

Aus der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Fastenassoziierter Immunometabolismus und
Diabetes-Remission (FAIR)**

**Fasting induced Immunometabolism and Remission of
Diabetes (FAIR)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kilian Rüter

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
Abstract (Deutsch)	5
Abstract (Englisch)	6
Einleitung	7
Diabetes mellitus - Einblicke in Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese, Klinik und Therapie	7
Diabetesremission	8
Die „Twin Cycle Hypothesis“ - Das der Diabetesremission zugrundeliegende pathophysiologische Erklärungsmodell	11
Immunologische Aspekte der Pathogenese des T2DM	12
Grundzüge des menschlichen Immunsystems und sterile Inflammation.....	12
Monozyten und Makrophagen in Adipositas und T2DM	14
Anpassungsfähigkeit von Zellen des angeborenen Immunsystems.....	15
Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	16
Methoden	17
Studiendesign	17
Studienpopulation	18
Intervention.....	19
Datenerhebung und -analyse	19
Anthropometrie	20
Blutdruck.....	21
Routinelabor.....	21
Mahlzeitentest (MTT).....	21
Leberfettindices	22
Labor am Tag der Studiervisite.....	22
Plasmaisolation	22
Stimulationsassays	22
PBMC-Isolation.....	23
Immunzellphänotypisierung mittels FACS.....	24
RNA-Sequenzierung	28
Statistik und Datenverarbeitung	29
Appendix Methodenteil	31
Ergebnisse	33
Matchingstrategie	33
Klinische Parameter und Anthropometrie.....	34
HbA1c und Nüchternblutglucose unter Beachtung der Definitionen von Diabetes und Prädiabetes	38
Mahlzeitentest.....	39

Mögliche Vorhersagewerte	43
Stimulationsassays	47
Immunzellphänotypisierung mittels FACS.....	50
RNA-Sequenzierung.....	55
Diskussion	57
Diabetesremission	57
Blutdruckveränderungen	60
Mögliche Vorhersagewerte	61
Stimulationsassays	62
Immunzellphänotypisierung.....	65
RNA-Sequenzierung.....	66
Limitationen	67
Konklusion und offene Fragen.....	69
Acknowledgement.....	70
Referenzen	71
Eidesstattliche Versicherung.....	79
Persönlicher Lebenslauf.....	80
Danksagung.....	81
Bescheinigung des akkreditierten Statistikers.....	82

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
95 %-KI	95 % - Konfidenzintervall	pg	Pikogramm
ALT	Alanin-Aminotransferase	PGN	Peptidoglycan
AST	Asparat- Aminotransferase	PRRs	Pattern Recognition Receptors
AUC	Area under the Curve	RAAS	Renin-Angiotensin- Aldosteron-Systems
BMI	Body-Mass-Index	R837	Imiquimod
BSA	Bovines-Serum-Albumin	R848	Resiquimod
cAMP	Cyclisches-di-Adenosin- monophosphat	SIDD	Severe Insulin-Deficient Diabetes
CCR	Chemokin-C-C-motif- Rezeptor	STING	Stimulator von Interferon- genen (Rezeptor)
CD	Cluster of Differentiation	TAG	Triacylglyceride
CRP	C-reaktives Protein	TLRs	Toll-like Receptors
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1	U/l	Unit/Liter
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2	WHR	Waist-hip-ratio / Taille- Hüft-Quotient
EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure		
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay		
FACS	Fluorescence activated cell sorting / Durchflusszyto- metrie		
FLI	Fatty Liver Index		
g	Gramm		
gGT	Gamma- Glutamyltransferase		
HbA1c	Hämoglobin A1c (glykiertes Hämoglobin)		
IL	Interleukin		
kcal	Kilokalorie		
kDA	Kilodalton		
kg	Kilogramm		
LPS	Lipopolysaccharid		
MAD	Mittlerer Arterieller Blut- druck		
MFI	Mean Fluorescence Inten- sity		
mg	Milligramm		
µg	Mikrogramm		
MHC-II	Haupthistokompatibilitäts- komplex Klasse 2		
MTT	Mahlzeitentest		
NAFLD-LFS	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease - Liver Fat Score		
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B		
NLRP3	NOD-like Receptor Family Pyrin Domain-Containing 3		
OR	Odds Ratio		
PBMC	Peripheral Blood Mononuc- lear Cells		
PBS	Phosphate Buffered Saline		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Twin-cycle-hypothesis.....	12
Abbildung 2: Übersicht der Strategie zur Datenerhebung.....	20
Abbildung 3: Gating Strategie Lineage Panel	26
Abbildung 4: Gating Strategie Monozytenpanel.....	27
Abbildung 5: Matchingstrategie.....	33
Abbildung 6: Charakteristika im Zeitverlauf I.....	36
Abbildung 7: Charakteristika im Zeitverlauf II	37
Abbildung 8: Erkrankungsprävalenzen vor und nach Intervention	38
Abbildung 9: Antwortkurven von Glucose, Insulin und Glucagon im MTT.....	40
Abbildung 10: Veränderung ausgewählter Indices von V1 zu V3.....	41
Abbildung 11: Ausmaß der Veränderungen von Glucagon und Insulin nach MTT	42
Abbildung 12: Multiple lineare Regression mit Nüchtern-glucose zu V3 als abhängiger Variabel	44
Abbildung 13: Multiple lineare Regression mit AUC Glucose zu V3 als abhängiger Variabel....	45
Abbildung 14: Multiple lineare Regression mit PREDIM zu V3 als abhängiger Variabel.....	46
Abbildung 15: Cytokinsekretion nach Stimulation mit diversen TLR-Agonisten	48
Abbildung 16: Prozentualer Anteil der CD3+ T-Zellen und CD3+CD4+ T-Helferzellen im Blut.....	51
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der CD19+ B-Zellen im Blut.....	51
Abbildung 18: Prozentualer Anteil der CD16+ Granulozyten im Blut	52
Abbildung 19: Prozentualer Anteil Monozyten im Blut	53
Abbildung 20: Prozentualer Anteil der verschiedenen Monozytenpopulationen im Blut	53
Abbildung 21: MFI der Aktivierungsmarker CD80 und CD86	54
Abbildung 22: MFI der Aktivierungsmarker HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ	54
Abbildung 23: Genexpressionsänderung zwischen den Visiten.....	56
Abbildung 24: Expressionsänderung ausgewählter Gene aufgeschlüsselt nach Geschlecht und Visite	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Monozyten und ihre Subtypen in Mensch und Maus.....	14
Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien der FAIR-Studie	19
Tabelle 3: Signifikanzniveaus.....	31
Tabelle 4: Matchingstrategie	34
Tabelle 5: Charakteristika zu Beginn und Ende der Intervention	35
Tabelle 6: Relevante Konzentrationsänderungen im Vergleich zur Negativkontrolle.....	50
Tabelle S1: Zusammenfassung verwendeter Materialien	31

Abstract (Deutsch)

Hintergrund: Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist definiert durch die Entgleisung des Glucosestoffwechsels und assoziiert mit Adipositas und subklinischer Inflammation. Durch hypokalorische Ernährungsintervention konnte die Remission von T2DM in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer erreicht werden. Zeitlich begrenzte hypokalorische Ernährung wird mit der Vermittlung antiinflammatorischer Effekte in Verbindung gebracht.

Zielsetzung: Untersuchung der Auswirkungen einer dreimonatigen, hypokalorischen Formeladiät (600-800 kcal/Tag) auf Anthropometrie, Stoffwechsel und Zellen des angeborenen Immunsystems bei ProbandInnen mit T2DM.

Methoden: 39 von 41 ProbandInnen mit seit <4 oder >8 Jahren bestehendem T2DM schlossen die Ernährungsintervention erfolgreich ab. Visiten fanden zu Beginn, nach einer Woche sowie nach Beendigung der Intervention statt. Zu diesen Zeitpunkten wurden Daten zur Anthropometrie, Stoffwechselsituation und dem immunologischen Profil von Zellen des angeborenen Immunsystems erhoben. Zur Identifikation von Faktoren, die den Interventionserfolg vorher-sagen könnten, wurden multiple lineare Regressionsmodelle erstellt.

Ergebnisse: Nach Abschluss der Intervention erzielten 85 % der StudienteilnehmerInnen die Diabetesremission (Nüchtern-glucose <126 mg/dl und Hämoglobin A1c (HbA1c) <6,5 %). Die Erfolgsaussicht auf das Erreichen nicht pathologischer Blutglucosewerte war in der Gruppe mit Diabetesdauer >8 Jahren signifikant niedriger als in der Gruppe mit Diabetesdauer <4 Jahren (Odds Ratio (OR) nach Haldane-Anscombe Korrektur = 0,05; 95 % - Konfidenzintervall (95 %-KI) = 0,00 - 0,92; $p \leq 0,05$). Deutliche Verbesserungen der Anthropometrie, Stoffwechselsituation und Inflammation konnten im gesamten Studienkollektiv nach Beendigung der Intervention beobachtet werden. Bezüglich der Responsivität, des Phänotyps und Aktivierungsgrad von Zellen des angeborenen Immunsystems sowie dem Genexpressionsprofil von peripheren Monozyten konnten keine nennenswerten Veränderungen über die Zeit beobachtet werden. Ausgangswerte des Glucosestoffwechsels, der Gewichtsverlust innerhalb der ersten Interventionswoche sowie die Erkrankungsdauer erwiesen sich als potentielle Prädiktoren für den Erfolg der Intervention.

Konklusion: Durch hypokalorische Ernährungsintervention ist die Remission des T2DM in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer möglich. Aufgrund der unabhängig des Remissionserfolges verbesserten Anthropometrie, Stoffwechsellage und Inflammation stellt die hypokalorische Ernährungsintervention eine vielversprechende neue Therapieoption des T2DM auch für Betroffene mit längerer Krankheitsgeschichte dar. Bestimmte Parameter können helfen, den Therapieerfolg bereits zu Beginn einzuschätzen. Monozyten des peripheren Blutes tragen nicht zur durch die Intervention verbesserten Inflammation bei. In Zukunft sollten andere Kompartimente, wie das subkutane Fettgewebe, diesbezüglich untersucht werden.

Abstract (Englisch)

Background: Type two diabetes (T2DM) is defined by alterations in glucose metabolism and is associated with obesity and subclinical inflammation. Remission of T2DM could be achieved by hypocaloric dietary intervention and is dependent on the duration of the disease. Previous studies have shown that temporary fasting can decrease inflammation markers.

Objective: To test the effect of a hypocaloric total diet replacement intervention on body composition, metabolism and the inflammatory profile of innate immune cells in subjects diagnosed with T2DM.

Methods: 39 of 41 subjects diagnosed with T2DM within <4 or >8 years before study enrollment successfully underwent a three months total diet replacement intervention with formula diet containing 600-800 kcal/day. Parameters of body composition, general- and immunometabolism were obtained prior to the intervention, one week after the initiation and after completion of the intervention. Multiple linear regression models were conducted to identify early factors discriminating the intervention's success.

Results: 85 % of study participants achieved diabetes remission (fasting glucose <126 mg/dl and HbA1c <6.5 %) after completing the intervention. The odds of achieving non-pathological blood glucose levels were significantly lower in the group with diabetes duration >8 years compared to those with a diabetes duration <4 years (Odds ratio after Haldane-Ascombe correction = 0.05; 95 %-confidence interval = 0.00 – 0.92; $p \leq 0.05$). As a result of the intervention, considerable improvements could be observed in the subject's body composition, metabolism and inflammatory status. Analysis of responsiveness, phenotype, activation and gene expression profile of innate immune cells, particularly monocytes, did not reveal significant alterations over time. Baseline assessment of glucose metabolism, weight loss after one week and time after the initial diabetes diagnosis emerged as promising candidates to prediction of success of the intervention upon enrollment.

Conclusion: Remission of T2DM by hypocaloric dietary intervention is possible but dependent on the duration of the disease. Thus, hypocaloric dietary intervention proves to be a promising new option for the T2DM therapy. Due to improvements in body composition, overall metabolism and inflammation, even subjects with longer histories of disease who are less likely to achieve remission benefit from the intervention. Certain early detectable parameters can be used to evaluate the intervention's success but should not be taken as sole decision criteria for or against the intervention. Immune cells circulating in peripheral blood do not account for changes in overall inflammation during the intervention. Hence, further investigations should focus on other compartments such as subcutaneous fat tissues.

Einleitung

Diabeteserkrankungen und insbesondere T2DM stellen weltweit etwa 422 Millionen betroffene Menschen vor erhebliche gesundheitliche Risiken und sind mit einer seit 1980 annähernd verdoppelten Prävalenz eine rasant wachsende Gefahr für Gesundheitssysteme und Ökonomien, besonders in Ländern des globalen Südens [1]. Die Prävalenz von Diabeteserkrankungen korreliert direkt mit dem Körpergewicht. Dies wird in eindrucklicher Weise durch die epidemiologische Betrachtung von Gewicht und Diabetesprävalenz innerhalb der kubanischen Bevölkerung ersichtlich, welche durch ökonomische Prozesse getrieben zwischen 1980 und 2010 erst im Mittel an Gewicht verlor und später wieder zunahm, jeweils direkt gefolgt von entsprechenden Trends der Diabetesprävalenz [2].

Ein der breiten Aufmerksamkeit bisher wenig bekannter, konservativer sowie kurativer Therapieansatz des T2DM besteht im Erreichen einer Remission der Erkrankung durch akute und umfangreiche Gewichtsabnahme. Durch ihre barrierefreie und kostengünstige Umsetzbarkeit hält diese Therapieintention nicht nur in den angesprochenen, besonders herausgeforderten Ländern ein Höchstmaß an Potential inne.

Die vorliegende Arbeit stellt die Durchführbarkeit der konservativen Diabetesremission unter Beweis und bringt zudem Erkenntnisse aus der immunologischen Forschung zu lebensstilbedingten Erkrankungen in Bezug zur Pathophysiologie der Diabetesremission.

Es werden in den folgenden Abschnitten die Erkrankung T2DM, das Phänomen der Diabetesremission sowie die ihm zugrundeliegenden pathophysiologischen Abläufe vorgestellt. Besonderer Aufmerksamkeit soll hierbei der Rolle von Inflammation in der Pathogenese des T2DM gelten, da diese grundlegend für die Entwicklung der Erkrankung ist.

Diabetes mellitus - Einblicke in Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese, Klinik und Therapie

In die Gruppe Diabetes mellitus sind mehrere Erkrankungen zu zählen, denen eine Störung der Glucosehomöostase gemein ist. Die großen Vertreter dieser Gruppe sind der autoimmun vermittelte Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) und der mit Adipositas assoziierte T2DM. Auf den T2DM entfällt dabei die weltweit höchste Inzidenz und Prävalenz innerhalb der Gruppe der Diabeteserkrankungen. Berechnungen zufolge waren im Jahr 2017 ca. 60 Millionen EuropäerInnen an T2DM erkrankt, wovon die Hälfte nicht diagnostiziert wurde. Im Jahr 2045 sollen weltweit mehr als 600 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen sein [1, 3]. Der Manifestation eines T2DM liegt eine starke genetische Komponente zugrunde, dennoch stellt Übergewicht (stammbetonte Adipositas) den stärksten Risikofaktor für die Entwicklung eines T2DM dar. Dies ist zumeist begründet aus einer ungesunden Ernährung mit positiver Energiebilanz in Kombination mit körperlicher Inaktivität [1]. Ein T2DM wird klinisch meist erst im späten Krankheitsverlauf apparent. Dem vorgelagert ist oft eine lange und kontinuierliche Verschlechterung der Glucosehomöostase. Diese ist gekennzeichnet durch eine erschwerte insulinvermittelte Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebszellen (periphere Insulinresistenz), welche primär durch eine gesteigerte Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen kompensiert werden kann. Mit zunehmender Insulinresistenz und Erschöpfung der β -Zellkapazität manifestiert sich die Erkrankung unter anderem mit erhöhten Blutglucosekonzentrationen, Leistungsminderung und Polyurie. Hyperglykämie Entgleisungen bis hin zum hyperglykämischen (hyperosmolaren) Koma stellen akute Komplikationen des T2DM dar. Besonders Langzeitkomplikationen stellen Betroffene vor ein großes Risiko. Hierzu zählen Erkrankungen mikroangiopathischer (wie diabetische Nephropathie, -Retinopathie oder -Neuropathie) und makroangiopathischer Genese (arterielle Verschlusskrankungen wie koronare Herzerkrankung,

Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankung, aber auch Erkrankungen größter Gefäße wie Aortenaneurysmata). Diese Komplikationen korrelieren mit der Erkrankungsdauer sowie der Blutzuckerkontrolle. Aktuelle Therapieempfehlungen orientieren sich an Blutzuckerkontrolle und Begleiterkrankungen. Neben Lebensstilmodifikationen als Basisempfehlung kann auf eine Palette oraler Antidiabetika (wie Metformin, SGLT2-Inhibitoren, Sulfonylharnstoffen und weiteren), subkutan applizierbarer Medikamente (GLP-1-Analoga) sowie verschiedene Insuline zurückgegriffen werden. Die bariatrische Chirurgie mit dem Ziel einer verminderten Nahrungsaufnahme ist bei schwer adipösen PatientInnen mit T2DM als Therapieeskalation ebenfalls möglich [4].

Eine neue, nichtmedikamentöse Therapieoption in kurativer Absicht stellt die Diabetesremission durch akute Energierestriktion dar, welche im folgenden Abschnitt vorgestellt wird.

Diabetesremission

Die Diagnose T2DM wird bislang zumeist als unumkehrbar betrachtet. Ein Blick in internationale Richtlinien genügt um die allgemeine Fokussierung auf Pharmakotherapie zur Blutzuckerkontrolle zu demonstrieren. Im Gegensatz dazu steht das Phänomen der Diabetesremission, welches bislang nur wenig Aufmerksamkeit erfahren hat [5]. Dies ist beachtlich, da die Diabetesremission als konservative sowie kurative Therapieoption einer durch lebenslange Medikamenteneinnahme gekennzeichneten Erkrankungskontrolle entgegensteht. Nach aktuellem Konsensus beschreibt die Diabetesremission die Rückkehr zu HbA1c-Werten $<6,5\%$, bei Personen mit diagnostiziertem T2DM, gemessen frühestens 3 Monate nach Absetzen einer antidiabetischen Medikation [6].

Bereits in den 1980er und -90er Jahren wurden erste Beobachtungen angestellt, die eine langanhaltende Verbesserung der Stoffwechsellage bei PatientInnen mit nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus bis hin zur Remission der Erkrankung zeigen konnten. In diese Studien eingeschlossene PatientInnen litten zusätzlich zu ihrer Diabeteserkrankung an einer Adipositas und durchliefen je nach Studiendesign eine konservative, diätetische Intervention oder erhielten einen chirurgischen Eingriff mit dem Ziel der verminderten Nahrungsaufnahme. Diese Veränderungen der Stoffwechsellage sind primär im Feld der bariatrischen Chirurgie beschrieben und wurden vor allem auf eine durch den chirurgischen Eingriff bedingte, verminderte Nahrungsaufnahme zurückgeführt [7-9]. Unter bariatrischer Chirurgie werden operative Eingriffe verstanden, die die Nahrungsaufnahme der EmpfängerInnen herabsetzen sollen um so einen Gewichtsverlust herbeizuführen [10].

Bedingt durch die Wahl des Operationsverfahrens ergeben sich unterschiedliche Erfolge in Bezug auf die Diabetesremission, wodurch eine Diskussion über den Mechanismus der Diabetesremission entstand. So zeigte beispielsweise das Verfahren „Roux-en-Y gastric bypass“ fast verdoppelte Erfolgsaussichten auf das Erreichen der Diabetesremission im Vergleich zum Verfahren „Laparoscopic gastric banding“ [11]. Letztlich jedoch konnte die Gewichtsabnahme als verfahrensunabhängiger prädiktiver Faktor für das Erreichen einer Diabetesremission identifiziert werden [12, 13].

