zuverlässigen Schlüsse hinsichtlich kurzfristiger hormoneller Effekte auf WISP1-Spiegel zu. Im Hinblick auf diese Fragestellung wurden systemische WISP1 Konzentrationen gemessen: 1) im Rahmen eines gepaarten Flüssignahrungstests und euglykämischen-hyperinsulinämischen Glukoseclamptests (Kohorte I, $n=26$) sowie 2) bei gesunden Probanden ohne Vorerkrankungen (Kohorte II, $n=207$) und 3) Probanden mit normaler und gestörter Glukosetoleranz (Kohorte III, $n=253$). . Im Rahmen weiterer *in vitro* Experimente sollte die Insulin-Signalkette in murinen Leberzellen und humanen Muskelzellen untersucht werden **Methodik:** Alle Proben wurden mit kommerziell verfügbaren Immunoassays (Human WISP-1/CCN4 DuoSet ELISA) ausgewertet. Für die *In-vitro* Experimente inkubierten wir primäre murinen Leberzellen und humanen Muskelzellen mit WISP1 und Insulin und maßen wichtige Aktivitätsmarker der Insulin-Signalkaskade mittels western blotting. **Ergebnisse:** In unseren Messungen konnte kein Effekt kurzfristiger Insulin-

bzw. Glukosegabe auf die systemische WISP1 Konzentrationen beobachtet werden. Bei lediglich 13% aller Plasmaproben gesunder Probanden konnte eine Konzentration oberhalb des unteren Detektionslimits bei einem intraklassen-Korrelationskoeffizienten von 0,93 (95% Konfidenzintervall: 0,84-0,96) gemessen werden. Dagegen konnte in Kohorte III in bis zu 58,1% aller Serumproben eine messbare Konzentration detektiert werden. In der statistischen Auswertung wurden Korrelationen mit Body-Mass-Index, prozentuaem Körperfett, Triglyzeridspiegeln, Hüftumfang sowie einem Fettleberindex beobachtet. Unterschiedliche WISP1-Konzentrationen hinsichtlich der Glukosetoleranz bei Probanden der Kohorte III konnten nicht nachgewiesen werden. In humanen Muskelzellen und murinen Leberzellen erniedrigte die ektopische WISP1-Gabe die Insulin-Signaltransduktion durch Blockade der Phosphorylierung des Membranrezeptors, Akt und dessen Downstream-Targets und verringerte darüber hinaus die Glyconsynthese und Gluconeogenese. **Interpretation:** WISP1 ist ein neuartiges Adipokin, welches in unseren Studien zwar keinen Zusammenhang mit Diabetes Typ 2, jedoch eine Assoziation mit Blutfettwerten und biometrischen Parametern aufweist. WISP1 unterstützt die Entstehung der Insulinresistenz und verhindert die Insulinwirkung an der insulin-abhängigen Geweben und könnte somit bei einem Progress von Fettleibigkeit und adipozytärer Hypertrophie einen relevanten Einfluss haben. Bei gesunden Probanden sind WISP1-Konzentrationen im Allgemeinen zu niedrig für eine klinische Bestimmung. Dies unterstreicht dessen Rolle als Krankheitsmarker und könnte hinsichtlich der Diagnostik in der Sekundärprävention von Nutzen sein.

2. EINFÜHRUNG

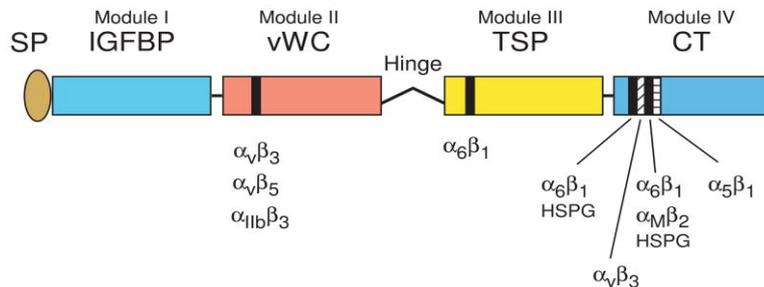
2.1 Aktueller Stand der Wissenschaft

Wnt-inducible signaling pathway protein-1 (WISP1, auch bekannt als CCN4) gehört zur Familie der CCN Proteine, welche als extrazellulär-Matrixproteine ein Endprodukt des WNT-Signalwegs darstellen [1]. CCN Proteine wurden unter anderem bei der Regulation der Mitose, der Zelladhäsion, des Apoptose und der Produktion von extrazellulär-Matrix sowie der Migrationsförderung diverser Zelltypen beschrieben. In diesem Zusammenhang sind sie für Prozesse wie Zellproliferation, kardiovaskuläres Risiko und auch der Entwicklung von malignen Neoplasien von fundamentaler Bedeutung [2]. Andere Vertreter der CCN-Familie wie beispielsweise etwa das WISP2- oder das NOV- Protein sind bereits in der Pathogenese von Fettleibigkeit und Übergewicht assoziierten Krankheiten identifiziert worden [3, 4]. Ähnlich wie die Vertreter der CCN-Familie fördert WISP1 (CCN 4) das embryonale Wachstum, Wundheilung sowie Gewebsregeneration [1]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass pathologische Umbauprozesse wie Osteoarthritis, Fibrose und Krebserkrankung ebenfalls auf eine gestörte WISP1 Expression zurückzuführen sind [5-7]. WISP1 scheint nach der Auffassung einiger Autoren die Verschiebung des Gleichgewichts von epitheliale in mesenchymales Alveolargewebe zu triggern, indem es die Synthese von extrazellulär-Matrix Komponenten in lokalen Fibroblasten anregt [7]. Bis auf seine fibrosierende Komponente ist die Wirkung und Funktion von WISP1 allerdings noch sehr schlecht verstanden und bedarf weiterer Forschung.

2.2 Molekularbiologischer Hintergrund

Wie die meisten anderen CCN-Familienvertreter enthält WISP1 (Fig. 1) 4 Untereinheiten, im nachfolgenden Module genannt, welche auch in anderen extrazellulär-Matrixproteinen häufig vorkommen. Modul 1 ist identisch mit der Bindungsdomäne des IGF-1. Modul 2 ist eine von Willebrand-Faktor Typ C- Untereinheit. Modul 3 stellt eine Thrombospondin-Typ 1 Brücke dar,

welche eine wichtige Bedeutung bei Zelladhäsion besitzt. Das 4. Modul besitzt eine C-terminale Domäne [8].



Figur 1 Schematischer Aufbau von CCN-Proteinen, Struktur und Lokalisation ihrer Integrin-Bindedomänen. Spezifische Binderegionen für zahlreiche Integrine und HSPGs wurden für CCN 1 und CCN 2 identifiziert [16].

Im Zusammenhang mit oben genannten Pathologien konnten auch strukturelle Aberrationen des WISP1-Moleküls im Rahmen eines variablen Splicings identifiziert werden, allerdings steht die exakte Zuordnung von Molekülen zu Pathologien noch aus [9,10].

Rezeptoren des WISP1 Proteins wurden zwar identifiziert, es wird allerdings vermutet, dass WISP1 in der Lage ist, in Kombination mit anderen Extrazellulär-Matrixproteinen wie beispielsweise Decorin, Biglycan und anderen Integrienen seine Wirkung zu entfalten [11,12].

2.3 Bisherige Forschungen und eigene Ziele

In unseren bereits publizierten Studien konnten wir zeigen, dass WISP1 als Adipokinin in Erscheinung tritt. Zum Teil selbst von Adipozyten in der Differenzierungsphase produziert, regt es die Entzündungsprozesse im Fettgewebe durch Makrophagenstimulation an. Interessanterweise stieg die adipozytäre WISP1-Sekretion mit der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Präadipozyten und Adipozyten an. Unsere kürzlich veröffentlichte Studie zeigte eine Herunterregulierung der hWISP1-mRNA in Fettgewebssproben nach einer Gewichtsreduktion [13]. In Fettgewebssproben schwangerer Patientinnen, welche unter Gestationsdiabetes (Diabetes Typ 4) litten, wurden signifikant höhere hWISP1-mRNA festgestellt [14]. Ziel unserer Arbeit war es, die Messbarkeit von hWISP1 an standardisiert gewonnenen Blutproben der Kohorten mit gesundem Probanden als auch an Patienten mit unterschiedlichen Stufen der gestörten

Glukosetoleranz zu überprüfen. Ebenfalls sollte die tatsächliche Messbarkeit in unterschiedlichen Aufbereitungsweisen von Blutproben gegenübergestellt werden, um ein geeignetes Messmedium für die Bestimmung von hWISP1 zu definieren. In in vitro Untersuchungen sollte einerseits der in vorangegangenen Studien beobachtete Zusammenhang von Insulin und WISP1 [13] als auch die Wirkung von WISP1 auf molekularer Ebene durch die Quantifizierung intrazellulärer Proteinphosphorylierungen zu messen.