Signifikante Stoffwechseleränderungen in Richtung der nicht-diabetischen Stoffwechsellage - nicht jedoch das Erreichen der Remission nach aktueller Definition - stellen sich bereits durch eine moderate konservative Gewichtsabnahme, beispielweise $8 \pm 2\%$ des Körpergewichts, ein [14].

Die beobachtete schnelle Verbesserung der Stoffwechsellage nach chirurgischer Intervention, welche bereits innerhalb der ersten Woche nach Operation eintritt, lässt sich dagegen nicht allein durch die Gewichtsabnahme erklären, da sich die Änderungen bereits vor einer signifikanten Gewichtsabnahme einstellen [15].

Lim et al. lieferten im Jahr 2011 einen entscheidenden Hinweis bezüglich dieser Frage, indem sie darlegten, dass eine Diabetesremission auf konservativem, diätetischem Weg mithilfe einer hypokalorischen Formuladiät (Energiegehalt: 600 kcal/Tag) möglich ist. Sie stellten somit die akute Energierestriktion und Verlust von Fettgewebe in Pankreas und Leber in den Vordergrund. Damit traten sie ebenfalls einer Diskussion über die Bedeutung der bei verschiedenen Operationsverfahren unterschiedlich stark veränderten Sekretion von Inkretin-Hormonen, wie dem Glucagon-like-peptide-1, entgegen [16, 17].

Durch eine später veröffentlichte Studie konnte aufgezeigt werden, dass der hier beobachtete Verlust von pankreatischen Fettgewebe durch Gewichtsabnahme bei PatientInnen mit T2DM ein pathognomonisches Phänomen ist und bei einer Vergleichsgruppe mit ungestörter Glucose-toleranz nicht zu beobachten ist [18].

Es konnte allerdings erst kürzlich systematisch nachgewiesen werden, dass sich aus der Art der Erreichung der Remission eines T2DM durch entweder konservative oder invasive Gewichtsabnahme keine klinisch relevanten Stoffwechselunterschiede ergeben [19].

Diese Studien lassen den Schluss zu, dass eine Diabetesremission auch durch konservative Behandlung möglich ist. Somit könnte sie sich als realistisches Therapieziel für eine Vielzahl von Menschen mit durch Adipositas bedingten T2DM erweisen, für die ein operativer Eingriff nicht infrage kommt. Denn trotz der unbestreitbaren medizinischen Vorteile, die die bariatrischen Chirurgie mit sich bringt, sind die Gründe gegen einen solchen Eingriff mannigfaltig. So sind Infektionen, intraabdominale Blutungen, Anastomoseninsuffizienzen oder mechanische Ileus nur Teile einer Liste an möglichen Komplikationen, die zu einer Reoperationsrate von 2-13 % je nach Studie führen [20, 21].

Dennoch bestehen noch einige Unklarheiten. Zum einen stellt sich die Frage, ob es sich bei der Diabetesremission um ein langfristig andauerndes Phänomen handelt, das auch unter realistischen und allgemeinen Versorgungsbedingungen erreichbar ist. Des Weiteren müssen zugrundeliegende Mechanismen untersucht und mögliche prädiktive Faktoren identifiziert werden, um Therapieerfolge einschätzen zu können und die Intervention gezielt denjenigen Menschen zu empfehlen, die am wahrscheinlichsten von ihr profitieren. Denn obwohl die meisten EmpfängerInnen die Intervention nach Beendigung als einfacher als erwartet einstufen, stellt sie einen nicht zu vernachlässigenden psychischen Kraftakt für Teilnehmende dar und erfordert langfristige Gewichtskontrolle [22]. Dies gilt es vor Beginn abzuwägen.

Einige der genannten Aspekte konnten bereits aufgedeckt werden. In einer Studie wurde die Dauer seit Feststellung der Diabetesdiagnose als den Erfolg der Diabetesremission diskriminierender Faktor identifiziert. In dieser Untersuchung lagen die Erfolgsaussichten auf das Erreichen eines nicht-diabetischen Nüchtern-glucoseniveaus bei StudienteilnehmerInnen mit einer Diabetesdauer <4 Jahre mit 87 % deutlich über den 50 % der Vergleichsgruppe mit >8 Jahren Diabetesdauer [23].

Ebenfalls konnte schon früh gezeigt werden, dass eine diätetisch erzielte Diabetesremission über mindestens ein halbes Jahr nach Beendigung der Intervention anhalten kann [24].

Die mit 306 TeilnehmerInnen angelegte randomisierte, kontrollierte Interventionsstudie „DiRECT“ adressierte ebenfalls einige der genannten Fragen [25]. Ähnlich den Vorgängerstudien erhielten TeilnehmerInnen der Interventionsgruppe eine hypokalorische Formuladiät, mithilfe derer sich bei 46 % dieser Gruppe eine Diabetesremission (hier HbA1c <6,5 % nach 12 Monaten) einstellte. Innerhalb der Gruppe der StudienteilnehmerInnen mit erfolgreicher Diabetesremission gab es einen positiven quantitativen Zusammenhang zwischen dem Grad der Gewichtsabnahme und der Remission. So ergaben sich bis zu 86 % Diabetesremission bei Teilnehmenden mit einer Gewichtsabnahme von 15 kg oder mehr. Dass die Studie an Praxen der Primärversorgung in Großbritannien durchgeführt wurde untermauert die Idee, derartige Ernährungsinterventionen

großflächig und niederschwellig anbieten zu können [25]. Auch zwei Jahre nach Interventionsbeginn hielt die Diabetesremission bei 35,6 % der Interventionsgruppe und 64 % der StudienteilnehmerInnen an, die im Rahmen der Intervention 10 kg oder mehr an Gewicht verloren [26].

Wichtig ist es hier hervorzuheben, dass Interventionen, wie die 12-wöchige hypokalorische Formuladiät im Falle von „DiRECT“, ausschließlich medizinisch supervidiert eingesetzt werden dürfen und sie von einer sich anschließenden, strukturierten Wiedereinführung der normalen Diät begleitet sein müssen [25, 27].

Detailliertere Aufschlüsselungen der Interventionsgruppe ergaben als für die Remission notwendige Bedingung den Verlust von hepatischem- sowie pankreatischem Fettgewebe und als notwendig, hinreichende Bedingung das Regenerationsvermögen der pankreatischen β -Zellen. Dies wurde durch die Fähigkeit zur Steigerung einer initial erniedrigten, schnellen Insulinantwort definiert [28]. Erweist sich die Bedingung des Regenerationsvermögens der β -Zellen als zutreffend und wird die Remission erzielt, ist eine über die Zeit graduelle Wiederherstellung der normalen β -Zellfunktion zu beobachten. So erreichten ProbandInnen mit erfolgreicher Remission innerhalb eines Jahres eine maximale Insulinsekretion ähnlich der Kontrollpopulation und konnten diese auch über das folgende Jahr aufrecht erhalten [29].

Non-ResponderInnen wiesen zu Beginn der Intervention eine im Vergleich längere Diabetesdauer, höhere HbA1c Werte, eine verminderte Nüchtern-Insulinausschüttung sowie eine verminderte Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum auf [28]. Diese Resultate sind kongruent mit in einer früheren Studie identifizierten positiv prädiktiven Faktoren, namentlich einer relativ erhöhten Nüchtern-Insulinausschüttung und einer durch die Ernährungsintervention normalisierten schnellen Insulinausschüttung bei ResponderInnen [24].

Die stärkste Korrelation mit dem Erreichen einer Diabetesremission konnte bisher für die Höhe des Gewichtsverlustes nachgewiesen werden [25, 26, 30]. Da diese naturgemäß nicht zu Beginn der Intervention herangezogen werden kann, sollte die Verwendung des Begriffes „prädiktiv“ hier nur im statistischen Sinne geschehen. Als bereits zu Beginn zu erhebende Faktoren mit prädiktivem Vorhersagewert konnten jedoch die Anzahl der antidiabetischen Medikamente, die Höhen von Triglyceriden (TAG) und Gamma-Glutamyltransferase (gGT) im Serum, sowie eine bessere subjektive Lebensqualität bzw. der verminderte Bedarf an stimmungsaufhellender Medikation identifiziert werden. Die Aussagekraft dieser Baseline-Parameter war jedoch nicht ausreichend, um eine Therapieentscheidung gegen den Beginn einer Ernährungsintervention zur Diabetesremission zu rechtfertigen [30].

Es kann folglich angenommen werden, dass die Remission eines manifesten T2DM durch schnelle Gewichtsabnahme und unter den Bedingungen der Primärversorgung möglich ist [22-25]. Sie stellt sich bei einem signifikanten Teil der InterventionsempfängerInnen ein und kann über einen mindestens 2 Jahre andauernden Zeitraum erhalten bleiben [26]. Zugrundeliegende Mechanismen wie die Regeneration der β -Zellfunktion sind identifiziert und prädiktive Faktoren wie die Höhe von TAG und gGT oder die subjektiv empfundene Lebensqualität konnten identifiziert werden [16, 28, 30]. Mit Ausnahme der Diabetesdauer hatten diese Prädiktoren jedoch nur begrenzte Aussagekraft und stellen daher keine harten Entscheidungskriterien dar [30].

Die „Twin Cycle Hypothesis“ - Das der Diabetesremission zugrundeliegende pathophysiologische Erklärungsmodell

Viele der klinischen Studien zur Diabetesremission wurden zur Überprüfung der im Jahr 2008 von R. Taylor postulierten Theorie „twin cycle hypothesis“ konzipiert (Abbildung 1).

Die folgende Zusammenfassung des Modells, welches die pathophysiologischen Zusammenhänge von übermäßiger, andauernder Energiezufuhr und der Manifestation von T2DM beschreibt, geschieht in Adaptation der Publikationen [31-34].

Die „twin cycle hypothesis“ basiert auf der Beobachtung, dass sich Leberfettgehalt besonders drastisch durch Fasten reduzieren lässt und dies zeitgleich mit einer Verbesserung der hepatischen Insulinsensitivität sowie der Nüchtern-glucose im Plasma einhergeht [14, 31]. Das Konzept wird neben den Ergebnissen aus den im nächsten Abschnitt erläuterten klinischen Studien auch durch aktuelle molekularbiologische Erkenntnisse gestützt, beispielsweise durch die Beschreibung der Mechanismen hinter fettinduzierter hepatischer Insulinresistenz oder der Reversibilität fettinduzierter Dedifferenzierung pankreatischer β -Zellen [35-37].

Der Einstieg in den durch die „twin cycle hypothesis“ beschriebenen Teufelskreis besteht in einer den täglichen Bedarf übersteigenden Aufnahme von Kohlenhydraten. Solche überschüssig zugeführten Kohlenhydrate unterlaufen in der Leber der De-novo-Lipogenese, wodurch Fettsäuren entstehen, welche zum einen nach peripher exportiert werden und zum anderen in der Leber selbst akkumulieren. Dieser metabolische Prozess unterliegt der Kontrolle des anabolen Hormons Insulin und stellt eine physiologische Antwort auf positiv balancierte Kohlenhydratzufuhr dar. Beschleunigt ist der Ablauf bei Personen mit peripherer Insulinresistenz zu beobachten, bei denen subsequent erhöhte (portalvenöse) Insulin- und Glucosespiegel vorliegen.

Steigt der Leberfettgehalt infolge der Energiezufuhr über ein bestimmtes Maß hinaus an, entwickelt sich in den Hepatozyten eine Insulinresistenz mit der Folge des Wegfalls der Unterdrückung der Gluconeogenese. Dies wiederum hat eine Anhebung des Blutglucosespiegels über normale Schwankungen hinaus zur Folge. Es entwickelt sich somit ein sich selbst verstärkender Effekt, da das einer glucoseabhängigen Ausschüttung unterliegende Insulin Hepatozyten im beschriebenen Maße stimuliert und der Leber gleichzeitig ein erhöhtes Glucoseangebot vorliegt.

Währenddessen füllen von der Leber in Form von Lipoproteinen exportierte Fettsäuren die subkutanen Speicher bis zu einer individuellen Kapazitätsgrenze auf. Nach Erreichen dieser sammeln sich die Fette auch in anderen Geweben an (ektope Fettablagerung). Ebenso im und um das Pankreas, was zur Beeinträchtigung der glucoseabhängigen Insulinausschüttung und in der Folge erhöhten postprandialen Blutglucosespiegeln führt. Dies wirkt sich im beschriebenen Maße auf die metabolischen Abläufe in der Leber aus und es etabliert sich ein sich selbst befeuerndes System, welches eine Dedifferenzierung von β -Zellen bewirkt und in der klinischen Manifestation eines T2DM münden kann.

Teil der Hypothese ist es, dass der Kreislauf durch Negativbilanzierung der Kohlenhydratzufuhr durchbrochen werden könne. Sofern die β -Zellen zu diesem Zeitpunkt noch keine irreversible Schädigung erfahren haben, sei eine Rückkehr zur Ausgangssituation möglich. Dieser individuelle Zeitpunkt könne auch nach erfolgter klinischer Manifestation der Diabeteserkrankung liegen.

Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zelle und damit Umwandlung in eine Effektorzelle wird die Interaktion des CD28-Rezeptors auf der naiven CD4⁺ T-Zelle und dem kostimulatorischen B7-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle benötigt. Der B7-Komplex wird aus den beiden Molekülen CD80 und CD86 zusammengesetzt. Finden diese beiden Prozesse statt, kann die naive CD4⁺ T-Zelle unter Einwirkung des lokalen Cytokinmilieus in unterschiedliche T-Effektorzellen differenzieren [38].

Dem angeborenen Immunsystem kommt eine Schlüsselrolle in der akuten Erregerabwehr und Vermittlung der adaptiven Immunantwort zuteil. Über „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), zu denen die membranständigen „Toll-like Receptors“ (TLRs) und zytosolischen „NOD-like Receptors“ gehören, identifizieren Monozyten und andere Zellen des angeborenen Immunsystems potentiell pathogene Stimuli. Von diesen Rezeptoren detektierte Moleküle sind mit Erregern oder Gewebsschädigung assoziiert und lösen inflammatorische Kaskaden aus, die beispielsweise in der Ausschüttung von Effektormolekülen, Cytokinen und Chemokinen enden [39]. In letzter Zeit häufen sich jedoch die Hinweise dafür, dass einige dieser Rezeptoren ebenfalls durch Moleküle aktiviert werden, die dem Organismus mit kohlenhydrat- und fettreicher Nahrung beigegeführt wurden. Beispiele für solche Moleküle sind freie Fettsäuren, oxidiertes LDL oder Cholesterolkristalle [40]. Diese von der Ernährung getriggerte, „sterile“ Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems steht in direktem Zusammenhang mit der subklinischen Inflammation, wie sie bei vielen von Energieüberladung des Organismus gekennzeichneten Erkrankungen wie Adipositas, T2DM oder Arteriosklerose vorliegt [40-43].

Makrophagen sind im Gewebe aktive Effektorzellen, die sich aus Monozyten entwickeln. Während der Embryonalperiode wandern Monozyten in verschiedene Gewebe ein und bilden dort einen Pool gewebsspezifischer, residenter Makrophagen [38]. Makrophagen werden typischerweise anhand ihres Aktivierungszustandes charakterisiert und eingeteilt in klassisch- (M1) oder alternativ aktiviert (M2) [44]. Nach diesem Modell halten M1 differenzierte Makrophagen antimikrobielle Eigenschaften wie die Sekretion von Effektormolekülen oder proinflammatorischen Cytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF und IL-12 inne. Im Gegensatz dazu stehen M2 differenzierte Makrophagen, die immunsuppressive Faktoren wie IL-10, IL-1RA, TGF- β - oder Arginase sezernieren [44, 45]. Die Einteilung in klassisch- und alternativ aktiviert stellt nur die beiden Extreme eines Spektrums dar, sie ist in der Literatur jedoch sehr gebräuchlich und hilfreich im Verständnis des inflammatorischen Geschehens bestimmter Gewebe [46].

In je nach Gewebe unterschiedlichem Maße werden zirkulierende Monozyten durch Entzündungsprozesse rekrutiert und migrieren daraufhin zum Ort des Geschehens. Dort differenzieren sie zu Makrophagen und ergänzen den Pool der gewebständigen Makrophagen. Diese Prozesse sind bisher überwiegend im Mausmodell beschrieben. In diesem übernehmen inflammatorische Ly6C⁺ Monozyten die Aufgabe der Migration in die Gewebe. Nach Migration differenzieren sie zu M1-Makrophagen. Das humane Pendant zu Ly6C⁺ Monozyten stellen CD14⁺ (klassisch aktivierte) Monozyten dar. Sie halten inflammatorische und phagozytische Eigenschaften inne. Es existieren daneben noch CD16⁺ (alternativ aktivierte) Monozyten, welche antivirale und patrouillierende Aufgaben erfüllen (Tabelle 1). Das Mausmodell ist nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar, weist jedoch hinlängliche Parallelen auf [47].

Diese Überlegungen und die im nächsten Abschnitt vorgestellten Erkenntnisse zu Monozyten und Makrophagen im Kontext des T2DM stellen die Grundlage für unsere Untersuchungen an zirkulierenden Monozyten (Methoden- und Ergebnisteil) dar. Dieser Zelltyp ist durch sein Vorkommen im peripheren Blut mit hinnehmbarer Invasivität erreichbar. Ein ganzheitlicheres Bild ergäbe sich aus der Zusammenschau von Monozyten und residenten Makrophagen in Fett-, Leber- und

Pankreasgewebe. Im humanen System sind diese Zellen jedoch nur schwer zu isolieren und analysieren.

Monozytensubtypen in Mensch und Maus				
Spezies	Subgruppe	Oberflächenmarker	Anteil Monozyten	Hauptaufgabe
Mensch	Klassisch aktiviert	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	~ 85 %	Phagozytose und Inflammation
	Intermediär	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	~ 5 %	Inflammation
	Alternativ aktiviert	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	~ 10 %	Patrouille und antivirale Effekte
Maus	Ly6C ⁺	Ly6C ⁺	~ 60 %	Phagozytose und Inflammation
	Ly6C ⁻	Ly6C ⁻	~ 40 %	Patrouille und Gewebsregenerierung

Tabelle 1: Monozyten und ihre Subtypen in Mensch und Maus, in Anlehnung an [47].

Monozyten und Makrophagen in Adipositas und T2DM

Viel Aufmerksamkeit in der Forschung zur Pathogenese des T2DM wurde bisher der Rolle der Inflammation geschenkt. Hierbei zeichnet sich insbesondere für das angeborene Immunsystem eine Schlüsselposition in der Regulation der Homöostase des Pankreas ab [48, 49].

Wie elementar diese Verbindung ist zeigt sich beispielsweise darin, dass das Pankreas von Mäusen, die durch genetische Veränderungen keine Makrophagen ausbilden, eine veränderte Organogenese durchläuft und die Tiere in der Folge eine verminderte β -Zellmasse aufweisen [50].

Die Verbindung von angeborenem Immunsystem und Pankreashomöostase besteht auch beim Menschen. So konnte gezeigt werden, dass das proinflammatorische Cytokin Interleukin (IL) -1 β einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung eines T2DM darstellt [51]. Hauptquelle von IL-1 β sind Monozyten und Makrophagen, beides Vertreter des angeborenen Immunsystems [52]. Eine klinische Studie an PatientInnen mit T2DM zeigte nach Blockade der Interaktion von IL-1 β mit seinem Rezeptor IL-1R einen signifikant verminderten Anteil an glykiertem Hämoglobin, dem proinflammatorischen Cytokin IL-6, sowie C-reaktivem Protein (CRP) und eine erhöhte Sekretion von C-Peptid. Diese Ergebnisse weisen auf eine verbesserte Glucosehomöostase, verminderte systemische Inflammation und wiedererlangte β -Zellfunktion hin [53].

Histologische Untersuchungen an Pankreasgewebe von Organspendern mit T2DM oder T1DM unterstreichen die Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese des T2DM. So kann anhand des vorherrschenden Immunzelltyps die Insulitis der beiden Erkrankungen unterschieden werden. Das Pankreasgewebe von PatientInnen mit T1DM ließ sich in dieser Arbeit durch ein erhöhtes Aufkommen an T-Zellen charakterisieren, während sich Makrophagen als der dominierende Immunzelltyp bei PatientInnen mit T2DM erwiesen [54].

An T2DM leidende Menschen weisen meist einen erhöhten Body Mass Index (BMI) auf, weshalb die vorigen Erkenntnisse auch damit übereinstimmen, dass signifikant mehr Makrophagen im Fettgewebe von Personen mit BMI >30 kg/m² als bei Personen mit BMI <30 kg/m² gefunden werden konnten [55].

Zudem exprimieren fettgewebsresidente Makrophagen aus normalgewichtigen Mäusen Gene, die mit dem eher antiinflammatorischen M2-Phänotyp in Verbindung stehen. Fettgewebsresidente Makrophagen aus adipösen Mäusen weisen jedoch im Genexpressionsprofil in Richtung des proinflammatorischen M1-Phänotyps [56]. Ebenfalls im Mausmodell inhibierten Makrophagen vom M1-Typ die insulinabhängige Aufnahme von Glucose in Fettzellen. Makrophagen vom M2-Typ hingegen hielten diese Eigenschaft nicht inne [45].

Anpassungsfähigkeit von Zellen des angeborenen Immunsystems

Ein relativ neues Konzept ist das Verständnis von Zellen des angeborenen Immunsystems als Träger eines immunologischen Gedächtnisses. Diese Funktion wurde bislang nur Vertretern des adaptiven Immunsystems, wie B- und T-Zellen zugeschrieben. Das Phänomen wurde 2011 erstmals unter dem Namen „Trained Immunity“ beschrieben und bezeichnet einen langanhaltenden, hypo- oder hyperresponsiven Zustand in Zellen des angeborenen Immunsystems als Antwort auf die Begegnung mit einem bestimmten Stimulus. Die Entwicklung dieser Gedächtnisfunktion ist mit Verschiebungen im zellulären Stoffwechsel verbunden, welche über epigenetische Veränderungen, das heißt Histonmodifizierungen und veränderte RNA-Expressionsmuster, eine verstärkte Transkription und Sekretion proinflammatorischer Cytokine und Effektormoleküle bei Restimulation der Zelle bewirken [57-59].

Beispielsweise kann „Trained Immunity“ über die Stimulation zytosolischer „NOD-like Receptors“ in Monozyten oder Makrophagen vermittelt werden [60]. Die Aktivierung dieses Rezeptors kann zum Aufbau des „NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3“ (NLRP3)-Inflammasoms und folglich Freisetzung der proinflammatorischen Cytokine IL-1 β und IL-18 führen, welche besondere Relevanz in der Entstehung von T2DM innehalten [61, 62]. Als Inflammasom werden zytosolische Proteinkomplexe bezeichnet, welche sich erst nach Stimulation zusammenfügen. Nach Aufbau des Inflammasoms wird durch Rekrutierung des Adaptor-Proteins „ASC“ das Protein „Caspase 1“ aktiviert, welches durch seine proteolytische Aktivität unter anderem den Übergang der Propeptide von IL-1 β und IL-18 in ihre aktive Form katalysiert [63].

Es konnte gezeigt werden, dass „Trained Immunity“ auch im Kontext nicht übertragbarer Erkrankungen, wie T2DM, relevant ist [60, 64]. Die bei vielen dieser Erkrankungen vorliegende (subklinische) Inflammation geht zu einem Großteil von Zellen des angeborenen Immunsystems aus [40].

Im Mausmodell konnte „Trained Immunity“ durch hochkalorische, fettreiche Diät induziert werden [60]. In Monozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark waren in dieser Studie epigenetische Veränderungen in Richtung einer verstärkten Immunantwort und gesteigerten Proliferation nachweisbar. Beachtenswerterweise konnten diese Veränderungen nicht in Mäusen induziert werden, bei denen das NLRP3-Inflammasom genetisch ausgeknockt wurde. Dadurch wird das NLRP3-Inflammasom weiter in den Fokus der Mediation ernährungsbedingter Inflammation gerückt [60].

Verschiedene diätassoziierte Metabolite niedrigen Molekulargewichts konnten bereits mit der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Verbindung gebracht werden und einige sind im Hinblick auf die diabetische Stoffwechsellage von besonderem Interesse. Hierzu gehören unter anderem die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure, Ceramide aus fettgewebsstämmigen Makrophagen und Glucose [62, 65-67]. Damit im Einklang stehend konnte gezeigt werden, dass Fasten bei adipösen PatientInnen mit T2DM zu einer verminderten Expression des NLRP3-Inflammasoms und IL-1 β , sowie einer verbesserten Insulinsensitivität und Glucosekontrolle führt [68].

Die Induzierbarkeit eines proinflammatorischen Status durch westliche Ernährungsgewohnheiten und die Reversibilität durch Fasten wirft die Frage auf, ob immunologische Akteure in Bezug auf Ernährung für den menschlichen Organismus allein schädliche Auswirkungen

bereithalten, oder ob ihnen auch eine physiologische Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Homöostase inne steht.

In ebendiese Richtung weist eine Studie, die in Mäusen erhöhte IL-1 β Werte als Antwort auf den postprandialen Blutglucoseanstieg nachweisen konnte, wodurch wiederum die Insulinausschüttung befördert wurde. Insulin beförderte daraufhin die Aufnahme von Glucose und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in M1-differenzierten Makrophagen [66]. An diesem Beispiel ist die Komplexität der Beziehung von Inflammation und Glucosestoffwechsel gut zu beobachten. Die Begünstigung der Insulinausschüttung durch IL-1 β beschreibt einen die Glucosehomöostase unterstützenden Prozess, ähnlich der Wirkweise von Inkretinhormonen. Zeitgleich jedoch steigt durch die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auch die Gefahr der Exazerbation eines proinflammatorischen Status. Eine eindimensionale Betrachtung von Inflammation in der Pathogenese von lebensstilbedingten Erkrankungen erscheint nach Betrachtung dieser Ergebnisse ungerechtfertigt.

Ebenfalls in Richtung einer physiologischen Verbindung der beiden Systeme weisen Ergebnisse die zeigen, dass Fasten über den Ketonkörper β -Hydroxybutyrat das NLRP3-Inflammasom inhibiert und die Sekretion von IL-1 β und IL-18 herabsetzt. Die Studie wurde in vivo an Mäusen und in vitro an humanen Makrophagen durchgeführt und konnte ebenfalls darlegen, dass inflammatorisch differenzierte M1-Makrophagen weniger mit dem Ketosestoffwechsel in Verbindung stehende Enzyme exprimieren, als ihre M2-differenzierten Artgenossen [69]. Dies unterstreicht die Rolle des Fastens in der Orchestrierung von Makrophagendifferenzierung und des inflammatorischen Status und ist daher im Vorfeld dieser Arbeit von großer Bedeutung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Energiestoffwechsel einen starken Einfluss auf die Zellen des angeborenen Immunsystems hat [51, 52, 55, 56]. Für den Organismus äußert sich diese Verbindung jedoch nicht einseitig als negativ, sondern stellt vielmehr eine komplexe Beziehung mit regulatorischen Elementen dar [50, 66, 69]. Durch übermäßige Nahrungszufuhr kann diese Beziehung aus dem Gleichgewicht gebracht werden und sich ein proinflammatorischer Status etablieren, der die Entstehung von Erkrankungen wie T2DM begünstigt [60, 64-67]. Gegenteilig können proinflammatorische Akteure durch Fasten reguliert werden und so einem sich verschlimmernden proinflammatorischen Status Einhalt gebieten [68, 69].

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Zusammenschau von Ergebnissen aus immunologischen und klinischen Studien weist auf eine enge Verbindung von Ernährung, Inflammation und Manifestation von T2DM hin. Diese Verbindung dient im physiologischen System der Erhaltung der Glucosehomöostase und befeuert unter dem Einfluss übermäßiger Energiezufuhr die Progression einer Diabeteserkrankung. Jedoch ist dies nicht als Einbahnstraße zu verstehen, da die Prozesse unter bestimmten Voraussetzungen durch Energierestriktion reversibel sind.

Diabetesremission durch hypokalorische Diät wurde bisher nicht unter immunologischen Gesichtspunkten untersucht und auch im der Remission zugrundeliegenden Erklärungsmodell „twin cycle hypothesis“ spielen immunologische Aspekte keine Rolle. Angesichts der zentralen Rolle, die inflammatorischen Prozessen in der Pathogenese des T2DM zukommt, ist es von herausragender Bedeutung, diesem Aspekt mehr Gewichtung zukommen zu lassen.

Wir zielen mit unserer Studie deshalb darauf ab, die immunologischen Veränderungen bei diätetisch herbeigeführter Diabetesremission besser zu verstehen und ihre Rolle bei der Mediation der Remission einzuordnen.

Trotz der Aussicht auf kurative Therapie unter Verzicht auf die Risiken eines operativen Eingriffes, bedingt die konservative Diabetesremission die strenge Einhaltung einer hypokalorischen Diät über mehrere Monate hinweg und kann für InterventionsempfängerInnen mit nicht unerheblichem Stress einhergehen. Um besser herausarbeiten zu können, ob individuelle PatientInnen diese Anstrengung auf sich nehmen sollten, halten wir es für besonders wichtig, prädiktive Faktoren für den Therapieerfolg zu identifizieren.

Um dies zu bezwecken begleiteten wir ProbandInnen während der Interventionsphase zum Erreichen der Diabetesremission (Methodenteil) und erhoben bei ihnen zu drei Zeitpunkten klinische sowie immunologische Daten, die wir für anschließende Analysen und Modellierungen heranzogen (Abbildung 2, Seite 20).

Folgende Hypothesen sollen durch die vorliegende Arbeit untersucht werden:

Primäre Hypothese

- Eine Diabetesremission durch hypokalorische Ernährungsintervention ist grundsätzlich möglich, jedoch abhängig von der Erkrankungsdauer.

Sekundäre Hypothesen

- Den Erfolg der Diabetesremission vorhersagende Faktoren sind bereits zu Beginn oder im frühen Verlauf der hypokalorischen Ernährungsintervention erhebbbar.
- Die durch die hypokalorische Ernährungsintervention herbeigeführten Stoffwechselveränderungen wirken sich auf Funktionalität, Phäno- und Genotyp von Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere Monozyten, aus.

Folgende Endpunkte wurden daher formuliert:

Primärer Endpunkt

- Erreichen der Diabetesremission nach ≥ 15 kg Gewichtsverlust oder Abschluss der dreimonatigen Ernährungsintervention, definiert als HbA1c $< 6,5$ % oder Nüchternblutglucose < 126 mg/dl.

Sekundäre Endpunkte

- Identifikation von Faktoren, aus denen sich mögliche Vorhersagen über das Ausmaß der Stoffwechselveränderungen durch die hypokalorische Ernährungsintervention ableiten lassen.
- Messbare Veränderungen der Reaktionsfähigkeit von Zellen des angeborenen Immunsystems, deren Phäno- oder Genotyp im Rahmen der Diabetesremission.

Methoden

Studiendesign

FAIR (**F**asting induced **I**mmunometabolism and **R**emission of Diabetes) ist eine randomisierte, kontrollierte Interventionsstudie, die den Erfolg der Diabetesremission durch hypokalorische Diät von ProbandInnen mit T2DM in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer (< 4 Jahre nach Erstdiagnose/ > 8 Jahre nach Erstdiagnose) untersucht. Im Rahmen der Studie werden Phänotyp und Funktionalität, sowie das Transkriptom von Zellen des angeborenen Immunsystems vor, während und nach der Intervention untersucht. Hierzu werden Durchflusszytometrie, Immunzellstimulation und (epi-) genetische Analysen durchgeführt. Die Studie wird an der Charité – Universitätsmedizin Berlin in Kooperation mit dem Institut für Angeborene Immunität

der Universität Bonn durchgeführt und von der "European Foundation for the Study of Diabetes" (EFSD) finanziert.

Während des Beobachtungszeitraums wurden zu drei Hauptvisiten Studiendaten erhoben (V1 zu Beginn der Intervention; V2 sieben Tage nach Interventionsbeginn, V3 drei Monate nach Interventionsbeginn oder bei Erreichen von 15 kg Gewichtsverlust).

Die Erhebung von anthropometrischen Daten mittels Ganzkörper-Bodyplethysmographie (BodPod), der Mahlzeitentest (MTT) und die Bestimmung des HbA1c-Wertes fanden jeweils zu Beginn (V1) und Ende (V3) des Beobachtungszeitraums statt. Alle weiteren Daten wurden zu allen drei Zeitpunkten (V1, V2, V3) erhoben.

Die vorliegende Arbeit stellt die Analyse der ersten 41 StudienteilnehmerInnen dar, von denen Zwei die Studie vor Vollendung abbrachen.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité Berlin am 12.05.2020 genehmigt (Auftragsnr.: EA4/019/20). Alle TeilnehmerInnen wurden über die Studie aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung.

Studienpopulation

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Studienpopulation umfasst 41 TeilnehmerInnen (davon 2 Dropouts). Sie wurden zwischen August 2020 und Juli 2021 in der medizinischen Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin am Campus Benjamin Franklin rekrutiert und stellen eine Teilmenge der zum aktuellen Zeitpunkt fortlaufenden FAIR-Studie dar.

Eingeschlossen wurden Frauen und Männer mit T2DM, einem BMI zwischen 27-45 kg/m² und der Bereitschaft, die Intervention in Form einer dreimonatigen hypokalorischen Formuladiät zu durchlaufen. Ausschlusskriterien umfassten unter anderem eine bestehende Insulinpflichtigkeit, bestimmte mit der Intervention nicht vereinbare Vorerkrankungen wie Leber- oder konsumierende Erkrankungen, eine bereits stattgefundene Gewichtsabnahme von ≥5 kg in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn oder eine zum Studienzeitpunkt bestehende medikamentöse Therapie mit Glucocorticoiden (Tabelle 2).

Um eine gleiche Verteilung über mögliche Confounder hinweg zu erhalten, wurden die StudienteilnehmerInnen nach Geschlecht (m/w), Alter (<50/≥50 Jahre), BMI(<30/≥30 kg/m²) und Diabetesdauer (<4 / >8 Jahre) gematched in die Studie eingeschlossen.

Ein- und Ausschlusskriterien der FAIR-Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter von 18-80 Jahren	Unverträglichkeit gegen Bestandteile der Formulanahrung
T2DM (Zeit seit Diagnose <4 v. >8 Jahre)	Konsumierende Erkrankungen
BMI 27-45 kg/m ²	Bekannte Lebererkrankung (PSC, PBC, Leberzirrhose)
Einwilligung in die Untersuchung mit Bereitschaft zum Einhalten der Ernährungsvorgaben	>3-fach erhöhte Transaminasen unklarer Ursache
Bestehende Krankenversicherung, damit im Falle von Zufallsbefunden diese auch abgeklärt werden können	Alkoholabusus oder Drogenkonsum
	T1DM
	Schwere Nieren- oder Herzerkrankung
	Retinopathie
	Essstörung
	Schwangerschaft oder Stillzeit
	Medikamentöse Therapie mit Cortison oder anderen Glucocorticoiden
	Gewichtsabnahme ≥5 kg in den letzten drei Monaten

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien der FAIR-Studie

Intervention

Nach erfolgreichem Screening und Studieneinschluss begannen die StudienteilnehmerInnen die Intervention im Anschluss an die Eingangsuntersuchung V1. Die Intervention bestand im vollständigen Ersatz der normalen Ernährung durch eine hypokalorische Formuladiät, begleitet von einer täglichen Ration nicht stärkehaltigen Gemüses. Die Portionen wurden individuell so berechnet, dass Frauen über den Tag verteilt 600 kcal und Männer 800 kcal zu sich nahmen.

Als Formulanahrung wurde entweder Hepafast® (Bodymed AG; Kirkel, Deutschland) oder Optifast®-professional (Nestlé Health Science GmbH; Frankfurt am Main, Deutschland) gereicht, jeweils so dosiert, dass sich der Energiegehalt nicht unterschied.

Um einen begleitenden Rahmen zu bieten wurden die ProbandInnen während der Intervention in regelmäßigen Abständen telefonisch kontaktiert und konnten auf Wunsch die Studienambulanz besuchen.

Nach Beendigung der Intervention erhielten die ProbandInnen eine supervidierte Wiedereinführung ihrer normalen Diät.

Datenerhebung und -analyse

Die Studienvisiten wurden an der Hochschulambulanz der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin der Charité am Campus Benjamin Franklin abgehalten. Laborräumlichkeiten für am Visitentag stattfindende Untersuchungen wurden freundlicherweise von der Klinik für Kardiologie der Charité am Campus Benjamin Franklin zur Verfügung gestellt. Die spezifischen Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) wurden in den klinikeigenen Laborräumlichkeiten am Campus Charité Mitte durchgeführt. Abschließende Laborschritte wie die Messung

der Cytokinkonzentrationen wurden in den Laboren unseres Studienpartners, dem Institut für angeborene Immunologie der Universität Bonn, durchgeführt.

Übersicht Datenerhebung

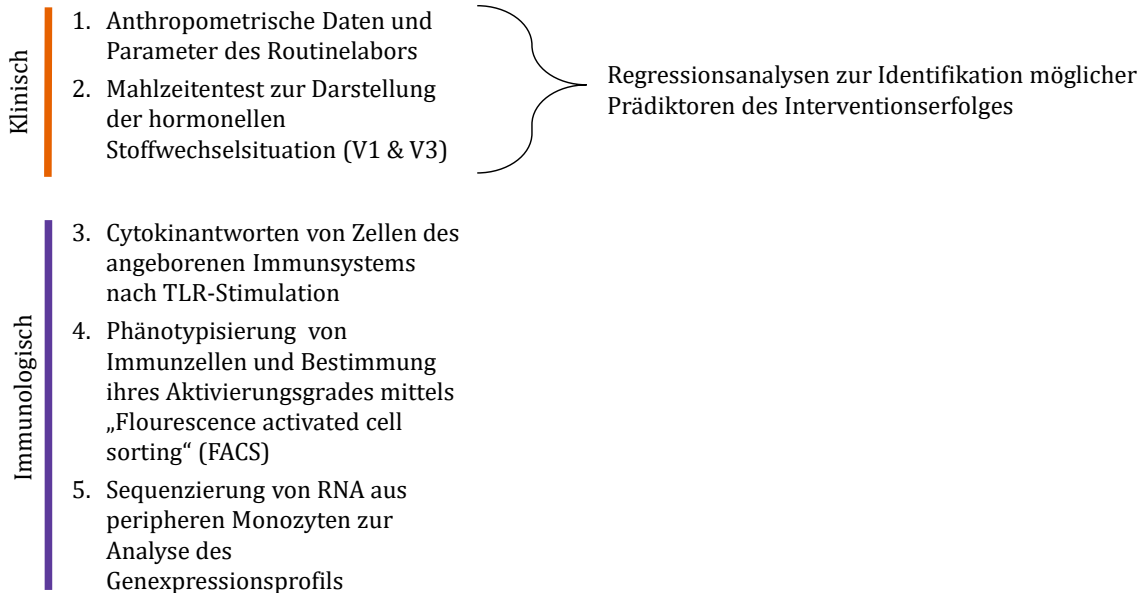


Abbildung 2: Übersicht der Strategie zur Datenerhebung

Während und nach der Interventionsphase wurden bei den ProbandInnen 1.) anthropometrische Daten und Parameter des Routinelabors sowie 2.) Daten zur hormonellen Stoffwechselsituation (Mahlzeitentest) erhoben (1-2 = Klinische Parameter). Aus 1.) und 2.) wurden Regressionsanalysen zur Identifikation möglicher, den Erfolg vorhersagender Faktoren erstellt. Es wurde 3.) die Cytokinantwort nach TLR-Stimulation von Zellen des angeborenen Immunsystems gemessen, 4.) der Phänotyp und Aktivierungsgrad von Immunzellen mittels FACS bestimmt und 5.) die RNA von peripheren Monozyten sequenziert und analysiert (3-5 = Immunologische Parameter).