3. METHODIK

3.1 Untersuchte Kohorten

Zirkulierendes hWISP1 wurde in Blutproben von insgesamt drei unabhängigen Kohorten unterschiedlicher Studien von Probanden aus der Umgebung von Berlin-Brandenburg, Deutschland, untersucht. Die Studienprotokolle wurden durch die Ethikkommission der Universität Potsdam, der Charité Universitätsmedizin Berlin und dem ethischen Komitee der Arzneimittelbehörde Brandenburg Deutschland, genehmigt. Alle Studien wurden aus- und durchgeführt unter Wahrung der Prinzipien der Helsinki-Erklärung. Dabei wurde allen Studienteilnehmern vor- und während der Studie ausreichende Informationen bezüglich des Studienverlaufs und möglicher Risiken bereitgestellt und eine schriftliche Einwilligungserklärung der Studienteilnehmer vor Studienbeginn eingefordert.

Kohorte I

Sechszwanzig Probanden mit unterschiedlichen Stadien der Glukosetoleranz, hierunter fünf mit normaler Glukosetoleranz (NGT), elf mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) bzw. erhöhtem Nüchternblutzucker (impaired fasting glucose, IFG) sowie zehn Probanden mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) wurden aus unserer zuvor angelegten Acarbose-Studie (ISRCTN40281673) ausgewählt [15]. Im Rahmen dieser Studie führten alle Probanden zwei verschiedene Experimente durch:

- 1) Einen zweistündigen hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp (EC) nach 10-stündiger Nahrungskarenz. Hierbei wurde die mittlere kapilläre Blutglukosespiegel bei konstant 5,5 mmol/l angesetzt, mit variabler Menge einer 20%-iger Glucoselösung (Serag Wiessner, Naila, Germany)

und konstanter Insulin-Infusion ($100 \text{ mU} \times \text{m}^2 \text{ Körperoberfläche} \times \text{min}^{-1}$, Actrapid, Novo Nordisk, Denmark) begleitet.

2) Darüber hinaus wurde bei allen Probanden der Acarbose Studie ein standardisierter Mahlzeitentest (LMCT, Biosorb Energie®; Pfrimmer Nutricia, Deutschland; 77.6 g Kohlenhydrate, 22.3 g Fett, 24 g Proteine, 600 kcal per 400 ml) durchgeführt. In dieser Kohorte wurden ausschließlich Serumproben, welche im Rahmen anderer Messungen bis zu dreimal aufgetaut wurden, verwendet.

Kohorte II

207 als gesund begutachtete Probanden (124 Frauen und 83 Männer) unter 64 Jahren wurden zufällig aus der Potsdamer Kohorte der europäisch-prospektiven Forschungsstudie „Gesundheit, Ernährung, Krebs“ (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition - EPIC) ausgewählt. Diese Studie wurde zu einer weiteren Klärung des Zusammenhanges zwischen Ernährung, Krebs sowie anderen chronischen Erkrankungen initiiert, um die Qualität von Empfehlungen für eine gesundheitsfördernde Ernährung zu verbessern [16]. Ausschlusskriterien für Probanden waren neben kardialen Vorerkrankungen (Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Kardiomyopathien sowie vaskuläre Ereignisse) in der Vorgeschichte eine eingeschränkte Mobilität sowie die Einnahme von β -Blockern. Blutdruckwerte jenseits von 180 mmHg systolisch sowie 110 mmHg diastolisch galten ebenfalls als ein Ausschlusskriterium. An zwei Terminen im Abstand von vier Monaten wurden Blutproben entnommen. Die 1. Blutentnahme fand im Zeitraum von Oktober 2007 bis März 2008 statt, die 2. Blutentnahme im Zeitraum vom Februar bis Juli 2008. Alle Blutproben wurden in Form von EDTA Plasma bei -80° eingefroren.

Kohorte III

253 Probanden mit unterschiedlichen Stadien der Glukosetoleranz (51 Probanden mit NGT, 184 Probanden mit IFG/IGT und 18 Probanden mit T2DM) wurden aus zwei Interventionsstudien ausgewählt (NCT:00579657 and NCT: 01681173). Hierbei wurde bei der Messung ausschließlich auf Proben im 2. bzw. 3. Auftauzyklus der Anfangsmessung (vor Beginn der Studie) zurückgegriffen. Für die hWISP1 Messungen wurden ausschließlich basale Proben vor dem jeweiligen Studienstart ausgewählt. Die Zusammensetzung von Körperfett und fettfreier Masse wurde durch Luftverdrängungsplethysmographie (BOD POD®, COSMED, Italy) bestimmt. Magnetresonanztomografien bei 1,5 Tesla Ganzkörpertomografie (Magnetom Avanto, Siemens Healthcare, Germany) wurden zur Quantifizierung viszeraler Fettdepots (VAT) und

intrahepatischem Fettanteil (IHL) herangezogen, um die tatsächliche Fettverteilung im Körper genauer definieren zu können.

In Vitro Versuche

Humane skelettale Muskelzellen (hSkMCs) wurden aus Satellitenzellen aus Muskelbiopsien unterschiedlicher Spender differenziert, murine Leberzellen (alpha mouse liver 12 - AML 12) wurden aus C57BL/6-Mäusen isoliert und in DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 48 h bebrütet. Vor der Inkubation mit WISP1 wurden alle Zellen in Medium ohne Insulin, bzw. Serum für 4h inkubiert. Hiernach erfolgte eine einmalige Insulin-Stimulation mit 24-stündiger WISP1-Exposition. Quantitative Messungen der Phosphorylierungen erfolgten in drei bis fünf unterschiedlichen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender.

3.2 Präanalytik und Analytik

Alle venös gewonnenen Blutproben wurden sofort zentrifugiert und umgehend bei -80 °C bis zum Analysezeitpunkt eingefroren. Plasmaproben im Rahmen der Methodenetablierung wurden mithilfe dreier Gerinnungsinhibitoren erstellt, welche oft in der klinischen Routine verwendet werden: EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) Plasma 1,6mg/mL, Citrat im Verhältnis 1:10 sowie Lithium Heparin 16 IE/ml Blut.

In den Humanstudien wurden Routinemarkers im Serum bei Erstmessung bestimmt (ABX Pentra 400, Horiba, Japan). Die kapilläre Blutglukosekonzentration wurde mittels der Oxidasemethode eines Glukose-Analyzers bestimmt (Dr. Müller Glucose Analyzer, Deutschland). HbA_{1c} wurde mithilfe eines Hi-Auto A1C HA-8140 Systems bestimmt (Menarini Diagnostics, Deutschland) und die Insulinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch kommerziell erhältliche Immunosassays (Insulin ELISA, Mercodia AB, Schweden).

Die Konzentrationsbestimmung von hWISP1-Spiegeln im Serum/Plasma erfolgte mithilfe eines Sandwich-ELISA von der Firma R&D Systems, Deutschland. Zur Erzeugung eines authentischen Umgebungsmediums wurde sowohl bovines als auch humanes Serumalbumin verwendet und auf 96-well high-binding Assayplatten (82.1581, Sarstedt, Deutschland) vermessen. Der Sandwich-ELISA setzt sich aus einem monoklonalen Capture-Antikörper (CAB) und einem polyklonalen Detektions-Antikörper (DAB) zusammen. Für jede Platte wurde eigens eine in Doppelbestimmung angefertigte Verdünnungsreihe erstellt, welche die Grundlage für die Konzentrationsberechnungen nach dem Verfahren einer 4 Parameterberechnung (4-PL bestFit) bildete. Das untere Detektionslimit des Assay wird vom Hersteller mit 30 pg/μL angegeben, konnte aber im Rahmen einer erweiterten Etablierung in unserem Labor bis 15 pg/mL ohne

nennenswerte Genauigkeitseinbußen festgelegt werden. Der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 4,3 % - 23,6 %, während der Intraassay-Variationskoeffizient bei 9,5 % - 17,6 % für Serum und 6,9 % - 17,4 % für EDTA Plasma lag.

Die Analyse der Insulin-Signalkaskade erfolgte via Western-Blot. Hierbei wurden antikörpervermittelte quantitative Analysen des phosphorylierten/nicht-phosphorylierten β -Insulin-Rezeptors (IR β), der Protein kinase B (PKB), glycogen synthase kinase, forkhead box O1 (FOXO1), p70S6-kinase (), IRS1 and IRS2, α - tubulin and GAPDH nach Herstellerangaben gemessen. Die Berechnung der Glykogensynthese in humanen Muskelzellen berechneten wir durch die Aufnahme von D-[U-14C] Glukose in Glykogen.