Klinische Parameter

Während der Erhebung aller klinischen Parameter befanden sich die ProbandInnen im nüchternen Zustand. Alle Blutentnahmen wurden von geschultem Studienpersonal unter Verwendung des Vacuette®-Systems (Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Urinproben wurden von den ProbandInnen zum Zeitpunkt der Visite in der Studienambulanz erbracht.

Anthropometrie

Die Messungen von Körpergröße, Körpergewicht, Hüft- und Taillenumfang fanden an entkleideten ProbandInnen statt. Während der Messungen nahmen die ProbandInnen eine entspannte Stehposition ein. Als Referenzmarke für die Messung des Hüftumfangs dienten die Trochanter majori. Der Taillenumfang wurde an der Hälfte der Strecke zwischen kaudalen zwölften Rippenrändern und den Spinae iliacae anteriores superiores gemessen. Um mögliche Messfehler zu vermeiden, wurden die von Hand gemessenen Parameter doppelt erhoben und bei Abweichungen die Messung wiederholt. Der Taille-Hüft-Quotient (WHR) wurde durch die Division von Taillen- und Hüftumfang errechnet. Für die Berechnung des BMI fand die Formel

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße (m)}^2} \text{ Anwendung.}$$

Anhand der Messung von Luftverdrängung mittels Bod Pod (BodPod®, Cosmed Inc; Concord, USA) wurde die Körperzusammensetzung (Fettmasse und fettfreie Masse) zu V1 und V3 erhoben. Die Körperzusammensetzung wurde zusätzlich zu allen drei Visiten mittels Bioimpedanzmessung (Nutriguard – MS, Data Input GmbH; Pöcking, Deutschland) erhoben.

Blutdruck

Vor der Messung des Blutdrucks legten sich die ProbandInnen hin und ruhten für fünf Minuten. Die Messung fand im Anschluss ebenfalls im liegenden Zustand statt. Gemessen wurde der Blutdruck mittels boso ABI-system 100 (BOSCH + SOHN GmbH u. Co. KG; Jungingen, Deutschland). Die Blutdruckmanschetten wurden nach Herstellerangaben an allen vier Extremitäten angelegt, wonach die automatisierte Messung erfolgte. Die in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden Ergebnisse entstammen den Messungen der linken Extremität. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$MAD = \text{diastolischer Blutdruck} + \frac{1}{3}(\text{systolischer Blutdruck} - \text{diastolischer Blutdruck})$$

Routinelabor

Proben zur Messung der Routineparameter wurden an das hauseigene Labor (Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH; Berlin, Deutschland) übergeben und dort analysiert.

Folgende Parameter wurden zu allen Visiten bestimmt:

- Natrium/Kalium; Chlorid; Magnesium; Kreatinin/GFR; Harnstoff; Harnsäure; Cholesterin; HDL-Cholesterin; LDL-Cholesterin; Triglyceride; AST; ALT; γ -GT; alkalische Phosphatase; C-reaktives Protein; kleines Blutbild; Urin-Stix

Nur zu V1 und V3 wurde bestimmt:

- HbA1c

Mahlzeitentest (MTT)

Der MTT fand bei den ProbandInnen zu den Visiten V1 und V3 statt. Für die Dauer des Tests wurde den ProbandInnen eine Venenverweilkanüle vom Typ BD Venflon™ Pro Safety (Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, USA) in die linke oder rechte Vena mediana cubiti gelegt, über die die regelmäßigen Blutentnahmen stattfanden.

Zu den Zeitpunkten 0'-30'-60'-90'-120'-180' (Zeitangaben in Minuten; Zeitpunkt 0' beschreibt den nüchternen Zustand) wurden jeweils Proben zur Bestimmung von Glucose, Insulin und Glucagon entnommen. Diese wurden mit Ausnahme der Glucoseprobe zentrifugiert (300g, 4°C, 10min), der Überstand abpipettiert und bei -20°C eingelagert. Die Glucosekonzentration im Blut wurde direkt nach Entnahme mittels dem Glucosemessgerät Biosen C-line (EKF-diagnostic GmbH; Barleben, Deutschland) bestimmt und dokumentiert.

Nach der ersten Blutentnahme nahmen die ProbandInnen eine Flüssigmahlzeit bestehend aus 240ml Resource® Protein Drink (Nestlé Health Science GmbH; Frankfurt am Main, Deutschland) und zusätzlich 20g Jubin-Zuckerlösung (Pharma Vertrieb Andreas Jubin; Bochum, Deutschland) zu sich. Insgesamt enthielt die Mahlzeit 49,1g Kohlenhydrate, 22,5g Protein und 8,4g Fett. Die ProbandInnen wurden angehalten, während des Testzeitraums eine angenehme Sitzposition einzunehmen und sich körperlich nicht zu ertüchtigen.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Insulin- und Glucagonkonzentrationen in den gesammelten Proben mittels der ELISA-Technik gemessen. Die beiden ELISA funktionieren nach

dem direkten Sandwich-Prinzip. Das bedeutet, dass ein Antigen (in diesem Fall das Glucagon- bzw. Insulinmolekül) zum Zeitpunkt der Messung zwischen zwei gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtete monoklonale Antikörper eingespannt ist. Der erste Antikörper ist fest mit dem Boden einer 96-Well-Platte verbunden (Coating) und gewährleistet, dass nur Antigene detektiert werden, die sich tatsächlich im Testmedium befinden. Der zweite Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt, welches nach Hinzugabe der entsprechenden Reagenz eine farbliche Reaktion induziert. Durch photospektrometrische Messung der Farbintensität und Abgleich mit Referenzmessungen lässt sich diese quantifizieren und so die Konzentration des Analysats bestimmen.

Bei der Durchführung der ELISAs wurden die Herstellerprotokolle streng eingehalten [70, 71].

Folgende ELISA-Kits kamen zum Einsatz:

- Mercodia Glucagon ELISA (Mercodia AB; Uppsala, Schweden)
- Mercodia Insulin ELISA (Mercodia AB; Uppsala, Schweden)

Aus den Ergebnissen der MTTs wurden die Indices HOMA-IR, ISI-Stumvoll, Matsuda, OGIS sowie PREDIM errechnet. Die hierfür notwendigen Formeln wurden den Primärpublikationen entnommen [72-76].

Leberfettindices

Die Indices „Fatty Liver Index“ (FLI) und „Non-Alcoholic Liver Disease - Liver Fat Score“ (NAFLD-LFS) wurden anhand der in den Primärpublikationen aufgeführten Formeln berechnet [77, 78].

Labor am Tag der Studienvisite

Für die am Untersuchungstag durchgeführten Laborassays wurde den ProbandInnen im nüchternen Zustand 50ml Vollblut entnommen. Zwecks Antikoagulation wurden die Proben nach Entnahme in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gelöst.

Von den 50ml Vollblut wurden 3,6ml für die Stimulationsassays, 1ml zur Isolation von Plasma und 500µl für die Vollblut-Durchflusszytometrie beiseitegestellt. Die verbleibenden 44,9ml Vollblut wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 140ml Gesamtvolumen verdünnt und für die weiteren Laborassays herangezogen.

Plasmaisolation

1ml Vollblut wurde auf zwei 1,5ml Eppendorf Tubes® aufgeteilt und zentrifugiert (400g, 4°C, 10 min). Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein weiteres Eppendorf Tube® pipettiert und bei -80°C zwecks möglicher weiterer Analysen zurückgehalten.

Stimulationsassays

Zur standardisierten Erfassung der Responsivität von Zellen des angeborenen Immunsystems wurden Immunzellen im Vollblut stimuliert und ausgeschüttete Cytokine mit Hilfe des Lumines-MAGPIX® Systems quantitativ gemessen.

Für die Stimulationsassays wurden vor Beginn der Studie Lösungen mit verschiedenen TLR-Stimuli vorbereitet. In der vom Hersteller geforderten Konzentration wurden die Stimuli in RPMI-Zellkulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 1,2ml verdünnt und bis 30 Minuten vor Verwendung bei -80°C gekühlt gelagert. Das entsprechende Volumen RPMI-Zellkulturmedium ohne Stimulus wurde als Negativkontrolle genutzt.

Folgende Stimuli kamen zum Einsatz (Tabelle S1A):

- Lipopolysaccharid (LPS) (C7H14O7)
Bestandteil der Zellmembran von Gram-negativen Bakterien und Ligand von TLR-4 und TLR-2.
- Peptidoglycan (PGN) (C7H14N2O4)
Bestandteil der Zellmembran von Gram-negativen Bakterien und Ligand von TLR-2.
- Imiquimod (R837) (C14H16N4)
Imidazoquinolin, Ligand von TLR-7 und Aktivator des NLRP3-Inflammasoms.
- Resiquimod (R848) (C17H22N4O2)
Imidazoquinolin, Ligand von TLR-7 und TLR-8.
- C-di-AMP (cAMP) (C20H22N10O10P2S2)
Von Bakterien produziertes second-messenger Molekül und potenter Immunstimulator in Säugetieren. Ligand des STING-Rezeptors (Stimulator von Interferongen).

Die aufgetauten Lösungen wurden zum Zeitpunkt der jeweiligen Untersuchung mit je 0,6ml Vollblut gemischt und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (300g, 4°C, 6min). Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Cytokinkonzentrationen wurden zu einem gesonderten Zeitpunkt in den gesammelten Proben gemessen. Hierzu wurde das Kit „ProcartaPlex Hu Cytokine/Chemokine/GF 1 45plex“ verwendet. Das Kit dient der Aufbereitung der Proben für die anschließende Messung mittels Luminex-MAGPIX® (Thermo Fisher Scientific Inc; Waltham, USA). Da eine 1:4 Verdünnung der im Herstellerprotokoll verwendeten Konzentrationen mit dem im Kit enthaltenen Puffer gute Resultate in vorausgehenden Analysen zeigte, haben wir uns für diesen ressourcensparenden Schritt entschieden. Die Durchführung des Assays erfolgte im Übrigen streng nach Herstellerprotokoll [79].

Während der Probenaufbereitung binden die Cytokine an magnetische Beads und farblich markierte Detektionsantikörper. Durch die magnetischen Beads hält das Luminex-MAGPIX®-System die Proben in einem definierten Feld in Position, während es das Feld mit verschiedenen Filtern fotografiert und so die an Cytokine gebundenen Detektionsantikörper erkennen kann. Anhand einer definierten Verdünnungsreihe können im Anschluss die Konzentrationen der Cytokine berechnet werden. Um Änderungen relativ zur Negativkontrolle sichtbar zu machen („fold change“), wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{fold change} = \frac{\text{StCy} - \text{negCy}}{\text{negCy}}$$

StCy = Kombination aus Stimulus & Cytokin

negCy = Entsprechendes Cytokin der Negativkontrolle

Die Analyse der Stimulationsassays wurde an einer Subpopulation von 16 ProbandInnen durchgeführt.

PBMC-Isolation

Vier Falcon™-Tubes wurden mit je 15ml Ficoll-Paque™ gefüllt auf welches je 35ml Vollblut-PBS-Mischung pipettiert wurde. Über den Ficoll-Paque™ entsteht ein Dichtegradient, anhand dessen sich das Blut nach Zentrifugation (700g, Raumtemperatur, 20 min, ungebremstes Auslaufen) in verschiedenen Schichten auftrennt. Durch Entnahme des dem Ficoll-Paque™ direkt aufgelagerten Rings aus peripheren mononukleären Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs))

wurden diese von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Insgesamt zweimal wurden die entnommenen PBMCs im Anschluss gewaschen. Hierzu wurden sie mit PBS vermengt, zentrifugiert (340g, 10min, Raumtemperatur) und nach Verwerfung des Überstandes erneut resuspendiert.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 5ml FACS-Puffer, bestehend aus PBS und 2mM EDTA, gelöst.

Zur Quantifizierung der Zellen wurde ein Aliquot von 10µl PBMC/FACS-Puffer-Gemisch entnommen und die Zellen durch Zugabe von 90µl Trypan-Blau lichtmikroskopisch sichtbar gemacht. Durch Zuhilfenahme einer Neubauer-Zellkammer konnten die Zellen ausgezählt werden. Zur Errechnung der Zellzahl pro ml Lösung wurde folgende Formel angewandt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{A}{4} \times B \times C$$

A = Summe der über die vier Quadranten der Zellkammer ausgezählten Zellen

B = Verdünnungsfaktor der Zellkammer (= 10.000)

C = Verdünnungsfaktor der Färbung (= 10)

Die Zellzahl wurde dokumentiert und zur Volumenberechnung der für die nachfolgenden Laborschritte benötigten Zellzahlen herangezogen.

Immunzellphänotypisierung mittels FACS

Fluorescence-activated cell sorting (FACS; Durchflusszytometrie) ist ein Verfahren, mithilfe dessen Zellpopulationen anhand von fluoreszenzmarkierten Antikörpern definiert werden können, welche an bestimmte Oberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation/CD-Moleküle) der Zellen binden. Neben der Detektion der fluoreszenzmarkierten Antikörper können mittels Durchflusszytometrie auch Aussagen über die Größe und Granularität von Zellen getroffen werden.

Während der Messung werden die Zellen in einer Kapillare aneinandergereiht an einem Laser-System vorbeigeschleust. Durch Zusammenschau der Brechungswinkel der Laserstrahlen sowie der Detektion des von den angeregten Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Lichts, kann der Phänotyp der einzelnen Zellen bestimmt werden. Anhand dessen wiederum können die Zellen ihrer spezifischen Population zugeordnet werden.

Zur Vorbereitung der FACS-Messungen wurde je 1µl der für die entsprechende Untersuchungsreihe benötigten Antikörper in 100µl FACS-Puffer gelöst.

Folgende Antikörper wurden in den beiden Untersuchungsreihen verwandt (Tabelle S1A):

- Vollblutfärbung (Lineage-Cocktail)
CD3;CD19; CD4; CD56; CD16; CD14; CD45
- Monozytenfärbung (Monozyten-Cocktail)
HLA-DR, -DP, -DQ; CD123; CD86; CD80; CD16; CD14; CD45; lineage(CD3/-19/-20/-56);
CD11c

Aufbereitung der Vollblutproben für die FACS-Messung

Die zu Beginn bereitgestellten 500µl Vollblut wurden durch Zugabe von 4,5ml FACS-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Ein Aliquot von 200µl wurde mit dem Lineage-Cocktail gemischt und zur Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis gelegt. Direkt vor der Messung wurde die Probe mit 800µl PBS auf ein Gesamtvolumen von 1ml aufgefüllt.

Aufbereitung der PBMC-Proben für die FACS-Messung

Für die Monozytenfärbung wurden 10×10^6 PBMCs bereitgestellt und nach Zentrifugation (400g, 4°C, 5min) mit dem vorbereiteten Monozyten-Cocktail gemischt. Zur Inkubation wurden die Proben für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben mit 200µl FACS-Puffer verdünnt und zentrifugiert (300g, 4°C, 5min). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Direkt vor Einmessung wurde das Gemisch mit 800µl PBS auf 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Dateneinlesung der FACS-Messungen

Die Messung der Daten erfolgte mittels Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific Inc; Waltham, USA). Das Einzugsvolumen betrug 600µl. Gerätekalibrierung und -einstellungen wurden vorab definiert und während des Studienzeitraums nicht verändert. Für die Monozytenfärbung wurde ein Trigger gegen CD45 angewandt. Durch diese Einstellung werden Zellen, die den für Leukozyten spezifischen Oberflächenmarker CD45 nicht exprimieren, aus der Analyse ausgeschlossen.

Jeder Messung schloss sich ein Waschgang des Gerätes mit 1ml PBS und 1ml einer 12%-igen Natriumhypochloritlösung an.

Datenverarbeitung der FACS-Messungen

Für die Datenverarbeitung wurde eine für die jeweilige Färbung spezifische Gating-Strategie festgelegt (Abbildungen 3, 4). Durch Auftragen der Zellen auf Koordinatensysteme mit verschiedenen Markern oder Streuungsparametern an den entsprechenden Achsen, können Zellpopulationen identifiziert werden. Das Gating funktioniert nach dem Prinzip der „Forward Selection“. Das bedeutet, dass im nachfolgenden Koordinatensystem nur diejenigen Zellen aufgetragen werden, die durch das Gate im vorherigen Koordinatensystem definiert wurden. Zur Analyse der Zellen wurde das Programm FlowJo™ (FLOWJO LLC; Ashland, USA) benutzt.

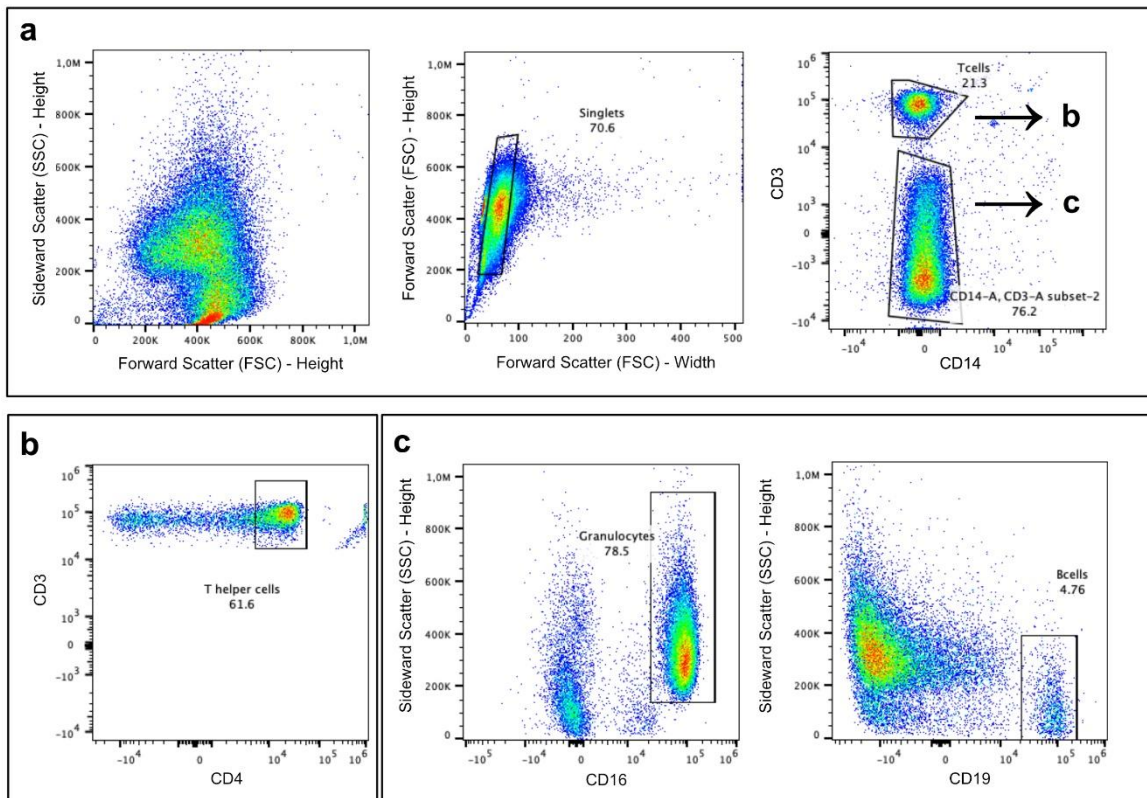


Abbildung 3: Gating Strategie Lineage Panel

a: Von links nach rechts: Erythrozyten und Debris wurden bereits bei der Einlese mittels Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer identifiziert und aus den Analysen ausgeschlossen. Es ist deshalb im ersten Bild bereits die Population der Leukozyten zu sehen. Im zweiten Bild ist die Singlet-Diskriminierung dargestellt, bei der aneinanderheftende Zellen (Dubletten) aus den nachfolgenden Schritten ausgeschlossen werden. Durch die Auftrennung der Zellen nach den Markern CD3 und CD14 im darauf folgenden Schritt können T-Zellen und CD3⁺ CD14⁺ Zellen identifiziert werden.