3.3 Statistische Analysen

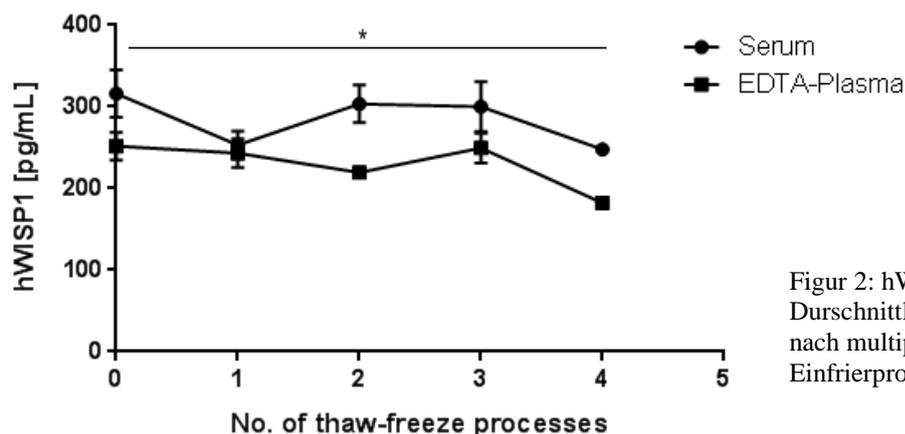
Ergebnisse werden, wenn nicht anders erwähnt, als \pm der Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ festgelegt. Das Homeostasis model assessment (HOMA-IR - http://flexikon.doccheck.com/de/Homeostasis_model_assessment) wurde aus einem gleichzeitig gemessenen Nüchtern-Insulinwert sowie einem Nüchternglukosewert wie folgt errechnet: Nüchterninsulinwerte [μ U/ml] x Nüchternglukose in [mM] / 22.5. Der Fettleber-Index (FLI) wurde aus den Parametern: Serum Triglyceride, BMI, Hüftumfang sowie der Gamma GT, wie folgt errechnet: $[GGT, FLI = (e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745}) / (1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745}) * 100]$ [17] und diente als nicht invasiver Index zur Bestimmung des Leberfettgehalts bei all jenen Probanden, bei denen die MRT Datenlage nicht ausreichend war. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels des Kolmogorov–Smirnov Tests überprüft. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden Unterschiede zwischen den Gruppen durch den studentischen t-Test berechnet und im Fall einer Nichtnormalverteilung mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Dasselbe galt für Korrelationsanalysen nach Pearson bzw. Spearman. Um Unterschiede im Bereich von repetitiver Messung der Blutglukose, Insulinspiegel bzw. der hWISP1-Konzentrationen zu erkennen, wurde auf die ANOVA-Varianzanalyse zurückgegriffen. Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient (ICC) wurde im Rahmen der EPIC- Studie zum Nachweis von Vergleichbarkeit und zum Beweis einer ausreichenden Mittel- bis langfristigen Stabilität des hWISP1-Moleküls verwendet. Zur Bestimmung der Interrater-Reliabilität wurde die Varianz zwischen verschiedenen Ratings in Bezug auf dasselbe Messobjekt (= Beobachtungsgegenstand, Fall, Person bzw. Merkmalsträger usw.) verglichen mit der über alle Ratings und Messobjekte entstandenen Varianz [18,19,20]. Exzellente (ICCs ≥ 0.75), gute (ICC: 0.74-0.60), durchschnittliche (ICC: 0.59-0.40) und

mangelhafte ($ICC < 0.40$) Reliabilitätsmaße wurden festgelegt. Eine schrittweise lineare Regression wurde durchgeführt, um die Abhängigkeit der gemessenen hWISP1-Konzentrationen von möglichen Fettleibigkeits-Markern zu analysieren. Die gesamte Statistik erfolgte sowohl mit SAS (Version 9.4, Enterprise Guide 6.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), als auch mit SPSS 20.0/21.0 (USA).

4. ERGEBNISSE

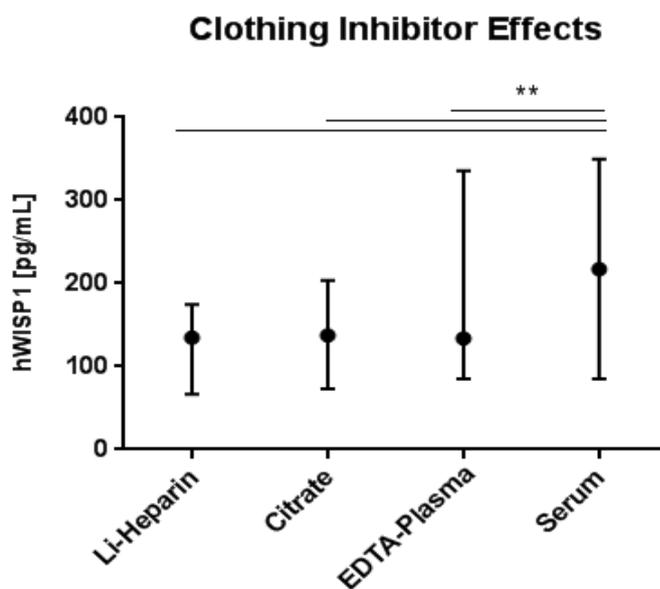
4.1 Methodenetablierung

Laut Hersteller ist das humane WISP-1/CCN4 DuoSet ELISA (R&D Systems, Deutschland) bereits validiert für Zellkulturüberstände, Serum- und Plasmaproben. Darüber hinaus führten wir zusätzliche Etablierungsversuche durch, welche uns im Vorfeld mögliche Hinweise über eventuell auftretende Abweichungen der Messergebnisse in den Blutproben der Humanstudien geben sollten. An erster Stelle stand die Stabilität des hWISP1 Moleküls gegenüber Temperaturschwankungen, welche etwa beim Auftauen und Einfrieren einer Probe entstehen. Hierzu wurde frisch entnommenes und aufbereitetes Serum verschiedener freiwilliger Probanden ($n = 10$) gepoolt und jeweils ein Teil bis zu viermal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden alle Proben in demselben Assay vermessen. Interessanterweise konnten wir bis zum dritten Auftau- und Einfrierzyklus keine signifikante Konzentrationsverminderung des hWISP1 im Serum messen, jedoch zeigten sich sinkende Konzentrationen ab dem vierten Auftau- und Einfrierzyklus ($p < 0.05$). Diese Unterschiede konnten wir sowohl im Poolserum als auch im Poolplasma nachweisen (Figur 2).



Figur 2: hWISP1-Poolserum/Poolplasma Durchschnittliche hWISP1 Konzentrationen nach multiplen Auftau- und Einfrierprozessen

Des Weiteren sollte das am besten geeignete Medium zur Bestimmung der hWISP1-Konzentration eruiert werden. Hierzu verglichen wir Serum- und Plasmaproben mit den drei Gerinnungsinhibitoren (GI) individuell als auch wieder im gepoolten Vergleich. Der Vergleich der Serumproben von 14 Personen der Kohorte 3 zeigte signifikant höhere hWISP1-Konzentrationen als Proben, welche mit anderen Gerinnungsinhibitoren versetzt wurden ($p=0.0001$ vs. EDTA/Citrat Plasma und $p=0.01$ vs. Lithium Heparin Plasma im Wilcoxon test). Diesen Effekt konnten wir sowohl innerhalb der Proben eines Individuums als auch in der mittleren Konzentration der Poolprobe beobachten (Figur 3).

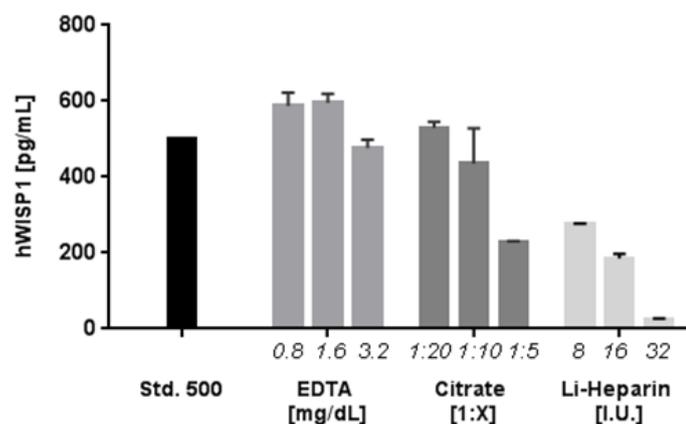


Figur 3: Gerinnungsinhibitoren im Vergleich: Proben mit EDTA/Citrat Plasma und Lithium Heparin Plasma. Mediane \pm Interquartilsabstände

Zuletzt wollten wir die prozentuale Wiederherstellung (Recovery) von hWISP1 im Spike-Modell untersuchen. Hierzu wurden Serum- und Plasmaproben (mit allen 3 GI) mit einem Spiking von 1000 pg/ μ l des humanen rekombinanten WISP1-Protein versehen und vermessen. Hierbei konnten wir eine Wiederherstellung ($((\text{gespikter Wert} - \text{ungespikter Wert}) / (1000))$) für Serum von 81,3 %, 88,3 % für EDTA-Plasma, 49,4 % für Citrat-Plasma und nur 31,8 % für Lithium Heparin-Plasma zeigen. An dieser Stelle vermuteten wir einen Effekt der unterschiedlichen GI in Plasmaproben auf die hWISP1-Messbarkeit. Um dies zu bestätigen untersuchten wir Plasmaproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an GIs. Hierbei wurden künstlich in Reagenz (PBS 1x +

humanes Serumalbumin 1%) 50 %ige, 100 %ige, sowie 200 %ige Konzentration von Gerinnungsinhibitoren verwendet (0.8 mg/mL, 1.6 mg/mL, 3.2 mg/mL EDTA No: 02.1066, Sarstedt, Deutschland; 1:20, 1:10, 1:5 Citrat Verdünnung einer 32%igen stock solution No. 02.1067, Sarstedt, Deutschland; 8 I.E., 16 I.E., 32 I.E. Li-heparin No. 02.1065, Sarstedt, Deutschland) und im Anschluss mit 500 pg/µl rekombinantes WISP1 angereichert. Wir konnten weder signifikante Unterschiede zwischen angereicherter EDTA Reagenz zu Citrat Reagenz finden noch einen signifikanten Konzentrationsunterschied von EDTA-, bzw. Citratreagenz zu GI-freier Reagenz mit WISP1 Spiking 500 pg/µl. Bei Reagenzien, welche mit Lithium Heparin versetzt worden waren, konnten wir bereits bei 50 % der in der Laborroutine üblichen Konzentration von GI eine Verminderung des Ausgangswerts um 45 % feststellen. Bei 100 %iger, bzw. 200%iger GI- Konzentration beobachteten wir eine Reduktion um 63 % bzw. 95 % (Fig. 4). Hier ließ sich eindeutig zeigen, dass Serumproben im Mittel die höchsten messbaren Konzentrationen aufwiesen und die Anwesenheit von Lithium-Heparin einen stark negativen Einfluss auf die Messbarkeit von hWISP1 in einer Probe hat.