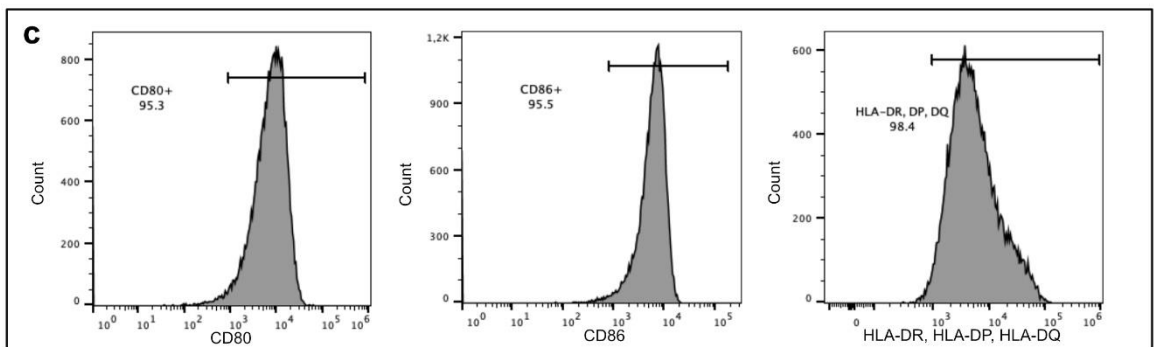
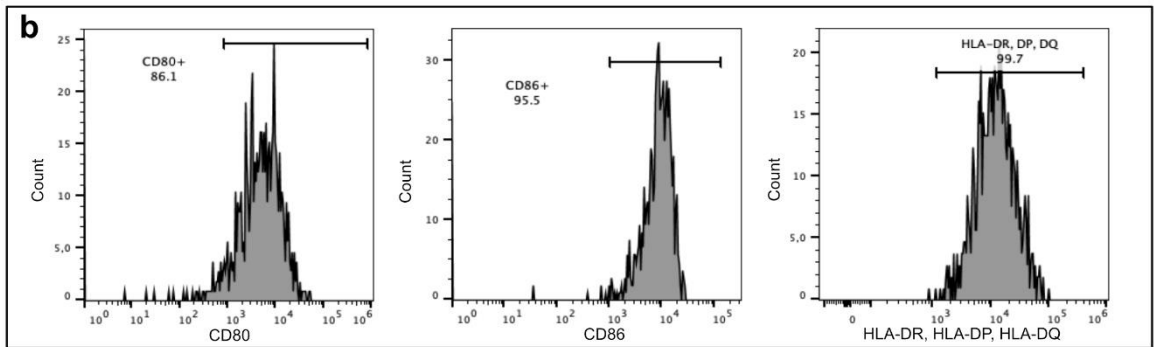
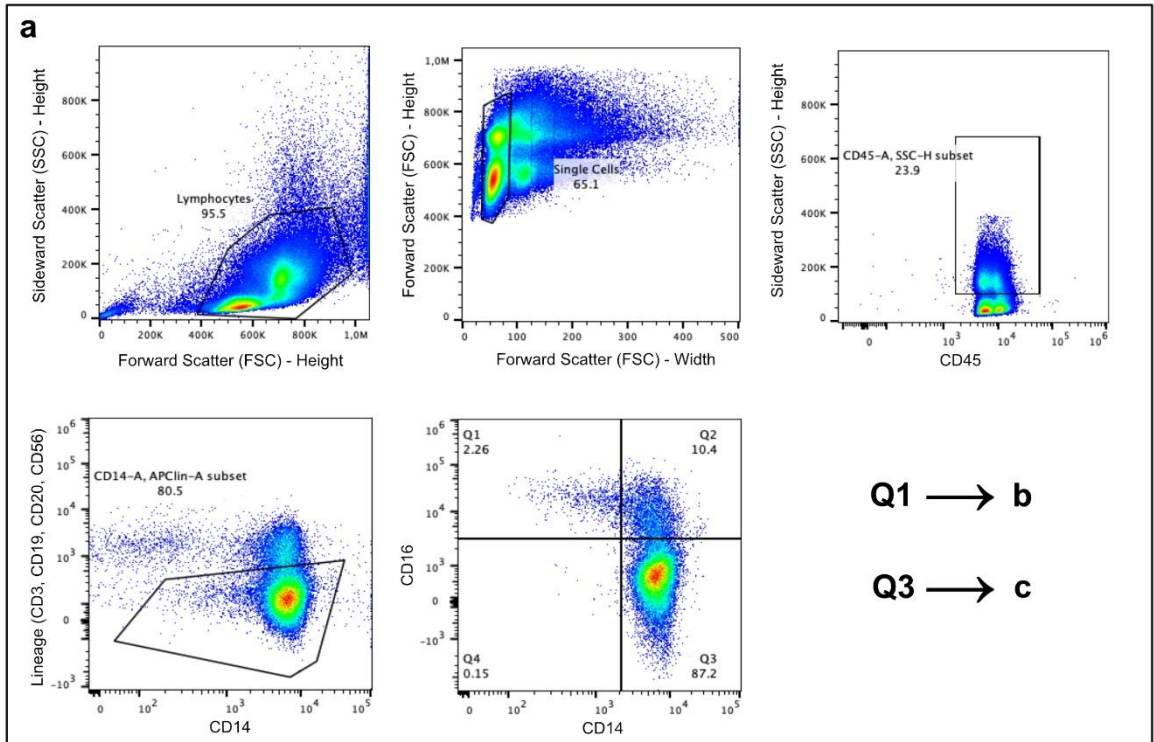
b: Zur Definition der CD4⁺ T-Helferzellen wurden die T-Zellen im nächsten Gate gegen den Marker CD4 aufgetragen.

c: Aus der Gruppe der CD3⁺ CD14⁺ Zellen wurden durch Auftragung gegen CD16 bzw. CD19 Granulozyten bzw. B-Zellen identifiziert.

Abbildung 4 (nächste Seite): Gating Strategie Monozytenpanel

a: Von links nach rechts: Im ersten Schritt ist die Definition der Leukozytenpopulation dargestellt. Diese Einteilung geschieht anhand von Größe und Granularität der Zellen. Der an der X-Achse aufgetragene „Forward-Scatter“ beschreibt linear zur Lichtquelle einfallende Laserstrahlen, die die Zellgröße widerspiegeln. Der auf der Y-Achse aufgetragene „Sideward-Scatter“ stellt Laserstrahlen dar, die in einem nicht orthogonalen Winkel auf die Detektoren einfallen. Da die auf die Zellen einfallenden Laserstrahlen proportional zur Granularität der Zellen gestreut werden, kann die Granularität anhand des „Sideward-Scatters“ beschrieben werden. Es handelt sich bei dem Analysat um PBMCs, weshalb kaum Granulozyten zu sehen sind. Das zweite Gate stellt die Singlet-Diskriminierung dar, welche analog zum Lineage Panel abläuft. Das dritte Bild beschreibt den Ausschluss von Lymphozyten, welche eine geringere Granularität aufweisen als Mono- und Granulozyten. Im folgenden Schritt werden Monozyten durch die Auftragung von CD14 gegen einen Cocktail aus den Markern CD3, CD19, CD20 und CD56 von sonstigen verbleibenden Zellen getrennt. Die Unterteilung von Monozyten in klassisch- und alternativ aktiviert geschieht im nächsten Bild anhand der Differenzierungsmarker CD14 und CD16.

b und c: Für die Quadranten Q1 und Q3, welche alternativ respektive klassisch aktivierte Monozyten darstellen, wurde die „Mean Fluorescence Intensity“ (MFI), ein Maß der Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes mit relativer Einheit, der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und HLA-DR,-DP,-DQ gemessen. Anhand der dargestellten Histogramme wurde der Messbereich definiert. Als Cutoff hierfür wurde eine MFI von 10^3 gewählt.



RNA-Sequenzierung

Von 27 StudienteilnehmerInnen wurde monozytäre RNA isoliert, sequenziert und analysiert. In diesen 27 enthalten sind die 16 StudienteilnehmerInnen, von denen die Cytokinsekretion nach Immunzellstimulation analysiert wurde.

Monozytenisolation

Zur Monozytenisolation wurden die verbliebenen PBMCs zentrifugiert (340 g, Raumtemperatur, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 µl MACS-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA) und 50 µl magnetischen CD14-Beads (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG; Bergisch Gladbach, Deutschland) resuspendiert und auf Eis für 15 min inkubiert. Die magnetischen CD14-Beads binden spezifisch an Monozyten. Nach Inkubation wurde das Gemisch mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt, gemischt und erneut zentrifugiert (340 g, Raumtemperatur, 5 min). Während der Zentrifugation wurde ein LS-Column (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG; Bergisch Gladbach, Deutschland) im dafür vorgesehenen „QuadroMACS™ Separator“ (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG; Bergisch Gladbach, Deutschland) angebracht und mit 3 ml MACS-Puffer zur Kalibrierung gespült. Durch das Einbringen der LS-Column in den „QuadroMACS™ Separator“ ergibt sich eine Apparatur mit einer sich in einem magnetischen Feld befindliche Säule, durch die Flüssigkeiten fließen können. Durch Zugabe des Gemisches mit den magnetisch markierten Monozyten bleiben diese in der Säule hängen, während alle anderen Zellen die Säule durchlaufen und in einem Abfallcontainer aufgefangen werden. Nach Entnahme der Säule aus dem magnetischen Feld können die Monozyten in einen separaten Auffangbehälter gespült werden.

Nach der Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet der magnetisch markierten Monozyten mit 1 ml MACS-Puffer gelöst und die Suspension auf das sich im magnetischen Feld befindende LS-Column gegeben. Nach dreimaliger Spülung mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entnommen und die Monozyten mit 5 ml MACS-Puffer in ein 15 ml Falcon™-Tube übertragen. Die so aufgereinigten Monozyten wurden nach Zentrifugation (300 g, 4°C, 8 min) in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorf Tube® übertragen. Zur Qualitätskontrolle wurden die Monozyten mit dem im Abschnitt „PBMC-Isolation“ beschriebenen Verfahren mittels Neubauer-Zellkammer lichtmikroskopisch gesichtet, ausgezählt und das Ergebnis dokumentiert. 1×10^5 Monozyten wurden zur Vorbereitung eventuell stattfindender Chromatinanalysen mittels ATAC-Sequenzierung zurückgehalten und die restlichen Monozyten zur Aufbereitung für die RNA-Sequenzierung bereitgestellt.

Zellyse und RNA-Isolation

Nach Zentrifugation (500 g, 4 °C, 5 min) wurden die verbliebenen Monozyten mit 300 µl RLT-Puffer (Qiagen N.V.; Venlo, Niederlande) vermengt. Durch den RLT-Puffer werden die Zellen lysiert und die RNA somit in den nachfolgenden Schritten zugänglich. Die RNA-Isolation und -Sequenzierung fand zu einem späteren Zeitpunkt an den gesammelten Proben statt. Hierzu wurden die Proben nach der beschriebenen Lyse bei -80 °C gelagert.

Für die RNA-Isolation wurde das Kit „RNeasy® Mini Kit“ (Qiagen N.V.; Venlo, Niederlande) verwandt. Es wurde sich an das Herstellerprotokoll (Part 1 und -2) mit Verzicht auf die Durchführung der optionalen Schritte gehalten [80, 81].

Um eine Degradierung der RNA zu vermeiden wurden die Proben während der Arbeitsschritte auf Eis gekühlt und direkt nach Fertigstellung bei -80 °C gelagert.

Zur quantitativen und qualitativen Kontrolle wurde die isolierte RNA mittels „NanoDrop™ One/One^c Microvolume UV/VIS“ Photospectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc; Waltham, USA) untersucht. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorptionsraten bei einer

Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 ng einzelsträngiger RNA pro ml, weshalb die die Konzentration mittels der Formel $Absorption A_{260} \times 40 = c RNA \left[\frac{ng}{ml} \right]$ berechnet werden kann.

Durch Bestimmung der Verhältnisse der Absorptionsraten der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm und 260 nm zu 230 nm kann die Verunreinigung mit Proteinen, Phenolen und anderen organischen Substanzen bestimmt werden. Dies wurde ebenfalls durchgeführt und die Ergebnisse dokumentiert.

RNA-Sequenzierung und Datenverarbeitung

Die Sequenzierung der RNA-Proben mittels „3'mRNA-Seq“ wurde durch die „Next Generation Sequencing (NGS) Core Facility“ des Institutes für Humangenetik der Universität Bonn durchgeführt.

In diesem auf DNA- und RNA-Sequenzierung spezialisierten Labor sind alle nötigen Abläufe bereits etabliert und können standardisiert durchgeführt werden. Durch Auslagerung kritischer Arbeitsschritte konnten wir den Untersucher-Bias reduzieren und eine hohe Qualität der Daten gewährleisten.

Vor Sequenzierung wurde die chemische Qualität der Proben wurde von der „NGS Core Facility“ ein weiteres Mal mittels Tape-Station (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) geprüft.

Die Datenverarbeitung und -analyse wurde in Zusammenarbeit mit Bioinformatikern der „Core Unit for Bioinformatics Data Analysis“ des Institutes für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn durchgeführt. Vor Analyse wurde die Qualität der mittels Sequenzierung gewonnenen Daten durch die „Core Unit for Bioinformatics Data Analysis“ geprüft.

Statistik und Datenverarbeitung

Diese Arbeit stellt die Analyse eines vorläufigen Datensatzes vor dem endgültigen Abschluss der Studie dar, weshalb es sich terminologisch um statistische Analysen explorativer Natur handelt.

Die statistischen Berechnungen und die Erstellung aller Grafiken wurden in der Programmiersprache „R: A language and environment for statistical computing“ (R Foundation for Statistical Computing; Wien, Österreich) unter Anwendung der Software „RStudio: Integrated Development Environment for R“ (RStudio PBC; Boston, USA) durchgeführt. Sofern möglich wurde die farbliche Gestaltung der Grafiken mit der Palette „IBM design library color blind safe color palette“ (IBM Corp., Armonk, USA) durchgeführt. Es soll so die Barrierefreiheit der Arbeit für Menschen mit Farbsehschwäche gewährleistet werden.

Die statistischen Aspekte dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité durchgeführt.

Folgende statistische Tests kamen zur Anwendung:

- Einfache Anova mit wiederholten Messungen

Für Daten, die zu allen drei Zeitpunkten erhoben wurden und bei denen die ANOVA-Bedingungen der Normalverteilung, Sphärizität und dem Fehlen extremer Ausreißer zutrafen.

- Post-hoc-Testung von in der ANOVA signifikanten Ergebnissen mittels Tuckey-Test

Mittels Post-hoc-Testung kann das Ergebnis der ANOVA spezifiziert werden. Somit wird die Aussage darüber möglich, zwischen welchen Gruppen (Zeitpunkten) ein signifikant unterschiedlicher Mittelwert vorliegt.

- Friedman-Rangsummentest

Für Daten, die zu allen drei Zeitpunkten erhoben wurden und die Gütekriterien der einfachen Anova mit wiederholten Messungen verletzt, wurde der nicht-parametrische Friedman-Rangsummentest angewandt.

- Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Als Post-hoc-Test wurde dieser nicht-parametrische Test zur Detektion der Gruppenzugehörigkeit von im Friedman-Rangsummentest ermittelten Signifikanzen angewandt. Außerdem fand er Anwendung als nicht-parametrische Alternative zum T-Test für abhängige Stichproben, sofern die Gütekriterien des T-Tests für abhängige Stichproben verletzt wurden.

- T-Test für abhängige Stichproben

Der T-Test für abhängige Stichproben wurde zur Detektion von Unterschieden in Daten eingesetzt, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (V1 und V3) erhoben wurden und den Gütekriterien der Normalverteilung und dem Nichtvorhandensein extremer Ausreißer in den Differenzen der Gruppen genügten.

- Odds Ratio (OR)

Um die Stärke des Zusammenhangs eines Risikofaktors mit dem Auftreten eines Ereignisses auszudrücken, wurden ORs berechnet. Hierzu wurden Kreuztabellen mit dem Risikofaktor und dem Auftreten des Ereignisses erstellt. Ist eine Zelle der Kreuztabelle gleich Null, kann keine OR berechnet werden. In diesem Fall wurde die Haldane-Anscombe Korrektur angewandt, welche in der Addition von 0,5 zu jeder Zelle besteht.

- Korrelationsanalysen

Pearson-Korrelationen fanden Anwendung, um den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen darzustellen. Dargestellt ist der Pearson-Korrelationskoeffizient, welcher Werte zwischen -1 und 1 annehmen kann und anhand dessen die Stärke und Richtung der Korrelation erkennbar wird.

- Multiple lineare Regressionsmodelle

Zur Identifikation möglicher Vorhersagewerte wurden multiple lineare Regressionen gemäß folgender Formel modelliert:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$$

Wobei \hat{Y} den erwarteten Wert der abhängigen Variable beschreibt, β_0 den Y-Achsenabschnitt, wenn alle unabhängigen Variablen gleich Null sind. β_1 bis β_n sind die berechneten Regressionskoeffizienten. Die Regressionskoeffizienten beschreiben die Veränderung des Y-Wertes relativ zur Veränderung der entsprechenden unabhängigen Variable X_n um eine Einheit unter Annahme der Konstanz aller weiteren unabhängigen Variablen. In den graphischen Darstellungen sind die Regressionskoeffizienten inklusive des jeweiligen 95 %-Konfidenzintervalls aufgetragen.

Anhand von multiplen linearen Regressionsmodellen lassen sich Faktoren beschreiben, die zur möglichen Prädiktion des Ansprechverhaltens herangezogen werden können. Zur Entwicklung eines Prädiktionsmodelles wird neben einem Trainingsdatensatz ein Validierungsdatensatz benötigt. Ein Prädiktionsmodell kann als validiert gelten, wenn es anhand einer neuen, unabhängigen Grundgesamtheit getestet wurde. In unserem Fall würde eine neue Grundgesamtheit eine Folgestudie bedingen. Folglich stellen die in dieser Arbeit präsentierten Modelle terminologisch Trainingsmodelle dar und sind unter diesem Vorbehalt zu betrachten.