Figur 4:
Gerinnungsinhibitoren im Vergleich: Proben mit EDTA/Citrat und Lithium Heparin Plasma in unterschiedlichen Konzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung



4.2 Humane Studien

4.2.1 Messzuverlässigkeit an gesunden Probanden

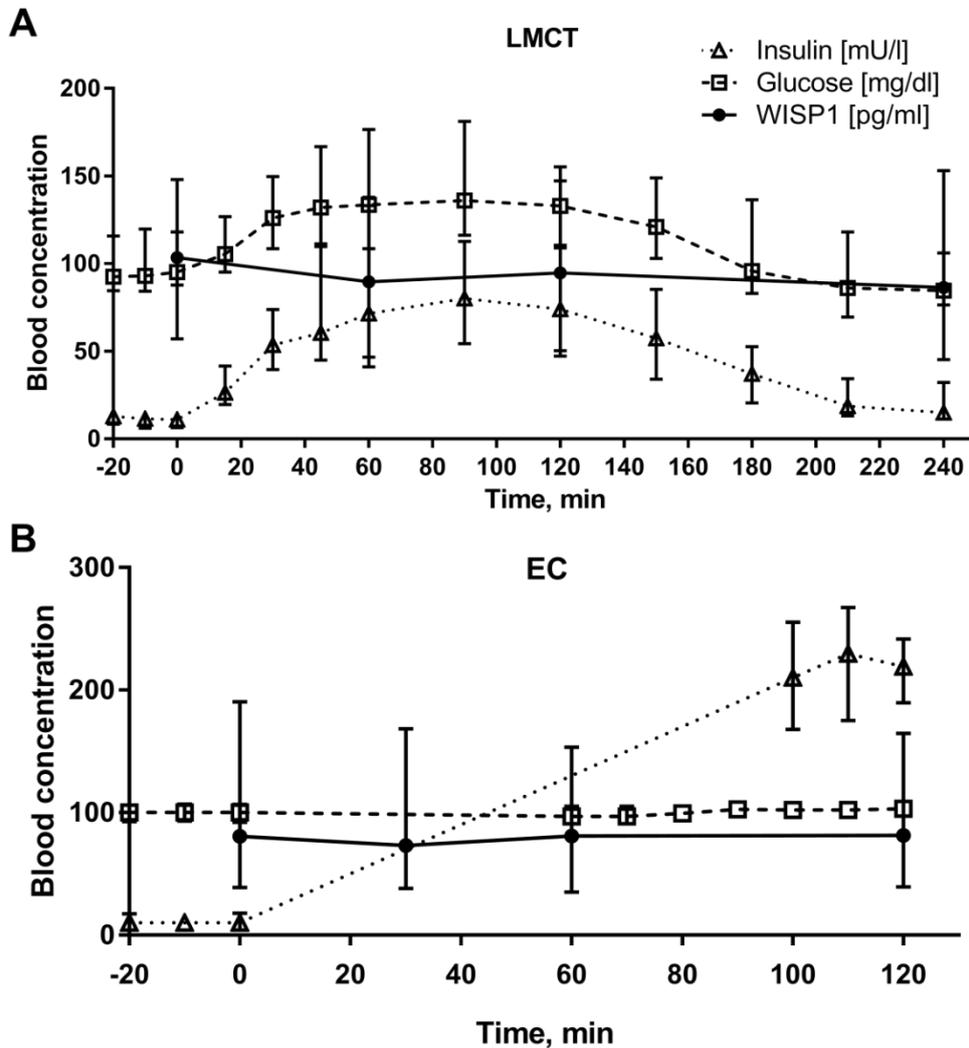
Zunächst wurden die Einflüsse der Mahlzeiten sowie Insulin- und Glukoseschwankungen auf die Zuverlässigkeit der WISP1 Messung untersucht. Hierzu wurde in der Subkohorte der EPIC-Studie eine Wiederholungsmessung derselben Probanden durchgeführt, um zu evaluieren inwiefern sich Konzentrationen in einem Zeitraum von vier Monaten verändern (Kohorte 2, n = 207). An den

Probanden erfolgte keine Intervention und sie führten auch keine Lebensstiländerung durch [16]. Gesammelte Proben wurden in EDTA-Plasma bei -80° eingefroren [16]. Bei nur 27/207 Probanden waren hWISP1-Konzentrationen oberhalb des unteren Schwellenwertes messbar (13 Männer und 14 Frauen, 13 % der Gesamtkohorte). Bis auf einen geschlechterspezifischen Trend, dem zufolge männliche Probanden im arithmetischen Mittel höhere hWISP1-Konzentrationen als Frauen aufwiesen, konnten keine Korrelation der Plasma hWISP1-Spiegel mit anderen anthropometrischen Daten wie beispielsweise dem Hüftumfang oder dem Body Mass Index (BMI) festgestellt werden (155.5 ± 190.4 pg/ μ L vs. 55.0 ± 58.9 pg/ μ L, $p > 0,05$). Der Intraklassen-Korrelationskoeffizient bei Bezug auf die hWISP1 Zuverlässigkeit betrug 0,93 (95% Konfidenzintervall: 0.84-0.96) in der Gesamtkohorte, davon 0,94 (95% Konfidenzintervall: 0.78-0.98) bei Männern und 0,91 (95 % Konfidenzintervall: 0,70 -0,97) bei Frauen.

4.2.2 Stabilität gegenüber hormonellen Einflüssen

Da wir in zuvor durchgeführten Studien beobachteten, dass die Einwirkung von Insulin auf Adipozyten *in vitro* eine erhöhte WISP1 Expression hervorruft [13], wollten wir im Rahmen eines *in vivo* Experiments retrospektiv diesen Effekt näher untersuchen. Hierzu wurde die hWISP1-Konzentration von 26 Studienteilnehmer (Kohorte I) zu Beginn und im Verlauf (0', 30', 60', 120' nach Beginn) des euglykämischen-hyperinsulinämischen Glucoseclamps gemessen und mit den Insulinspiegeln verglichen. Bei wie zu erwartender steigender Insulinkonzentration im Blut während des Clamps ($p < 0.01$) zeigte sich eine hWISP1-Konzentrationsänderung, welche aber im Rahmen der linearen Regressionsanalyse nicht auf den Anstieg von Insulin zurückgeführt werden konnte ($p = 0.216$, Figur 5B). Darüber hinaus verglichen wir das Verhalten der hWISP1-Konzentrationen im Blut bei Einfluss von postprandial steigenden Glukosespiegeln vor dem Hintergrund eines Flüssignahrungs-Toleranztests (0', 60', 120', 240' nach Nahrungsaufnahme). Bei signifikant steigenden Blutglukosespiegeln von bis zu 150 pg/dl über einen Zeitraum von mehr

als 60 Minuten ($p < 0,0001$ für Blutglukose/Blutinsulin) hielten sich die hWISP1-Konzentrationen im Blut der Probanden stabil und wiesen keine signifikante Abweichung auf ($p = 0,16$, Figur 5A).



Figur 5A/B:
 hWISP1-Konzentrationen während eines Flüssignahrungs-Test über 240 Minuten (A) und hWISP1-Konzentrationen während eines Euglykämischen Clamps über 120 Minuten (B).

4.2.3 Zirkulierendes WISP1 als prädiktiver Marker für Insulinresistenz

Des Weiteren analysierten wir zirkulierende Serum-hWISP1-Spiegel an Probanden mit unterschiedlichen Stadien der gestörten Glukosestoffwechsel, darunter 51 Personen mit NGT, 184 Personen mit präklinisch gestörter Glukosetoleranz (IFG/IGT) sowie 18 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM), definiert nach Kriterien der Deutschen Gesellschaft für Diabetes (S3-Leitlinie - NVL Therapie des Typ-2-Diabetes) (Kohorte 3, N = 253, Tab. 1). In dieser Kohorte

konnten wir in 58,1 % aller Individuen eine hWISP1-Konzentration über den unteren Cut-off Wert messen, welche sich im Histogramm als linksschiefe Verteilung darstellt. 95 % der Werte lagen unterhalb von 249,42 pg/ml (median = 38,5 pg/ml, $I_{50}=47.5$ pg/ml) (Figur 3A). Im Unterschied zur EPIC-Subkohorte konnten hier keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der WISP1-Konzentration im Blut festgestellt werden (79.0 ± 161.8 pg/ml vs. 79.5 ± 136.4 pg/ml für Männer, bzw. für Frauen, $p > 0,05$). Darüber hinaus konnten wir Korrelationen der Serum WISP1-Spiegel mit dem BMI ($n= 147$; $r = 0.19$, $p = 0.02$), dem Hüftumfang ($n = 147$; $r = 0.196$, $p = 0.017$), dem prozentualen Körperfett ($n = 140$; $r = 0.2$, $p = 0.025$), der fettfreien Masse ($n = 140$; $r = -0.2$, $p = 0.03$), den Triglyceridspiegeln im Blut ($n = 147$; $r = 0.223$, $p = 0.007$), den zirkulierenden Leptinspiegeln ($n = 96$; $r = 0.26$, $p = 0.01$) sowie dem Fatty Liver Index (FLI, $n = 91$; $r = 0.275$, $p = 0.008$) feststellen. Keine Korrelationen ergaben sich hingegen zu HbA1c, zum Leberfettanteil (im MRT bestimmt), zum viszeralen Fett (im MRT bestimmt), zu $HOMA_{IR}$ sowie zu Cholesterin, Alanin-Aminotransferase (ALAT, GPT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT, GOT). Nach stufenweiser linearer Regressionsanalyse verblieb lediglich der BMI als unabhängiger Parameter für einen Einfluss auf die hWISP1 Konzentration im Körper, andere Parameter wurden aus dem Vorhersagemodell entfernt. Dieses Modell konnte lediglich 5 % (angepasstes R^2) der hWISP1-Variabilität erklären. Gewichtsunterschiede zwischen den Individuen, eingeteilt in Gruppen, konnten keine unterschiedlichen hWISP1 Konzentrationen erklären ($p = 0.123$). Zudem verglichen wir Individuen, deren hWISP1-Konzentration unterhalb des cut-off Wertes lag mit Individuen, welche klinisch messbare hWISP1 Konzentrationen aufwiesen. Dabei erkannten wir, dass Individuen mit messbaren Spiegeln tendenziell höhere LDL bzw. HDL-Cholesterinwerte aufwiesen. Innerhalb der messbaren Kohorte setzte sich dieser Trend allerdings nicht linear fort. Zuletzt erkannten wir auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Individuen mit unterschiedlicher Glukosetoleranz ($p > 0,05$).

4.3 In Vitro-Studien

Die in unseren vorherigen Studien beobachtete negative Korrelation zwischen WISP1-Synthese in viszeralem Fettgewebe und erniedrigter Insulin-Sensitivität im Fettgewebe während eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamps [13] brachte uns zu der Annahme, dass es einen Zusammenhang zwischen WISP1 und der Insulin-Aktivierung, bzw. dessen Signaltransduktoren geben könne. Um diese Prozesse auf zellulärer Ebene beobachten zu können, inkubierten wir humane Skelettmuskelzellen mit 1µg/L hWISP1 vor Zugabe von Insulin. Hierbei zeigte sich bereits eine Reduktion der Insulinvermittelten AKT-Phosphorylierung von Thr308 and Ser473 um 40%. Bereits bei einer Inkubationskonzentration von 0,1µg/L zeigten sich erniedrigte Phosphorylierungen von GSK3β-Ser9, p70S6K-Thr389 und IRβ-Tyr-1150/1151.

Um die funktionelle Relevanz der Insulininhibierung besser erklären zu können, beleuchteten wir die Glykogensynthese humaner Muskelzellen unter dem Einfluss o.g. hWISP1-Stimulation (3.1 – In Vitro-Versuche). Während durch Inkubation mit Insulin (100nmol/L) für 3 Stunden die Glykogensynthese der Zellen signifikant steigerte, wurde bei vorheriger hWISP1-Stimulation über 24h mit 0,1µg/L und 1µg/L keine signifikante Insulinvermittelte Steigerung der Glykogensynthese festgestellt.

Im Bereich der murinen Hepatozyten sahen wir in der AML12-Zelllinie eine Dosisabhängige Reduktion der Insulin-Induzierten AKT-Phosphorylierung von Thr308 und Ser473. Die Induktion von GSK3β-Ser9-Phosphorylierung durch Insulin wurde durch mWISP1 nicht beeinflusst. Um auch Effekte distaler Insulin-Signaltransduktoren aufzudecken, analysierten wir die Phosphorylierung von FOXO1 bei Ser256 und konnten wie zuvor bereits ab Dosierungen von von 0,1µg/L mWISP1 die Aufhebung signifikanter Insulin-Induktion feststellen.

Interessanterweise hob eine Inkubation mit WISP1 die Antigliconeogenetische Suppression von Pck1 und G6pc durch Insulin vollständig auf.

5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten wir WISP1/CCN 4 als einen stabilen im Blut nachweisbaren Marker charakterisieren, welcher sich weder durch mehrfaches Auftauen- und Einfrieren noch durch Insulin- oder Glukoseschwankungen im Blut abbaut, bzw. akkumuliert. Darüber hinaus zeigten sich bei einer viermonatigen Beobachtungszeit hWISP1-Spiegel im Menschen eine hohe Konstanz und stellten über einen langen Zeitraum Bezüge zu erhöhten Triglyceridspiegeln, Leptinspiegeln oder Leberverfettung und anthropometrischen Pathologien wie einem erhöhten BMI und Körperfett her.

Außerdem konnten wir mit unserer Arbeit zeigen, dass im Bereich der Präanalytik die Auswahl des Gerinnungsinhibitors für den späteren Messerfolg essenziell ist. Der Effekt von Citrat bzw. EDTA auf die Messbarkeit von WISP1 im Plasma konnte in unserer Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, jedoch lässt sich abschließend sagen, dass Lithium Heparin in Plasmaproben auch schon in Konzentrationen unter denen, welche zur suffizienten Gerinnungsinhibition einer Blutprobe notwendig sind, zu einer signifikanten Reduktion der WISP1-Konzentration führt. Daher lässt sich klar von der Verwendung dieses Gerinnungsinhibitors für weitere Studien abraten. Der beobachtete Effekt könnte sich auf potentielle Bindungsstellen für Heparin im hWISP1-Molekül zurückführen lassen, welches bis zu drei von 4 Untereinheiten Bindungsstellen für Heparin besitzt [22,23]. Darüber hinaus entdeckten wir eine deutlich höhere Konzentration an WISP1 in Serumproben als in Plasmaproben, was die Frage aufwirft, ob im Serum falsch positive (also fälschlicherweise zu hoch) oder im Plasma falsch negative (also fälschlicherweise zu niedrig) Konzentrationen gemessen wurden. Im Falle einer falsch positiven Messung könnten beispielsweise Fragmente des WISP1-Proteins an Bindungsstellen der Antikörper des Assays binden, was zu erhöhter Extinktion im Assay führt. Diesen Fall erachten wir als unwahrscheinlich, da es sich bei dem Sandwich-ELISA von der Firma R&D Systems, Deutschland um einen monoklonalen Capture-Antikörper handelt, welcher lediglich eine einzige Sequenz des WISP1 Proteins bindet. Somit wird die

Wahrscheinlichkeit einer zusätzlichen Fragmentbindung gesenkt. Im Falle einer falschen negativen Messung im Plasma könnte zum einen davon ausgegangen werden, dass Bestandteile des Plasmas wie GAGs, Plasmafaktoren oder das Fibrin selbst die Bindung von WISP1 an Antikörper unterbindet bzw. hemmt. Zum anderen könnten aber auch Gerinnungsinhibitoren wie das EDTA oder Citrat einen negativen Effekt auf die freie Verfügbarkeit von hWISP1 im Plasma haben. Grund hierfür könnten möglicherweise die negativen Ladungen sein, welche im Serum nicht vorhanden sind.

In Proben der Kohorte II konnte die WISP1-Konzentration bei über 80 % aller gesunden Probanden nicht gemessen werden, was die Aussagekraft bezüglich Korrelationen und Geschlechterbezüge infrage stellen könnte. Allerdings könnte auch die Frage nach dem Messbereich, in welchem hWISP1 mit diesem Assay gemessen wurde, aufgeworfen werden. Diese Studie war eine der ersten *in vivo* Studien und zeigte, dass die durchschnittlichen WISP1-Konzentrationen wesentlich niedriger liegen als jene im *in vitro* Experiment. Somit zeigte sich auch die Schwierigkeit, dieses Molekül in einer gesunden Population sicher nachweisen zu können. Ein vergleichsweise hoher Anteil (bis zu 50 % in Kohorte 3) an messbaren WISP1-Konzentrationen konnte im Gegenzug bei Probanden mit gestörtem Glukosestoffwechsel und Adipositas festgestellt werden, wenngleich Messungen in Kohorte III stets an Serum erfolgten, welches von Natur aus höhere hWISP1-Konzentrationen aufweist .

Diese Schwierigkeit des Detektionslimits war uns zu Beginn der Messungen nicht bekannt, ist aber dahingehend wertvoll, Vorkehrungen in zukünftigen Studien mit gesunden Probanden treffen zu können. Außerdem könnte es als Signal für Hersteller von Assays dienen, den Messbereich für WISP1-Messungen zu Re-Evaluieren.