Die symbolische Darstellung von Signifikanzniveaus entspricht folgender P-Werte:

Symbol	P-Wert
ns	>0,05
*	≤0,05
**	≤0,01
***	≤0,001
****	≤0,0001

Tabelle 3: Signifikanzniveaus

Appendix Methodenteil

A: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Phosphate Buffered Saline, 10X Solution	Life Technologies™; Carlsbad, USA
Gibco™ RPMI Medium 1640 1X	Life Technologies™; Carlsbad, USA
LPS-B5 Ultrapure	InvivoGen Europe; Toulouse, Frankreich
Imiquimod (R837)	InvivoGen Europe; Toulouse, Frankreich
R848 (Resiquimod)	InvivoGen Europe; Toulouse, Frankreich
2'3'-c-di-AM(PS)2(RP,RP)	InvivoGen Europe; Toulouse, Frankreich
PGN-EB	InvivoGen Europe; Toulouse, Frankreich
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Life Sciences AB; Uppsala, Schweden
UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 0.8	Life Technologies™; Carlsbad, USA
Trypan Blue solution 0.4 %	Sigma-Aldrich; St. Louis Missouri, USA
Alexa Fluor® 488 anti-human CD3 – HIT3a	BioLegend®; San Diego, USA
PE anti-human CD19 – 4G7	BioLegend®; San Diego, USA
PerCP/Cy5.5 anti-human CD4 – RPA-T4	BioLegend®; San Diego, USA
PE/Cy7 anti-human CD56 (NCAM) – HCD56	BioLegend®; San Diego, USA
Pacific Blue™ anti-human CD16 – 3G8	BioLegend®; San Diego, USA
Brilliant Violet 510™ anti-human CD14 – M5E2	BioLegend®; San Diego, USA
APC anti-human CD45 – 2D1	BioLegend®; San Diego, USA
APC/Fire™ 750 anti-human HLA-DR, DP,DQ – Tü39	BioLegend®; San Diego, USA
PE anti-human CD123 - S18016F	BioLegend®; San Diego, USA
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD86 – IT2.2	BioLegend®; San Diego, USA
PE/Cy7 anti-human CD80 – 2D10	BioLegend®; San Diego, USA
Brilliant Violet 711™ anti-human CD45 – HI30	BioLegend®; San Diego, USA
APC anti-human Lineage Cocktail(CD3/19/20/56) - UCHT1, HIB19, 2H7,5.1H11	BioLegend®; San Diego, USA
APC/Fire™ 750 anti-human CD11c – 3.9	BioLegend®; San Diego, USA
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG; Bergisch Gladbach, Deutschland
RLT-Lysepuffer	Qiagen N.V.; Venlo, Niederlande

B: Kits

Kit	Hersteller
Mercodia Glucagon ELISA	Mercodia AB; Uppsala, Schweden
Mercodia Insulin ELISA	Mercodia AB; Uppsala, Schweden
ProcartaPlex Hu Cytokine/Chemokine/GF 1 45plex	Thermo Fisher Scientific Inc; Waltham, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen N.V.; Venlo, Niederlande

C: Sonstige Labormaterial

Labormaterial	Hersteller
Vacurette® Set zur Venenpunktion und Blutentnahme	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Venenverweilkanüle Typ BD Venflon™ Pro Safety	Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, USA
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Fisher Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland
Superior™ Neubauer-improved counting chamber	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Lauda-Königshofen, Deutschland
Eppendorf Tubes® 1.5ml	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland

D: Software

Software	Hersteller
R: A language and environment for statistical computing	R Foundation for Statistical Computing; Wien, Österreich
RStudio: Integrated Development Environment for R	RStudio PBC; Boston, USA
FlowJo™ Software (for Windows) Version 10.8.0	FLOWJO LLC; Ashland, USA

Tabelle S1: Zusammenfassung verwendeter Materialien

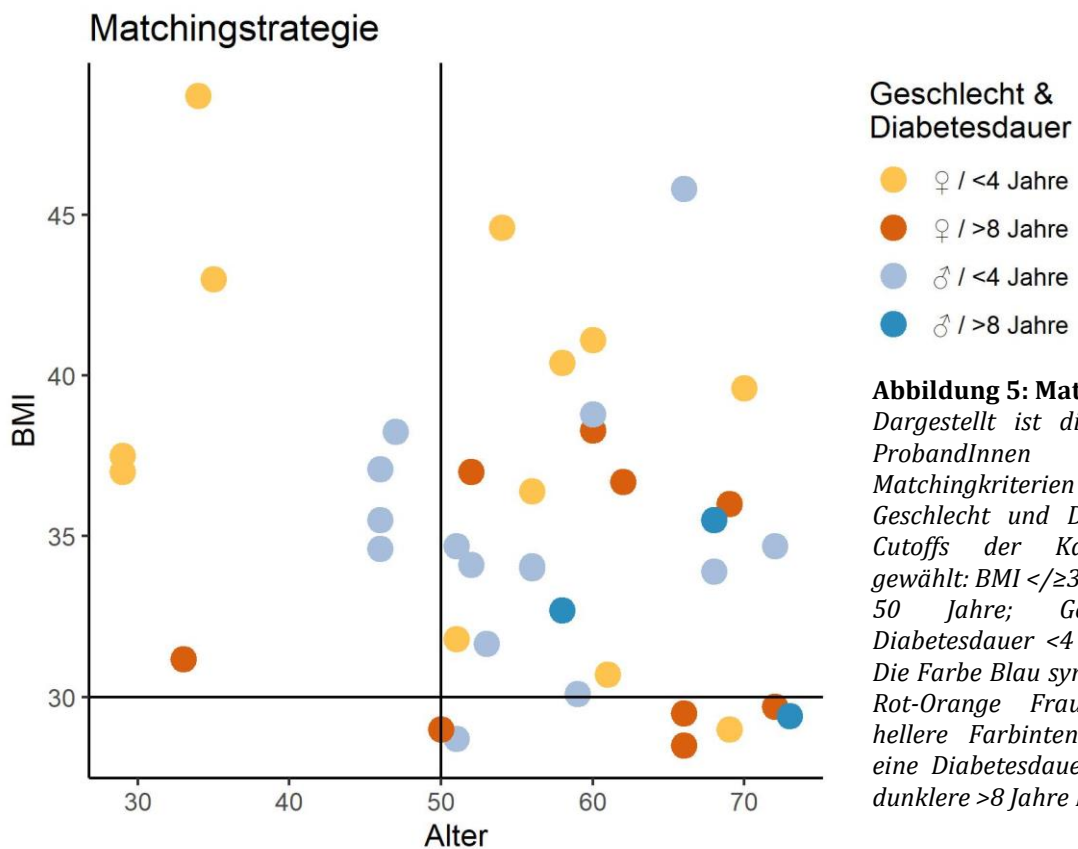
A: Reagenzien; B: Kits; C: Sonstige Labormaterialien; D: Software. Angaben zum Hersteller in der jeweils rechten Spalte.

Ergebnisse

Matchingstrategie

In dieser Arbeit sind die Ergebnisse von 39 ProbandInnen des Kollektivs der FAIR-Studie dargestellt, die das Studienprotokoll bis zum Ende durchliefen. Die Aufteilung anhand der Matchingparameter ist in Abbildung 5 und Tabelle 4 dargestellt.

Teilgenommen haben 21 Probandinnen und 18 Probanden. 7 ProbandInnen hatten einen BMI <30 kg/m² und 32 einen ≥30 kg/m². Von den 39 ProbandInnen hatten 27 eine Diabetesdauer <4 Jahre und 12 eine Diabetesdauer >8 Jahre. Die Gruppe der Männer ≥50 Jahre mit einem BMI ≥30 kg/m² und einer Diabetesdauer <4 Jahre bildet mit 10 Studienteilnehmern die größte Gruppe.



Matchingstrategie

Frauen (n = 21)		Alter (Jahre)	
		<50	≥50
BMI (kg/m²)	<30	0* (0**)	1* (4**)
	≥30	4* (1**)	7* (4**)

Männer (n = 18)		Alter (Jahre)	
		<50	≥50
BMI (kg/m²)	<30	0* (0**)	1* (1**)
	≥30	4* (0**)	10* (2**)

* Diabetesdauer < 4 Jahre
** Diabetesdauer > 8 Jahre

Tabelle 4: Matchingstrategie
Die Tabelle enthält die Anzahl der ProbandInnen aufgeschlüsselt nach Alter (Spalten), BMI (Zeilen) und Diabetesdauer (* = <4 Jahre, ** = >8 Jahre). Der obere Teil der Tabelle beschreibt die weiblichen Teilnehmerinnen und der untere die männlichen Teilnehmer. In Klammern hinter den Geschlechertiteln ist die jeweils absolute Anzahl der TeilnehmerInnen angegeben.

Klinische Parameter und Anthropometrie

Die drastische Kalorienrestriktion während der Interventionsphase spiegelte sich in beinahe allen von uns erhobenen Parametern der Anthropometrie und des Routinelabors wieder. Falls nicht anders angegeben, handelt es sich bei den im Folgenden dargestellten Parametern um Mittelwerte ± Standardabweichung. Parameter, die aufgrund ihrer Verteilung in den mehrstufigen Analysen eines nicht-parametrischen statistischen Tests bedurften, sind grafisch als Median mit Angabe des Interquartilsabstandes angegeben.

Die ProbandInnen verloren im Mittel $15,06 \pm 5,58$ kg Gewicht, was sich in einem Abfall des BMI um $5,06 \pm 1,87$ kg/m² und einer Reduktion des Körperfettanteils um $8,16 \pm 3,08$ % beziehungsweise $14,01 \pm 3,87$ kg Körperfettmasse widerspiegelte. Der systolische Blutdruck fiel während der Intervention um 11 ± 14 mmHg im Vergleich zum Interventionsbeginn. Auch im Serumlipidprofil der ProbandInnen waren die Veränderungen abgebildet. So fiel das LDL-Cholesterol im Mittel um 23 ± 26 mg/dl ($p \leq 0,0001$), das HDL-Cholesterol um 4 ± 8 mg/dl ($p \leq 0,01$) und die TAG um 71 ± 96 mg/dl ($p \leq 0,0001$). Die Leberwerte Aspartat-Aminotransferase (AST) und ALT verhielten sich synchron und fielen um 5 ± 11 U/l ($p \leq 0,01$) respektive 12 ± 17 U/l ($p \leq 0,001$). Die mit dem Leberfettgehalt korrelierenden Indices FLI und NAFLD-LFS fielen während der Intervention signifikant. Der dimensionslose FLI fiel von $87,08 \pm 12,67$ zu V1 auf $59,2 \pm 25,06$ ($p \leq 0,0001$) zu V3. Der ebenfalls dimensionslose NAFLD-FLS betrug im Mittel zu V1 $1,88 \pm 2,06$ und zu V3 $-0,34 \pm 0,90$ ($p \leq 0,0001$). Der FLI kann zur Einschätzung einer sonographisch diagnostizierten Steatosis hepatis herangezogen werden [77]. Demnach lag zu V1 bei 33 ProbandInnen eine Steatosis hepatis vor, während sich 6 ProbandInnen in einem durch den Index nicht sicher definierbaren Bereich befanden, und bei niemandem der ProbandInnen eine Steatosis hepatis ausgeschlossen werden konnte. Zu V3 fielen 17 ProbandInnen in den Bereich der Steatosis hepatis, 16 in den indifferenten sowie 6 in den die Steatosis hepatis sicher ausschließenden Bereich. Durch Anwendung eines Cutoffs können über den NAFLD-FLS Aussagen über die Höhe des Leberfettgehaltes getroffen werden. Ein erhöhter Leberfettgehalt liegt dieser Definition gemäß bei $\geq 5,56$ % Leberfettgehalt vor [78]. Es lag demnach zu V1 bei 37 und zu V3 bei 19 der 39 ProbandInnen ein erhöhter Leberfettgehalt vor.

Die Harnsäure im Serum fiel signifikant um $0,4 \pm 1,1$ mg/dl ($p \leq 0,05$). Bei den Entzündungsparametern änderte sich das CRP über den Interventionszeitraum nicht signifikant um $0,4 \pm 1,9$ mg/l ($p > 0,05$), blieb jedoch im Mittel innerhalb des Referenzbereiches von <5 mg/l. Die im Routinelabor ermittelte Leukozytenzahl fiel um $1,41 \pm 1,54$ /nl ($p \leq 0,001$). Die Verbesserung des

Glucosestoffwechsels spiegelte sich im Abfall des HbA1c um $1 \pm 0,8 \%$ ($p \leq 0,0001$) und im Abfall der Nüchternglucose um $31,8 \pm 29,9 \text{ mg/dl}$ ($p \leq 0,0001$) wieder (Tabelle 5).

Charakteristika zu Beginn und Ende der Intervention				
	V1	V3	Differenz	P-Wert
Größe (m)	1,73 ± 0,09	-	-	-
Gewicht (kg)	105,09 ± 15,03	90,03 ± 13,80	15,06 ± 5,58	****
BMI (kg/m ²)	35,36 ± 4,96	30,31 ± 4,68	5,06 ± 1,87	****
Fettmasse (kg)	46,46 ± 11,89	32,81 ± 12,22	14,01 ± 3,87	****
Fettfreie Masse (kg)	59,72 ± 11,48	57,59 ± 11,36	1,78 ± 2,48	***
Fettmasse (%)	43,67 ± 8,06	35,87 ± 9,87	8,16 ± 3,08	****
Fettfreie Masse (%)	56,33 ± 8,06	64,13 ± 9,87	8,16 ± 3,08	****
sysRR (mmHG)	138 ± 14	128 ± 12	11 ± 14	****
Leukozyten (/nl)	7,48 ± 1,64	6,07 ± 1,65	1,41 ± 1,54	****
CRP (mg/dl)	3,5 ± 4,1	3,1 ± 4,1	0,4 ± 1,9	ns
Gesamtcholesterin (mg/dl)	194 ± 37	159 ± 41	34 ± 25	****
LDL (mg/dl)	119 ± 35	96 ± 37	23 ± 26	****
HDL (mg/dl)	51 ± 13	46 ± 11	4 ± 8	**
TAG (mg/dl)	178 ± 120	108 ± 60	71 ± 96	****
AST (U/l)	31 ± 13	26 ± 10	5 ± 11	**
ALT (U/l)	38 ± 18	27 ± 11	12 ± 17	***
Harnsäure (mg/dl)	5,5 ± 1,4	5,1 ± 1,1	0,4 ± 1,1	*
Nüchternglucose (mg/dl)	130,7 ± 34,4	98,7 ± 30,2	31,8 ± 29,8	****
HbA1c (%)	6,9 ± 1,1	6 ± 0,7	1 ± 0,8	****

Tabelle 5: Charakteristika zu Beginn und Ende der Intervention

Ausgewählte Charakteristika der Studienpopulation dargestellt anhand der Mittelwerte ± Standardabweichung der Visiten V1 und V3 und der Differenzen V1-V3, sowie die Signifikanzniveaus der Unterschiede der Mittelwerte. Die Signifikanzniveaus wurden mittels gepaartem T-Test berechnet. $p > 0,05^{ns}$, $p \leq 0,05^$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,0001^{****}$.*

Einige Parameter wiesen starke Veränderungen bereits innerhalb der ersten Woche nach Interventionsbeginn auf (Abbildung 6, 7). So stiegen AST und ALT als Parameter des Leberstoffwechsels innerhalb der ersten Interventionswoche signifikant über das Ausgangsniveau an, um über den restlichen Interventionszeitraum zu sinken und sich bei V3 mit einer Verringerung des Streumaßes und unterhalb des Ausgangsniveaus einzupendeln. Einen ähnlichen Verlauf über die drei Zeitpunkte zeigte die Harnsäurekonzentration im Serum. Sie stieg zu Beginn der Intervention ebenfalls signifikant an und fand sich nach Ablauf der Intervention wieder auf dem Ausgangsniveau ein. Starke Veränderungen innerhalb der ersten Interventionswoche ließen sich ebenfalls im Serumlipidprofil beobachten. So fielen Gesamtcholesterin, HDL, LDL und TAG im vergleichbaren oder größeren Maße innerhalb der ersten Interventionswoche als im restlichen Interventionszeitraum. Ebenfalls innerhalb der ersten Interventionswoche stärker ausgeprägt als

im restlichen Zeitraum war die Veränderung des Blutdruckes. So sank der MAD innerhalb der ersten Woche im Mittel signifikant um zum Zeitpunkt V3 weiterhin auf dem Niveau nach einer Woche zu bleiben.

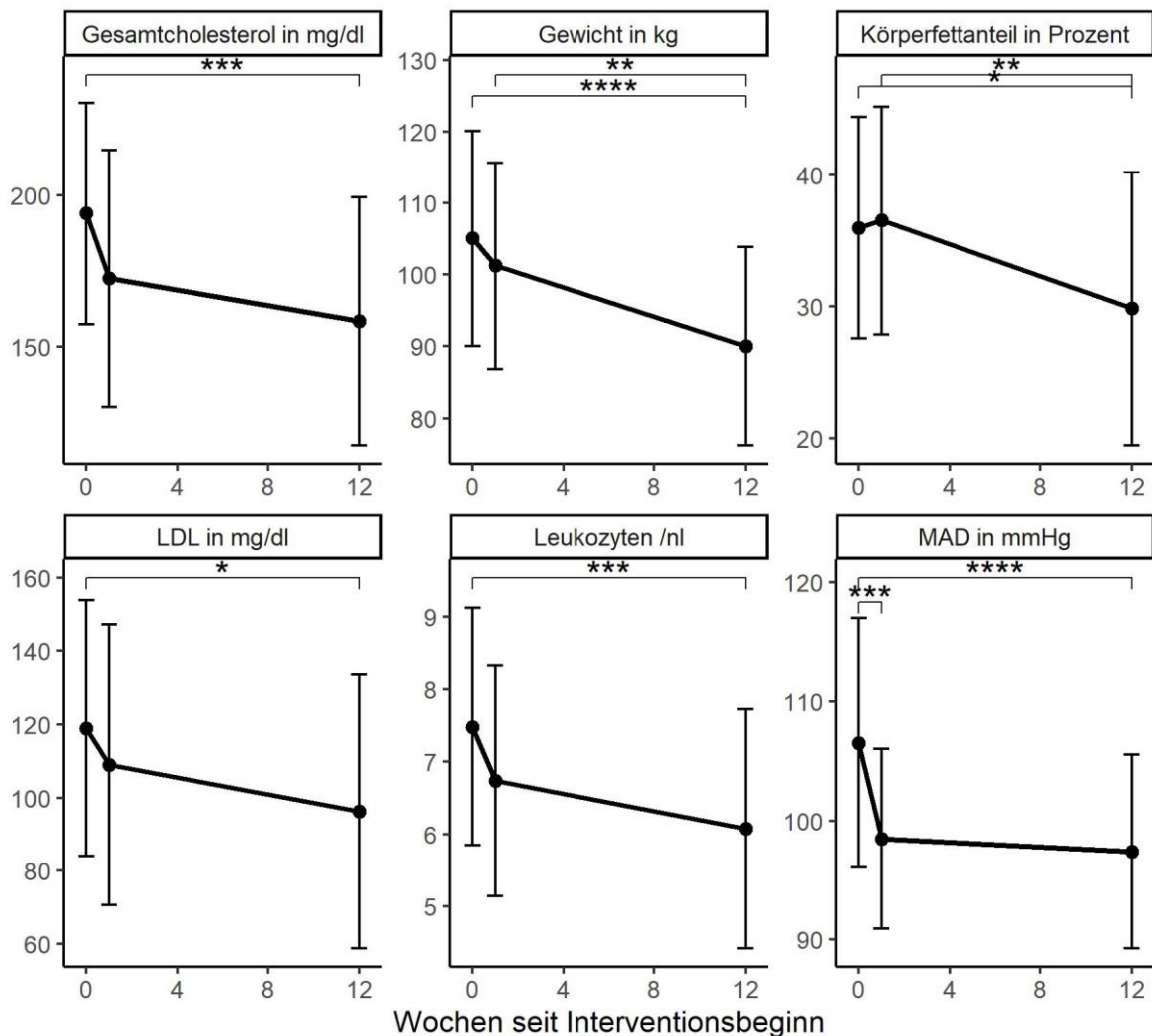


Abbildung 6: Charakteristika im Zeitverlauf I

Ausgewählte Charakteristika der Studienpopulation dargestellt im zeitlichen Verlauf anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung der Visiten V1, V2 und V3 unter Angabe der Signifikanzniveaus der Unterschiede der Mittelwerte. Die Signifikanzniveaus wurden mittels einfacher ANOVA mit multiplen Messungen ermittelt und per Tuckey-Test als Post-hoc-Test den jeweiligen Zeitpunkten zugeordnet. $p > 0,05^{ns}$, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,0001^{****}$.