Obwohl wir eine Erhöhung der WISP1-Expression im *in vitro* Experiment bei Adipozyten beobachten konnten [13], konnte dieser Effekt im euglykämischen-hyperinsulinämischen Clamp bei Menschen nicht reproduziert werden. Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass die verhältnismäßig kurze Akutphase der im Experiment auftretenden Hyperinsulinämie *in vivo* nicht

ausreicht, systemische Anstiege des hWISP1-Proteins zu erzeugen. Der Grad der Insulinbelastung im *in vitro*-Experiment ist wesentlich länger und intensiver. Da WISP1 als parakrines Hormon vermutlich im interstitiellen Raum sezerniert wird, ist hierbei die Latenzzeit bis zur Anflutung im Blut wesentlich länger als bei beispielsweise Drüsenhormonen mit Sekretion ins Kapillarennetz. Möglicherweise wären bei einer Beobachtungszeit von über zwei Stunden noch Effekte aufgetreten. Die *In vitro*-Experimente der murinen Hepatozyten zeigen, dass hWISP1 den Insulin-Effekt in den Zellen hemmt. Denkbar wäre aber auch eine Insulinvermittelte Hemmung der WISP1 Freisetzung im Sinne einer gegenseitigen Wechselwirkung, welche die fehlende WISP1-Antwort im hyperinsulinämischen Clamp erklären könnte.

Wir schlussfolgern, dass ein pathologischer Glukosestoffwechsel mit chronisch erhöhten Blutglukose-Spiegeln zu einer sogenannten „subklinischen Entzündungsreaktion“ im Fettgewebe führt und über diesen Mechanismus eine hWISP1-Freisetzung triggert. In Übereinstimmung mit dieser These konnte eine Studie einen Zusammenhang zwischen WISP1- und IL-8-Konzentrationen, erniedrigten Adiponektin-Spiegeln und radiologischen Anzeichen einer Fibrosierung des viszeralen Fettgewebes aufzeigen [24]. Wie in unseren Studien auch konnte dort kein Zusammenhang mit einer Typ 2 Diabeteserkrankung gefunden werden. Ein Erklärungsversuch hierfür könnte sein, dass seit Einführung gezielter Schulungen zur ambulanten Blutzuckerkontrolle sowie der richtigen Dosierung von Antidiabetika durch die Patienten der Kohorte III langanhaltende Hyperglykämien eher selten geworden sind. Andere Studien wiederum berichten von einer erhöhten hWISP1-Konzentration bei Patienten mit Gestationsdiabetes (Typ 4-Diabetes) [25]. Interessanterweise wird Gestationsdiabetes mitunter durch eine pathologisch erhöhte Gestagen-Produktion bewirkt [26], was in einem komplexen Zusammenspiel aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen maßgeblich zu einer Entzündungsreaktion im Fettgewebe beiträgt [27]. Die Auswirkungen von pro-inflammatorischen Zytokinen könnten für einen hWISP1-Anstieg verantwortlich gemacht werden und sollten hierbei noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, da Entzündungsreaktionen häufig mit Zytokinen einhergehen und somit eine

klare Kausalität nicht eindeutig festgestellt werden kann. Fraglich ist, in wieweit die Hemmung der Insulin-Signalwirkung auf zellulärer Ebene eine systemische Relevanz hat und zu einer pathologischen Blutglukose bei Diabetikern führen könnte.

Interessanterweise sahen wir eine stark-positive Korrelation zwischen zirkulierenden Leptinspiegeln und hWISP1-Spiegeln. Leptin, ein parakrin-sezerniertes Adipokin, welches im ZNS für das Empfinden des Sättigungsgefühl mitverantwortlich ist, reguliert unter anderem das Körpergewicht durch Suppression von Appetit und gleichzeitiger Stimulierung des Energieumsatzes. Darüber hinaus moduliert es eine große Anzahl an Immun- und Entzündungsprozessen, unter anderem auch Entzündungen und Reorganisation im Fettgewebe [28]. Möglicherweise könnte das Zusammenspiel von hWISP1 mit Leptin auf Gewebeebene Prozesse der zellulären Reorganisation und, weitergehend, der Fibrosierung fördern. In diesem Zusammenhang wären Messungen von zirkulierenden Fettgewebs-Fibrosemarkern wegweisend, um das Ursache-Folgeschema zu vervollständigen.

Die Stärke unserer Studie liegt unter anderem in der Anzahl der Probanden, der unterschiedlichen Ausprägung metabolischer Dysbalancen und der Einbeziehung beider Geschlechter in die Untersuchung. Somit konnten wir ein breites Spektrum an unterschiedlichen metabolischen Reaktionen auf dieselbe Intervention untersuchen. Hierbei muss jedoch zum Ausdruck gebracht werden, dass diese Erkenntnisse keineswegs auf andere Ethnien übertragbar sind. Neben dem wichtigsten, dem genetischen Faktor, sind auch äußere Faktoren wie Ernährung, körperliche Aktivität und Lebensstil relevant für körpereigene Reaktionen auf metabolische Dysbalancen. Darüber hinaus dürfen die Variabilität verschiedener Messverfahren, insbesondere durch unterschiedliche Assays von verschiedenen Herstellern, aber auch Laborstandards und unterschiedliche Probenverwaltung nicht unterschätzt werden.

Zusammengefasst konnten wir in unserer Arbeit hWISP1 als ein in messbaren Mengen exprimiertes Protein bei übergewichtigen bzw. adipösen Individuen, unabhängig vom Status der Glukosetoleranz, nachweisen. Bei gesunden Individuen fanden wir einen prozentual geringeren

Anteil an messbaren hWISP1-Konzentrationen. Möglicherweise kann hWISP1 eher als frühdiagnostischer Wegweiser angesehen werden als ein prädiabetischer Marker. Der BMI konnte einen kleinen Teil der hWISP1-Variabilität erklären, während der größere Teil der Einflussfaktoren für dessen Expression noch unklar bleibt. Nichtsdestotrotz bleibt das klinische Potential von hWISP1 Gegenstand weiterer Studien und könnte sich als hilfreich in der zeitnahen Erfassung metabolischer Pathologien erweisen.

6. BASISCHARAKTERISTIKA

	Kohorte I	Kohorte II	Kohorte III
Gesamtzahl	26	207	253
NGT/IFG+IGT/T2DM (N)	5/11/10	207/0/0	51/184/18
Geschlecht (% male)	55.6	40	36.8
Alter (a)	59.1 ± 9.1	56 ± 4.2	58.5 ± 9.6
Gewicht (kg)	90.1 ± 14.7	n.a.	89.0 ± 16.6
BMI (kg/m ²)	31.5 ± 4.9	26.5 ± 4.0	31.6 ± 5.0
Taillenumfang [cm]	103.7 ± 10.9	93.0 ± 12.8	102.3 ± 12.4
Hüftumfang [cm]	108.9 ± 11.7	n.v.	111.5 ± 10.9
Taille-Hüft-Verhältnis	0.90 ± 0.09	n.v.	0.92 ± 0.08
HOMA-IR	3.75 ± 6.28	n.v.	2.22 ± 1.22
HbA _{1c} (%)	5.92 ± 0.69	n.v.	5.41 ± 0.43
HDL (mmol/L)	1.21 ± 0.28	n.v.	1.28 ± 0.30
LDL (mmol/L)	3.35 ± 1.04	n.v.	3.51 ± 0.85
Triglyceride (mmol/L)	1.88 ± 1.02	n.v.	1.42 ± 0.81
Gesamtcholesterin (mmol/L)	5.46 ± 1.24	n.v.	5.43 ± 1.02
GPT (U/L)	38.9 ± 110.5	n.v.	27.3 ± 18.4
Körperfett (%)	37.3 ± 8.3	n.v.	37.7 ± 8.2
Viszerales Körperfett (%)	n.a.	n.v.	4.61 ± 2.05
Intrahepatisches Leberfett (%)	14.22 ± 10.37	n.v.	8.20 ± 8.36
Fatty Liver Index (FLI)	n.a.	n.v.	66.7 ± 26.8

Tabelle 1. Alle Daten angegeben als arithmetisches Mittel ± Stabw. ; n.v. = nicht verfügbar.

1. Kohorte I - Probanden unterschiedlicher Stadien der gestörten Glukosetoleranz, welche sich einer Flüssignahrungsmahlzeit sowie eines Euglykämischen Clamps unterzogen. N= 26
2. Kohorte II - European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC) Potsdam Studie. N= 207
3. Kohorte III - Probanden mit unterschiedlichen Stadien der gestörten Glukosestoffwechsel, darunter 51 Personen mit NGT, 184 Personen mit präklinisch gestörter Glukosetoleranz (IFG/IGT) sowie 18 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM)

7. REFERENZEN

1. Brigstock DR: **The CCN family: a new stimulus package.** *J Endocrinol* 2003, **178**:169-175.
2. Jun J-I, Lau LF. **Taking Aim at the Extracellular Matrix: CCN Proteins as Emerging Therapeutic Targets.** *Nature reviews Drug discovery.* 2011;10(12):945-963. doi:10.1038/nrd3599.
3. Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U: **Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: the role of WISP2, WNT, and BMP4.** *Diabetes* 2013, **62**:2997-3004.
4. Pakradouni J1, Le Goff W, Calmel C, Antoine B, Villard E, Frisdal E, Abifadel M, Tordjman J, Poitou C, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Bruckert E, Clément K, Fève B, Martinerie C, Guérin M.: **Plasma NOV/CCN3 levels are closely associated with obesity in patients with metabolic disorders.** *Lobaccaro J-MA, ed. PLoS ONE.* 2013;8(6):e66788. doi:10.1371/journal.pone.0066788.
5. Barbara Berschneider, Melanie Königshoff: **WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): A novel mediator linking development and disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 43, Issue 3, 2011, Pages 306-309
6. Gurbuz I, Chiquet-Ehrismann R: **CCN4/WISP1 (WNT1 inducible signaling pathway protein 1): a focus on its role in cancer.** *Int J Biochem Cell Biol* 2015, **62**:142-146.
7. Blom AB, Brockbank SM, van Lent PL, van Beuningen HM, Geurts J, Takahashi N, van der Kraan PM, van de Loo FA, Schreurs BW, Clements K, Newham P, van den Berg WB.: **Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**:501-512.
8. Chen, C.C. and L.F. Lau, **Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins.** *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. 41(4): p. 771-83.
9. Cervello, M., Giannitrapani L, Labbozzetta M, Notarbartolo M, D'Alessandro N, Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G.: **Expression of WISPs and of their novel alternative variants in human hepatocellular carcinoma cells.** *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1028**: p. 432-9.
10. Yanagita, T., Kubota S, Kawaki H, Kawata K, Kondo S, Takano-Yamamoto T, Tanaka S, Takigawa M.: **Expression and physiological role of CCN4/Wnt-induced secreted protein 1 mRNA splicing variants in chondrocytes.** *FEBS J*, 2007. **274**(7): p. 1655-65.
11. Inkson CA, Ono M, Bi Y, Kuznetsov SA, Fisher LW, Young MF. **The Potential Functional Interaction of Biglycan and WISP-1 in Controlling Differentiation and Proliferation of Osteogenic Cells.** *Cells, Tissues, Organs.* 2008;189(1-4):153-157. doi:10.1159/000151377.
12. Stephens S, Palmer J, Konstantinova I, Pearce A, Jarai G, Day E. **A functional analysis of Wnt inducible signalling pathway protein –1 (WISP-1/CCN4).** *Journal of Cell Communication and Signaling.* 2015;9(1):63-72. doi:10.1007/s12079-015-0267-9.
13. Murahovschi V, Pivovarova O, Ilkavets I, Dmitrieva RM, Döcke S, Keyhani-Nejad F, Gögebakan Ö, Osterhoff M, Kemper M, Hornemann S, Markova M, Klötting N, Stockmann M, Weickert M, Lamounier-Zepter V, Neuhaus P, Konradi A, Dooley S, von Loeffelholz C, Blüher M, Pfeiffer AF, Rudovich N: **WISP1 Is a Novel Adipokine Linked to Inflammation in Obesity.** *Diabetes* 2015, **64**:856-866.

14. Sahin Ersoy G, Altun Ensari T, Subas S, Giray B, Simsek EE, Cevik O: **WISP1 is a novel adipokine linked to metabolic parameters in gestational diabetes mellitus.** *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;1-5.
15. Rudovich NN, Weickert MO, Pivovarova O, Bernigau W, Pfeiffer AF: **Effects of acarbose treatment on markers of insulin sensitivity and systemic inflammation.** *Diabetes Technol Ther* 2011, **13**:615-623.
16. Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, Charrondière UR, Hémon B, Casagrande C, Vignat J, Overvad K, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Thiébaud A, Wahrendorf J, Boeing H, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Vineis P, Palli D, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Engeset D, González CA, Barricarte A, Berglund G, Hallmans G, Day NE, Key TJ, Kaaks R, Saracci R.: **European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection.** *Public Health Nutr* 2002, **5**:1113-1124.
17. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C: **The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population.** *BMC Gastroenterology* 2006, **6**:33.
18. Asendorpf, J. & Wallbott, H. G. (1979): **Maße der Beobachterübereinstimmung: Ein systematischer Vergleich.** *Zeitschrift für Sozialpsychologie*, *10*, 243–252.
19. McGraw, K. O., & Wong, S. P. (1996): **Forming inferences about some intraclass correlation coefficients.** In: *Psychological Methods*, *1*, 30–46.
20. Shrout, P. E. & Fleiss, J. L. (1979): **Intraclass correlation: Uses in assessing rater reliability.** In: *Psychological Bulletin*, *86*, 420–428.
21. WHO: **Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia.** pp. 1–46. *Geneva: World Health Organization*; 2006:1–46.
22. Murahovschi V, Tacke C, Pivovarova O, Kruse M, Seltmann A, Kemper M, Hornemann S, Pfeiffer A, Rudovich N: **(2015) Regulation of WNT signaling receptors and co-receptors by high fat diet in humans.** *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 122. 10.1055/s-0035-1547689.
23. Liu J, Ren Y, Kang L, Zhang L: **Overexpression of CCN3 inhibits inflammation and progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.** *PLoS One* 2014, **9**:e94912.
22. Holbourn, Kenneth P., K. Ravi Acharya, and Bernard Perbal. **“The CCN Family of Proteins: Structure–function Relationships.”** *Trends in Biochemical Sciences* 33.10 (2008): 461–473. *PMC*. Web. 28 Jan. 2018.
23. Shi-Wen X, Rodríguez-Pascual F, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, Dashwood MR, du Bois RM, Denton CP, Black CM, Abraham DJ, Leask A.: **Constitutive ALK5-Independent c-Jun N-Terminal Kinase Activation Contributes to Endothelin-1 Overexpression in Pulmonary Fibrosis: Evidence of an Autocrine Endothelin Loop Operating through the Endothelin A and B Receptors.** *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(14):5518-5527. doi:10.1128/MCB.00625-06.
24. Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, De Gioannis R, Porzia A, Mainiero F, Di Martino M, Bertocchini L, De Bernardinis M, Leonetti F, Baroni MG, Lenzi A, Cavallo MG: **WISP1 Is a Marker of Systemic and Adipose Tissue Inflammation in Dysmetabolic Subjects With or Without Type 2 Diabetes.** *Journal of the Endocrine Society*. 2017;1(6):660-670. doi:10.1210/js.2017-00108.
25. Bal M, Şahin Ersoy G, Demirtaş Ö, Kurt S, Taşyurt A. **Vitamin D deficiency in pregnancy is not associated with diabetes mellitus development in pregnant women at low risk for gestational diabetes.** *Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016;13(1):23-26. doi:10.4274/tjod.10170.

26. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J (2003) **Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus.** *J Nutr.* 2003 May, 133(5 Suppl 2):1674S-1683S.
27. Abell SK, De Courten B, Boyle JA, Teede HJ. **Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus.** Baker PN, ed. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16(6):13442-13473. doi:10.3390/ijms160613442.
28. Zhou Y, Yu X, Chen H, Sjöberg S, Roux J, Zhang L, Ivoulsou AH, Bensaid F, Liu CL, Liu J, Tordjman J, Clement K, Lee CH, Hotamisligil GS, Libby P, Shi GP. **Leptin deficiency shifts mast cells toward anti-inflammatory actions and protects mice from obesity and diabetes by polarizing M2 macrophages.** *Cell metabolism.* 2015;22(6):1045-1058. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.013.

8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Christopher Tacke versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Über die Bedeutung des Circulating Wnt1 inducible signalling pathway Protein 1 (WISP1) als Marker der Adipositas und seiner Rolle in der Pathogenese Adipositas-assoziiierter Erkrankungen* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an der/n ausgewählten Publikation/en entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. PUBLIKATIONEN

9.1 Ausgewählte Publikation

9.1.1 Assessment of circulating Wnt1 inducible signalling pathway protein 1 (WISP-1)/CCN4 as a novel biomarker of obesity

Christopher Tacke, Krasimira Aleksandrova, Miriam Rehfeldt, Veronica Murahovschi, Mariya Markova, Margrit Kemper, Silke Hornemann, , Ulrike Kaiser, Caroline Honig, Christiane Gerbracht, Stefan Kabisch, Tina Hörbelt, Margrit Ouwens, Martin O. Weickert, Heiner Boeing, Andreas F.H. Pfeiffer, Olga Pivovarova, Natalia Rudovich,

Publizierendes Journal:

JOURNAL OF CELL COMMUNICATION AND SIGNALLING

ISSN: 1873-9601 (Print) 1873-961X (online)

Impact Factor 2.705

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0427-1>

Anteilserklärung an der ausgewählten Publikation

Der Beitrag von Christopher Tacke bestand in der Vermessung der hWISP1-Konzentrationen von Kohorte 1 und 3. Alle Ergebnisse wurden von Christopher Tacke in Datenbanken eingepflegt und anschliessend bearbeitet. Darüber hinaus wurden die Versuche im Abschnitt der Methodenetablierung („Assay Validation“) von C. Tacke entwickelt, durchgeführt und mit betreuerischer Hilfe interpretiert. Darüber hinaus analysierte Christopher Tacke die gesammelten Daten und arbeitete an der statistischen Auswertung durch Neuerstellung einer SPSS-Datenbank und Durchführung statistischer Tests sowie der schriftlichen Anfertigung der Publikation mit. Die in der Publikation verwendeten Graphiken wurden durch Christopher Tacke erstellt und nach Inhaltlicher Korrektur im Paper übernommen.