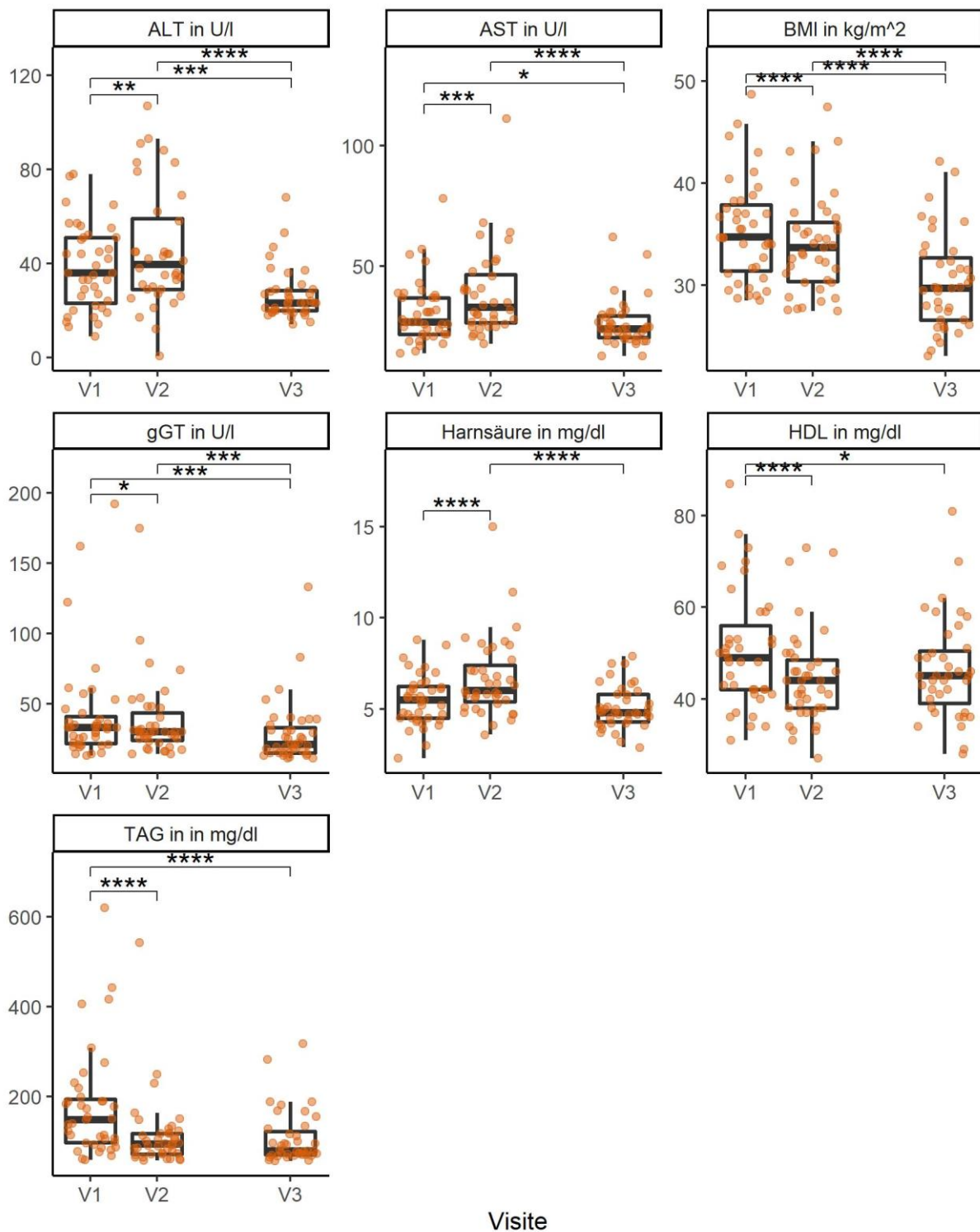


Abbildung 7: Charakteristika im Zeitverlauf II

Ausgewählte Charakteristika der Studienpopulation dargestellt im zeitlichen Verlauf anhand von Boxplots der Visiten V1, V2 und V3 unter Angabe der Signifikanzniveaus der Unterschiede der Mediane. Die Streuung ist zudem durch Scatterplots verdeutlicht. Signifikanzniveaus wurden mittels Friedman-Rangsummentest ermittelt und per Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test als Post-hoc-Test den jeweiligen Zeitpunkten zugeordnet.

$p > 0,05^{ns}$, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,0001^{****}$.

HbA1c und Nüchtern glucose unter Beachtung der Definitionen von Diabetes und Prädiabetes

Für die Definition von Respondern in Bezug auf die Diabetesremission haben wir die Kriterien Nüchtern glucose <126 mg/dl und HbA1c <6,5 %, als den Diabetes definierende Werte herangezogen. TeilnehmerInnen, die nach der Intervention in mindestens einem der beiden Kriterien über dem Cutoff lagen, wurden als Non-ResponderInnen definiert. Das Vorliegen eines Prädiabetes wurde ebenfalls über die Parameter Nüchtern glucose (100 - 125 mg/dl) und HbA1c (5,7 - 6,5 %) definiert.

85 % (33 von 39) der StudienteilnehmerInnen erfüllten zum Zeitpunkt V3 die Kriterien der Diabetesremission. Von den 6 Non-ResponderInnen hatten 66 % eine Diabetesdauer von >8 Jahren und 33 % eine Diabetesdauer <4 Jahren. Daraus ergibt sich eine Odds Ratio von 0,16 für das Erreichen der Diabetesremission für die Gruppe Diabetesdauer >8 Jahren im Vergleich zur Diabetesdauer <4 Jahren (95 % -KI = 0,02 – 1,04; p = 0,06). Eine prädiabetische Stoffwechsellage wiesen zum Zeitpunkt V3 69 % (27 von 39) der StudienteilnehmerInnen auf. Von diesen 27 hatten 12 ProbandInnen oder 44 % eine Diabetesdauer >8 Jahre, was alle TeilnehmerInnen dieser Gruppe einschließt. Die OR für das Erreichen der Diabetesremission und Parameter des Glucosestoffwechsels außerhalb des prädiabetischen Bereiches der Gruppe mit Diabetesdauer >8 Jahren im Vergleich zur Diabetesdauer <4 Jahren betrug 0,05 (Korrektur nach Haldane-Anscombe; 95 %-KI = 0,00 – 0,92; p ≤0,05). Die restlichen 15 StudienteilnehmerInnen mit zum Zeitpunkt V3 vorliegenden Prädiabetes hatten eine Diabetesdauer <4 Jahre und machten in ihrer Gruppe einen Anteil von ebenfalls 56 % aus (Abbildung 8).

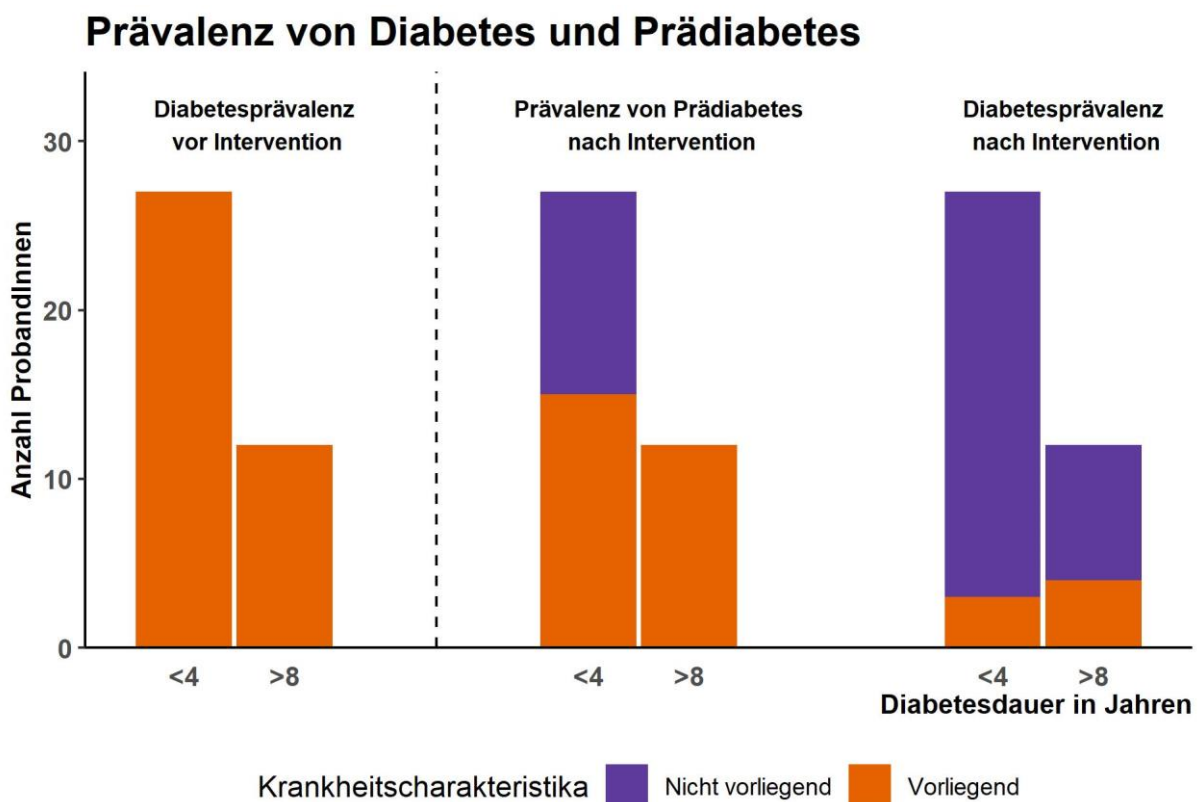


Abbildung 8 (vorige Seite): Erkrankungsprävalenzen vor und nach Intervention

Dargestellt ist die Anzahl der ProbandInnen die per Definition an T2DM bzw. Prädiabetes leiden. In orange hervorgehoben sind ProbandInnen, die die jeweiligen Erkrankungskriterien erfüllen. Violett hervorgehobene ProbandInnen liegen bezüglich der Kriterien unterhalb des Cutoffs. Vor Interventionsbeginn betrug die Prävalenz von T2DM in der Studienkohorte 100 %. Dies wurde per Einschlusskriterium sichergestellt. Prädiabetes wurde definiert als HbA1c 5,7 – 6,4 % oder Nüchternnglucose 100 – 125 mg/dl. Die Diabetesprävalenz nach Intervention folgt der Definition des Vorliegens eines T2DM bei Vorhandensein einer der beiden Faktoren HbA1c $\geq 6,5$ % oder Nüchternnglucose ≥ 126 mg/dl.

Mahlzeitentest

Die Auswertung der Blutglucosekonzentration sowie der Hormonspiegel von Insulin und Glucagon als Antwort auf die definierte Mahlzeit zeigten ebenfalls starke Veränderungen zwischen den Visiten V1 und V3. In allen drei Parametern lagen sowohl die basalen Werte, als auch die Antwortkurven zu V3 unterhalb des Vergleichsniveaus zu V1. Diese Unterschiede waren zu allen Zeitpunkten signifikant (Abbildung 9; gepaarter T-Test, $p \leq 0,05$). Die kombinierte Betrachtung der Veränderungen der Hormonantworten von Insulin und Glucagon zeigen, dass bei einigen ResponderInnen die Hormonantwort von Glucagon überwiegt gegenüber anderen, bei denen die Antwort des Insulins am stärksten ausfällt (Abbildung 11). Auch die anhand des Mahlzeitentests errechneten Indices HOMA-IR, PREDIM, Matsuda, OGIS und ISI-Stumvoll veränderten sich über den Interventionszeitraum signifikant in Richtung einer günstigeren Stoffwechsellage. So fiel der dimensionslose HOMA-IR von $5,15 \pm 4,62$ auf $1,89 \pm 1,42$ ($p \leq 0,0001$). Der PREDIM-Index stieg von $-0,41 \pm 0,31 \log(\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{min})$ auf $0,07 \pm 0,28 \log(\text{mg}/\text{kg} \cdot \text{min})$ ($p \leq 0,0001$). Die Werte des Matsuda-Index (ebenfalls dimensionslos) stiegen von $3,4 \pm 1,87$ auf $7,37 \pm 3,74$ ($p \leq 0,0001$), die des OGIS (dimensionslos) stiegen von $238,5 \pm 50,54$ auf $276,27 \pm 54,54$ ($p \leq 0,001$). Ebenso stiegen die Werte des ISI-Stumvoll Index von $0,07 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{kg} \cdot \text{min} \cdot \text{pM}$ auf $0,1 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{kg} \cdot \text{min} \cdot \text{pM}$ ($p \leq 0,0001$) (Abbildung 10).

Der PREDIM-Index wies eine besonders starke Korrelation zu den anderen Indices auf (Pearson-Korrelationskoeffizient zu V1 in Korrelation zum PREDIM-Index: Matsuda = 0,791; ISI-Stumvoll = 0,799; OGIS = 0,651; HOMA-IR = -0,736).

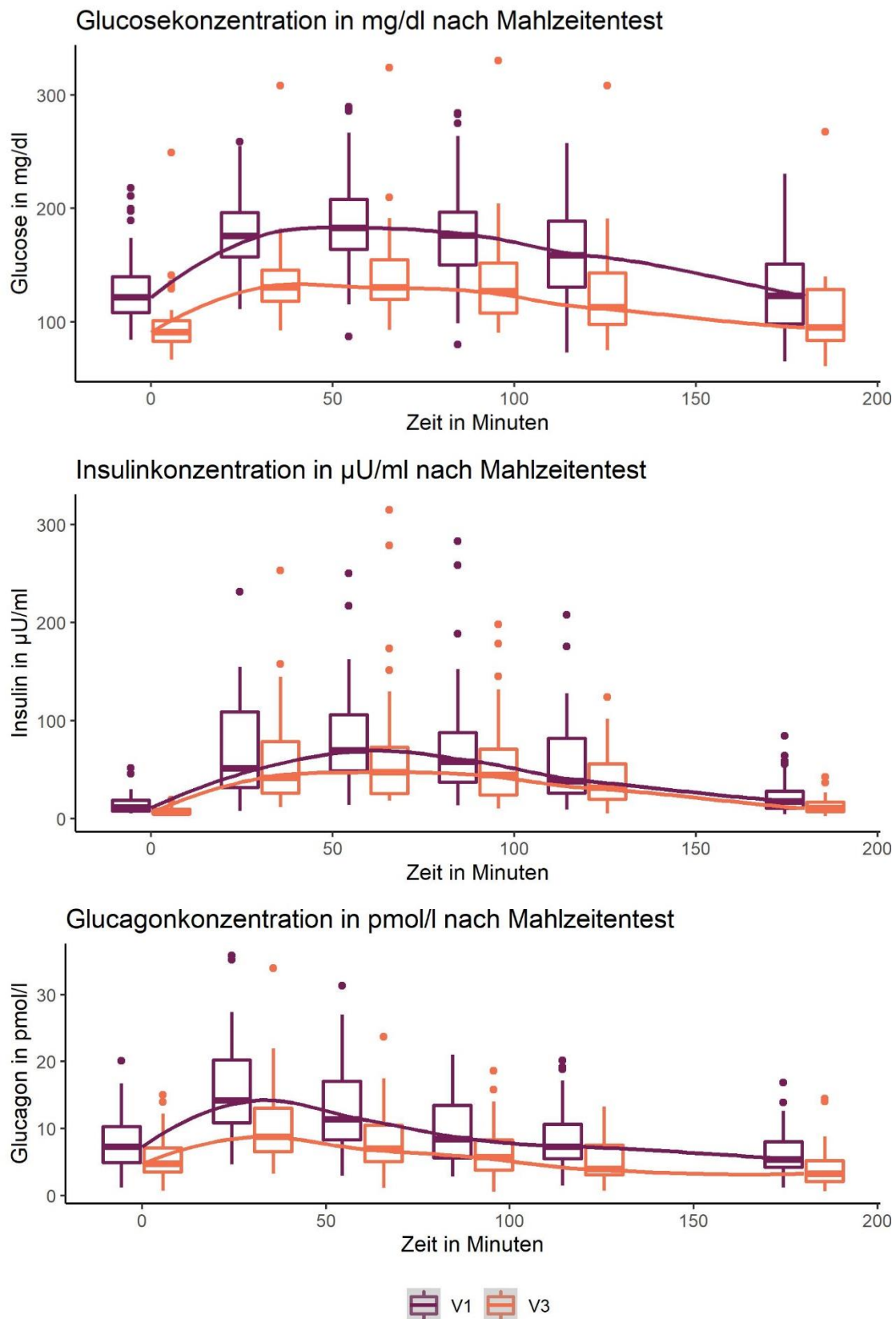


Abbildung 9: Antwortkurven von Glucose, Insulin und Glucagon im MTT

Dargestellt sind die Antwortkurven der Blutglucosekonzentration sowie der Konzentrationen von Insulin und Glucagon im Plasma nach Gabe einer standardisierten Mahlzeit über die Dauer von 180 Minuten. Die Visiten V1 und V3 sind anhand der Farben Lila (V1) und Orange (V3) zu erkennen. Jeder Messzeitpunkt ist durch Darstellung eines Boxplots charakterisiert. Die Linien stellen den bestmöglichen Fit durch alle Datenpunkte dar. V1 und V3 unterscheiden sich innerhalb der jeweiligen Parametern zu allen Zeitpunkten signifikant ($p \leq 0,05$ im gepaarten T-Test).

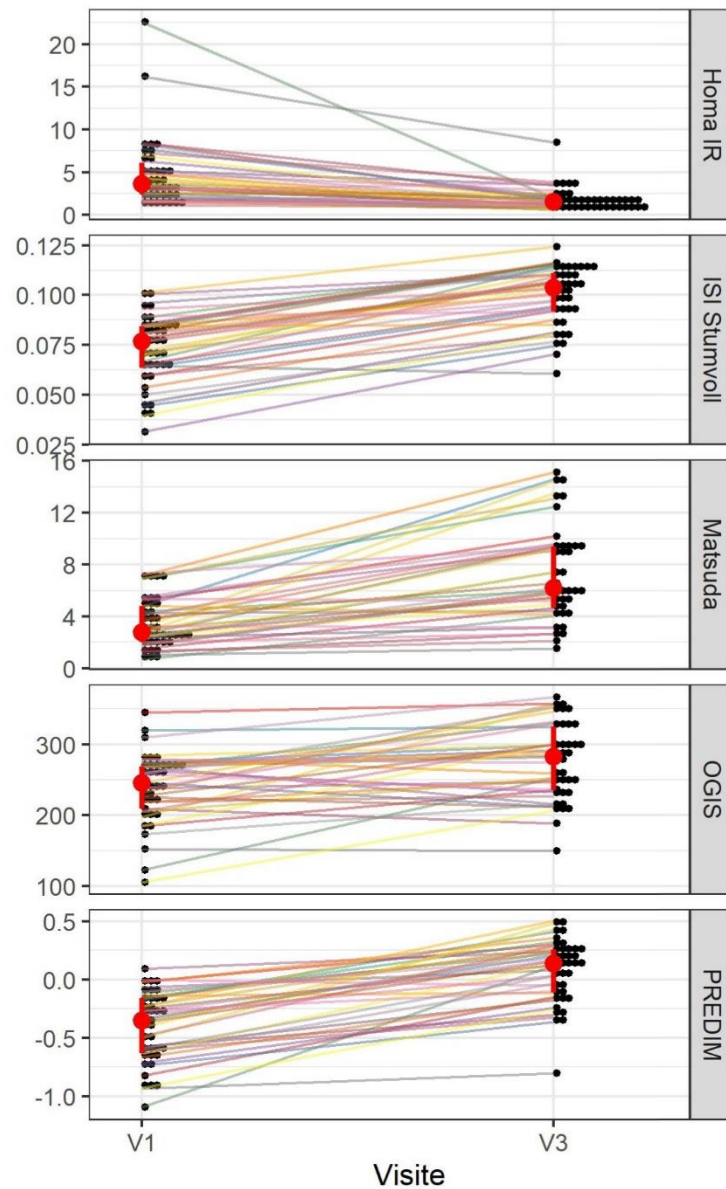


Abbildung 10: Veränderung ausgewählter Indices von V1 zu V3

Dargestellt ist die Veränderung von Stoffwechselindices zwischen den Visiten V1 und V3. Analog zu einem Boxplot sind die Mediane durch rote Punkte gekennzeichnet und das untere bzw. obere Quartil durch rote Linien symbolisiert. Farbige Linien kennzeichnen den Verlauf der einzelnen ProbandInnen. Im gepaarten T-Test erhielt die Veränderung des OGIS-Index ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$. Im gleichen Test erhielten die Veränderungen der anderen Indices ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,0001$.