9.1.2 The novel adipokine WISP1 associates with insulin resistance and impairs insulin action in human myotubes and mouse hepatocytes

Tina Hörbelt, Christopher Tacke, Mariya Markova, Daniella Herzfeld de Wiza, Frederique Van de Velde, Marlies Bekaert, Yves Van Nieuwenhove, Silke Hornemann, Maria Rödiger, Nicole Seebeck, Elisabeth Friedl, Wenke Jonas, Oliver Kuss, Anke Rosenthal, Volker Lange, Andreas F.H. Pfeiffer, Annette Schürmann, Bruno Lapauw, Natalia Rudovich, Olga Pivovarova and D. Margriet Ouwens; **The novel adipokine WISP1 associates with insulin resistance and impairs insulin action in myotubes and hepatocytes**, *Diabetologia* (2018) – <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4636-9>

Anteilserklärung an der ausgewählten Publikation

Der Beitrag von Christopher Tacke bestand in der Vermessung einer Teilkohorte aus der OBSTER-Studie, Analyse der Daten aus der OBSTER-Kohorte sowie in der Mitverfassung des Manuskriptes. Hierfür wurde die Datentabelle der bereits gesammelten Parameter in SPSS verwendet und die gemessenen Konzentration von hWISP1 integriert. Insbesondere die in vitro Experimente wurden räumlich und persönlich in getrennten Laboren durchgeführt. An der Durchführung und Auswertung der In-vitro Experimente trägt Christopher Tacke keine Anteile.

Publizierendes Journal:

***Diabetologia* 12. Mai 2018**

ISSN: 0012-186X (Print) 1432-0428 (Online)

Impact Factor 6.023

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4636-9>

9.1.3 Modulation of circulating vasoactive peptides and extracellular matrix proteins are two novel mechanisms in the cardioprotective action of acarbose

Natalia Rudovich, Olga Pivovarova , Wolfgang Bernigau , Andrea Sparwasser, Christopher Tacke, Veronica Murahovschi, Gabriele Mertes, Andreas L. Birkenfeld, Andreas Bergmann, Martin O. Weickert, Andreas F. H. Pfeiffer; **Modulation of circulating vasoactive peptides and extracellular matrix proteins are two novel mechanisms in the cardioprotective action of acarbose**, *Minerva Endocrinologica* 2016 December;41(4):456-68

Anteilerklärung an der ausgewählten Publikation

Der Beitrag von Christopher Tacke bestand in der erneuten Vermessung der Acarbose-Studie auf das hWISP1-Protein und der teilweisen Auswertung der ermittelten Daten im Bezug auf bereits in der Studie gewonnene Erkenntnisse. Hierfür wurde die Datentabelle der bereits gesammelten Parameter in SPSS verwendet und die gemessenen Konzentration von hWISP1 integriert. Es erfolgten die erneuten wissenschaftlichen Berechnungen und Auswertungen zusammen mit der Betreuerin PD Dr. Natalia Rudovich. Die Integration in den wissenschaftlichen Kontext sowie die Anfertigung des Papers erfolgte durch PD. Dr. Natalia Rudovich und Christopher Tacke.

Publizierendes Journal:

***Minerva Endocrinologica* 2016 December;41(4):456-68**

ISSN: 0391-1977 (Print) 1827-1634 (Online)

Impact Factor 1,383

Link: <https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-endocrinologica/article.php?cod=R07Y2016N04A0456>

9.2. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Christopher Tacke, Krasimira Aleksandrova, Miriam Rehfeldt, Veronica Murahovschi, Mariya Markova, Margrit Kemper, Silke Hornemann, , Ulrike Kaiser, Caroline Honig, Christiane Gerbracht, Stefan Kabisch, Tina Hörbelt, Margrit Ouwens, Martin O. Weickert, Heiner Boeing, Andreas F.H. Pfeiffer, Olga Pivovarova, Natalia Rudovich, **Assessment of circulating Wnt1 inducible signalling pathway protein 1 (WISP-1)/CCN4 as a novel biomarker of obesity** *J. Cell Commun. Signal.* (2017)
<https://doi.org/10.1007/s12079-017-0427-1>

Natalia Rudovich, Olga Pivovarova , Wolfgang Bernigau , Andrea Sparwasser, Christopher Tacke, Veronica Murahovschi, Gabriele Mertes, Andreas L. Birkenfeld, Andreas Bergmann, Martin O. Weickert, Andreas F. H. Pfeiffer; **Modulation of circulating vasoactive peptides and extracellular matrix proteins are two novel mechanisms in the cardioprotective action of acarbose**, *Minerva Endocrinologica* 2016 December;41(4):456-68 - PMID: 27007919
<https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-endocrinologica/article.php?cod=R07Y2016N04A0456>

Tina Hörbelt, Christopher Tacke, Mariya Markova, Daniella Herzfeld de Wiza, Frederique Van de Velde, Marlies Bekaert, Yves Van Nieuwenhove, Silke Hornemann, Maria Rödiger, Nicole Seebeck, Elisabeth Friedl, Wenke Jonas, Oliver Kuss, Anke Rosenthal, Volker Lange, Andreas F.H. Pfeiffer, Annette Schürmann, Bruno Lapauw, Natalia Rudovich, Olga Pivovarova and D. Margriet Ouwens; **The novel adipokine WISP1 associates with insulin resistance and impairs insulin action in myotubes and hepatocytes**, *Diabetologia* (2018) - <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4636-9>

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

9.5 Komplette Publikationsliste

1. Christopher Tacke, Krasimira Aleksandrova, Miriam Rehfeldt, Veronica Murahovschi, Mariya Markova, Margrit Kemper, Silke Hornemann, , Ulrike Kaiser, Caroline Honig, Christiane Gerbracht, Stefan Kabisch, Tina Hörbelt, Margrit Ouwens, Martin O. Weickert, Heiner Boeing, Andreas F.H. Pfeiffer, Olga Pivovarova, Natalia Rudovich, **Assessment of circulating Wnt1 inducible signalling pathway protein 1 (WISP-1)/CCN4 as a novel biomarker of obesity** *J. Cell Commun. Signal.* (2017)
<https://doi.org/10.1007/s12079-017-0427-1>
2. Natalia Rudovich, Olga Pivovarova , Wolfgang Bernigau , Andrea Sparwasser, Christopher Tacke, Veronica Murahovschi, Gabriele Mertes, Andreas L. Birkenfeld, Andreas Bergmann, Martin O. Weickert, Andreas F. H. Pfeiffer; **Modulation of circulating vasoactive peptides and extracellular matrix proteins are two novel mechanisms in the cardioprotective action of acarbose**, *Minerva Endocrinologica* 2016 December;41(4):456-68 - PMID: 27007919
<https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-endocrinologica/article.php?cod=R07Y2016N04A0456>
3. Tina Hörbelt, Christopher Tacke, Mariya Markova, Daniella Herzfeld de Wiza, Frederique Van de Velde, Marlies Bekaert, Yves Van Nieuwenhove, Silke Hornemann, Maria Rödiger, Nicole Seebeck, Elisabeth Friedl, Wenke Jonas, Oliver Kuss, Anke Rosenthal, Volker Lange, Andreas F.H. Pfeiffer, Annette Schürmann, Bruno Lapauw, Natalia Rudovich, Olga Pivovarova and D. Margriet Ouwens; **The novel adipokine WISP1 associates with insulin resistance and impairs insulin action in myotubes and hepatocytes**, *Diabetologia* (2018) - <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4636-9>
4. Christopher Tacke , Veronica Murahovschi , Martin Weickert , Olga Pivovarova , Özlem Gögebakan , Margit Kemper , Silke Hornemann , Andreas FH Pfeiffer , Natalia Rudovich; **Circulating WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) is a novel marker of visceral obesity**, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015; 123 - P08_04, DOI: 10.1055/s-0035-1547691

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE) für die kollegiale Zusammenarbeit und die Mithilfe bei meinen Forschungsarbeiten bedanken. Insbesondere danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen unserer Abteilung: Kathrin Sprengel, Tanja Ahrens und Andrea Borchert für die hervorragende Einarbeitung und tagtägliche Unterstützung im Labor. Ich danke meinem Betreuer Professor Dr. med. Pfeifer für die großzügige Bereitstellung des Labors, der Gerätschaften und humaner Ressourcen. Ich danke auch PD Dr. med. Olga Pivovarova für die Beratung vor Ort im Labor in wissenschaftlichen/praktischen Fragen. Ganz besonders möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. med. Natalia Rudovich für die wissenschaftliche und akademische Betreuung meiner Publikation und Dissertation sowie für die Vorbereitung auf nationale und internationale wissenschaftliche Kongresse danken. Zuletzt möchte ich meinen Eltern für die jahrelange Motivation und Erneuerung meines Durchhaltevermögens in allen Lebenslagen danken.