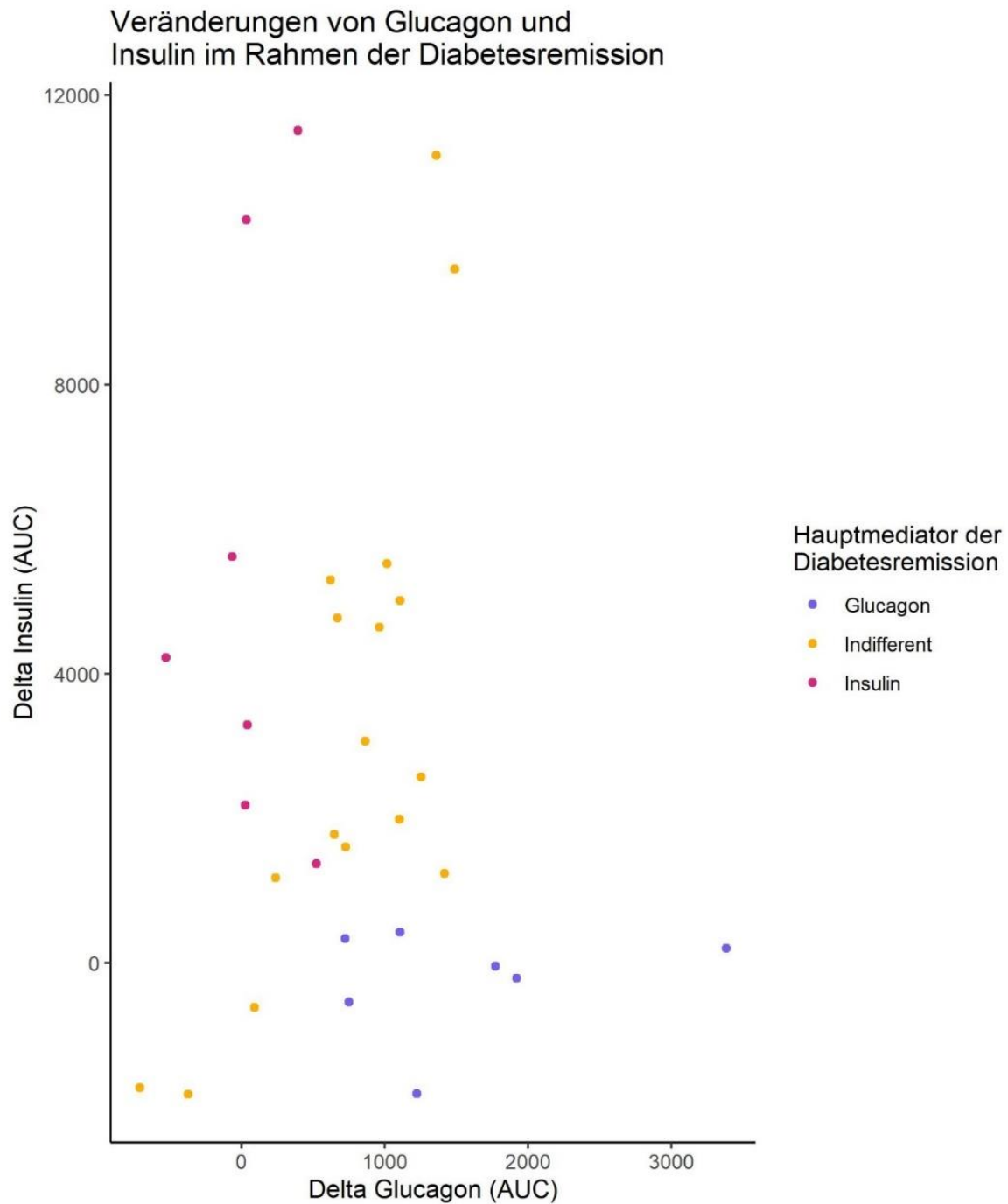


Abbildung 11: Ausmaß der Veränderungen von Glucagon und Insulin nach MTT

Abgebildet ist die Veränderung (V1-V3) der area under the curve (AUC) der Antwortkurven von Glucagon und Insulin nach Aufnahme einer standardisierten Mahlzeit im MTT bei ResponderInnen. Hauptmediatoren sind definiert als für die Veränderung des einen Hormons in den oberen 2 Tertialen und des Anderen im unteren Tertial ansässig.

Mögliche Vorhersagewerte

Es werden drei lineare Modelle präsentiert. Zwei von diesen haben als abhängige Variablen die Glucoseantwort zu V3, einmal in Form der Nüchternglucose als diabetesdefinierenden Faktor und einmal die Area under the Curve (AUC) der Glucoseantwort des MTT als Reflektion der nahrungsabhängigen Glucoseverwertung. Das dritte Modell bezieht sich auf den PREDIM-Index zu V3 als abhängige Variable. Dieser Index wurde zur Modellierung ausgewählt, da er aufgrund seiner im vorigen Abschnitt besprochenen hohen Korrelation zu den anderen Indices eine Zusammenschau der von den Indices abgebildeten Stoffwechsellage bietet. Abhängige Variablen wurden anhand ihrer klinischen Relevanz und der Ergebnisse einfacher Korrelationsanalysen mit der entsprechenden Zielvariable ausgewählt. Da mögliche Vorhersagewerte identifiziert werden sollen, können mit Ausnahme des Gewichtsverlustes innerhalb der ersten Woche alle Parameter bereits zum Zeitpunkt V1 erhoben werden.

Multipl. Lineares Modell zur Nüchternglucose zum Zeitpunkt V3

Dieses lineare Modell hat als abhängige Variable die Nüchternglucose zu V3. Es ergaben sich positive Regressionskoeffizienten für die Nüchternglucose zu V1 ($\hat{\beta}_i = 4,81$, 95 %-KI = 1,97 - 7,65, $p = 0,0017$) und dem basalen Glucagon zu V1 ($\hat{\beta}_i = 1,54$, 95 %-KI = -0,68 - 3,77, $p = 0,17$). Lediglich die Nüchternglucose zu V1 erwies sich hierbei als signifikanter Faktor erwies. Signifikant negative Regressionskoeffizienten ergaben sich für das Alter ($\hat{\beta}_i = -7,2$; 95 %-KI = -14,36 - -0,04, $p = 0,049$) und den Gewichtsverlust nach einer Woche ($\hat{\beta}_i = -7,65$; 95 %-KI = -14,68 - -0,62, $p = 0,034$). Ein nicht signifikanter Effekt konnte der Diabetesdauer <4 Jahren ($\hat{\beta}_i = -6,75$, 95 %-KI = -16,57 - 3,07, $p = 0,17$), dem BMI zu V1 ($\hat{\beta}_i = -0,38$; KI = -2,31 - 1,54, $p = 0,69$), sowie dem HOMA-IR zu V1 ($\hat{\beta}_i = -0,62$; KI = -3,1 - 1,87, $p = 0,62$) zugeordnet werden. Dem weiblichen Geschlecht wurde in diesem Modell der Regressionskoeffizienten $\hat{\beta}_i = 0,51$ (95 %-KI = -11,22 - 12,23, $p = 0,93$) zugewiesen, welcher sich ebenfalls als nicht signifikant erwies. Das adjustierte R^2 des Modells beträgt 0,45 (Abbildung 12).

Multiple lineare Regression

Nüchtern-glucose zu V3 als abhängige Variable

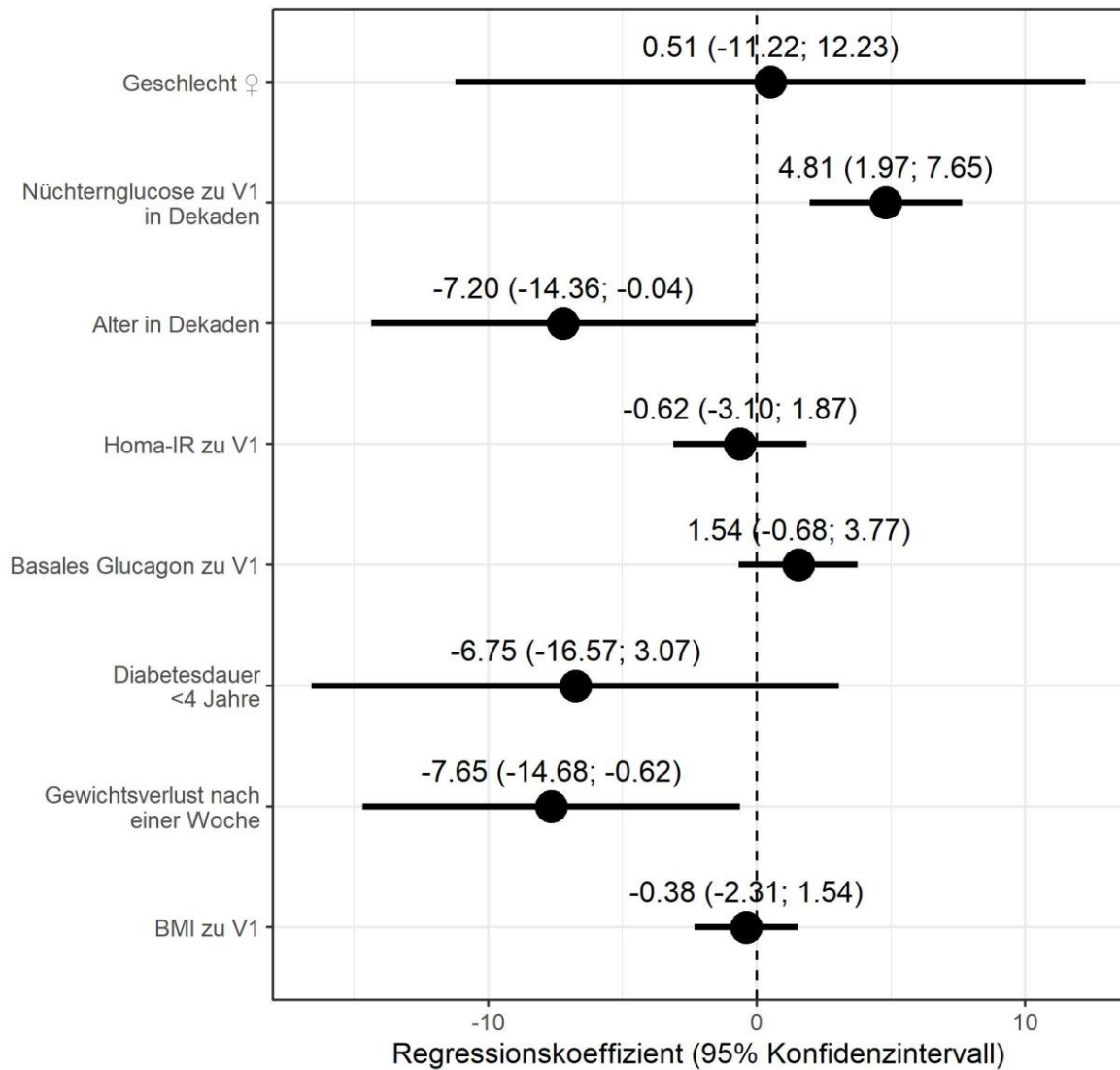


Abbildung 12: Multiple lineare Regression mit Nüchtern-glucose zu V3 als abhängiger Variabel
An der Y-Achse finden sich die unabhängigen Variablen unter Angabe ihrer jeweiligen Regressionskoeffizienten (β_i) und deren 95 %-Konfidenzintervallen.

Multiplres Lineares Modell zur AUC-Glucose des MTT zu V3

Die abhängige Variable dieses linearen Modells ist die AUC der Glucose des MTT zu V3. Signifikant positive Regressionskoeffizienten ließen sich berechnen für die Nüchtern-glucose zu V1 ($\hat{\beta}_i = 9,3$; 95 %-KI = 3,54 – 15,06, $p = 0,0026$). Einen grenzwertig nicht signifikanten positiven Regressionskoeffizienten wurde für das basale Glucagon zu V1 berechnet ($\hat{\beta}_i = 4,48$; 95 %-KI = -0,02 – 8,99, $p = 0,051$). Eine positive, jedoch nicht signifikante Tendenz stellte sich für das weibliche Geschlecht dar ($\hat{\beta}_i = 7,21$; 95 %-KI = -16,58 – 31,01, $p = 0,54$). Signifikant negative Regressionskoeffizienten konnten für die Diabetesdauer <4 Jahre beobachtet werden ($\hat{\beta}_i = -21,71$; 95 %-KI = -41,63 – -1,79, $p = 0,034$). Nicht signifikante Regressionskoeffizienten mit negativer Tendenz konnten dem Alter ($\hat{\beta}_i = -12,01$; 95 %-KI = -26,52 – 2,52, $p = 0,1$), dem Gewichtsverlust nach einer Woche ($\hat{\beta}_i = -13,12$; 95 %-KI = -27,38 – 1,14, $p = 0,07$) sowie dem BMI zu V1 ($\hat{\beta}_i = -2,52$; 95 %-KI = -6,43 – 1,29, $p = 0,2$) zugeordnet werden. Das adjustierte R^2 des Modells beträgt 0,54 (Abbildung 13).

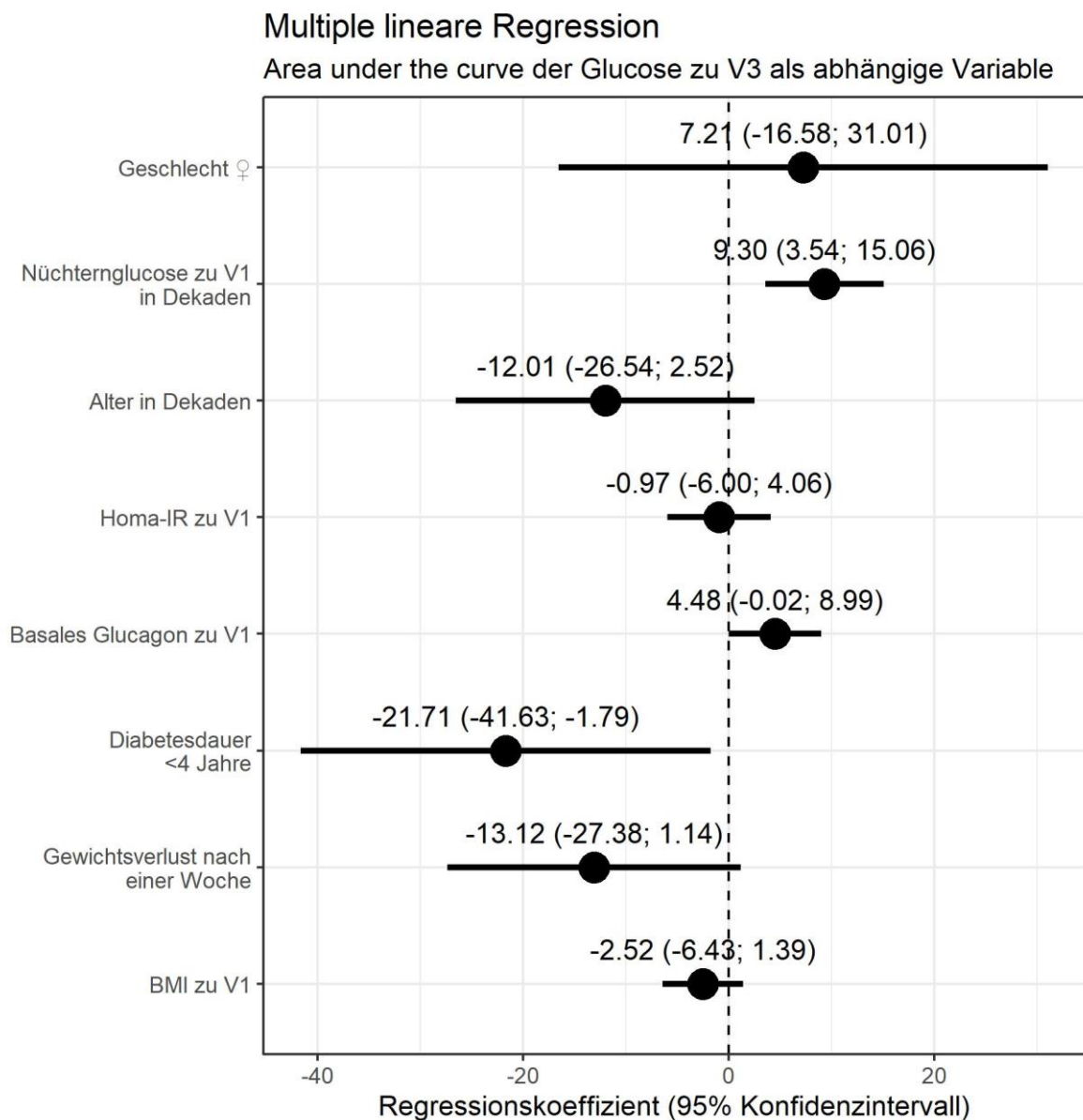


Abbildung 13: Multiple lineare Regression mit AUC Glucose zu V3 als abhängiger Variabel
An der Y-Achse finden sich die unabhängigen Variablen unter Angabe ihrer jeweiligen Regressionskoeffizienten ($\hat{\beta}_i$) und deren 95 %-Konfidenzintervallen.

Multiple Lineares Modell zum PREDIM-Index zu V3

In diesem linearen Modell wird der PREDIM-Index zu V3 als abhängige Variable mit den erläuternden Variablen Geschlecht, PREDIM zu V1, Alter, Diabetesdauer, Gewichtsverlust nach einer Woche und BMI zu V1 in Verbindung gebracht.

Einen signifikant positiven Regressionskoeffizienten wurde dem Gewichtsverlust nach einer Woche zugeordnet ($\hat{\beta}_i = 0,26$; 95 %-KI = 0,05 – 0,47, $p = 0,016$). Mit einem signifikant negativen Regressionskoeffizienten fließt der BMI zu V1 in die Modelrechnung ein ($\hat{\beta}_i = -0,08$; 95 %-KI = -0,13 – -0,02, $p = 0,01$). Positive, jedoch nicht signifikante Regressionskoeffizienten wurden der Diabetesdauer <4 Jahren ($\hat{\beta}_i = 0,04$; 95 %-KI = -0,25 – 0,17, $p = 0,77$), sowie dem PREDIM-Index zu V1 ($\hat{\beta}_i = 0,5$; 95 %-KI = -0,16 – 1,17, $p = 0,13$) zugeordnet. Marginale negative Regressionskoeffizienten erhielten das weibliche Geschlecht ($\hat{\beta}_i = -0,11$; 95 %-KI = -0,41 – 0,18, $p = 0,44$) und das Alter ($\hat{\beta}_i = -0,1$; 95 %-KI = -0,32 – 0,12, $p = 0,35$). Das adjustierte R^2 des Modells beträgt 0,42 (Abbildung 14).

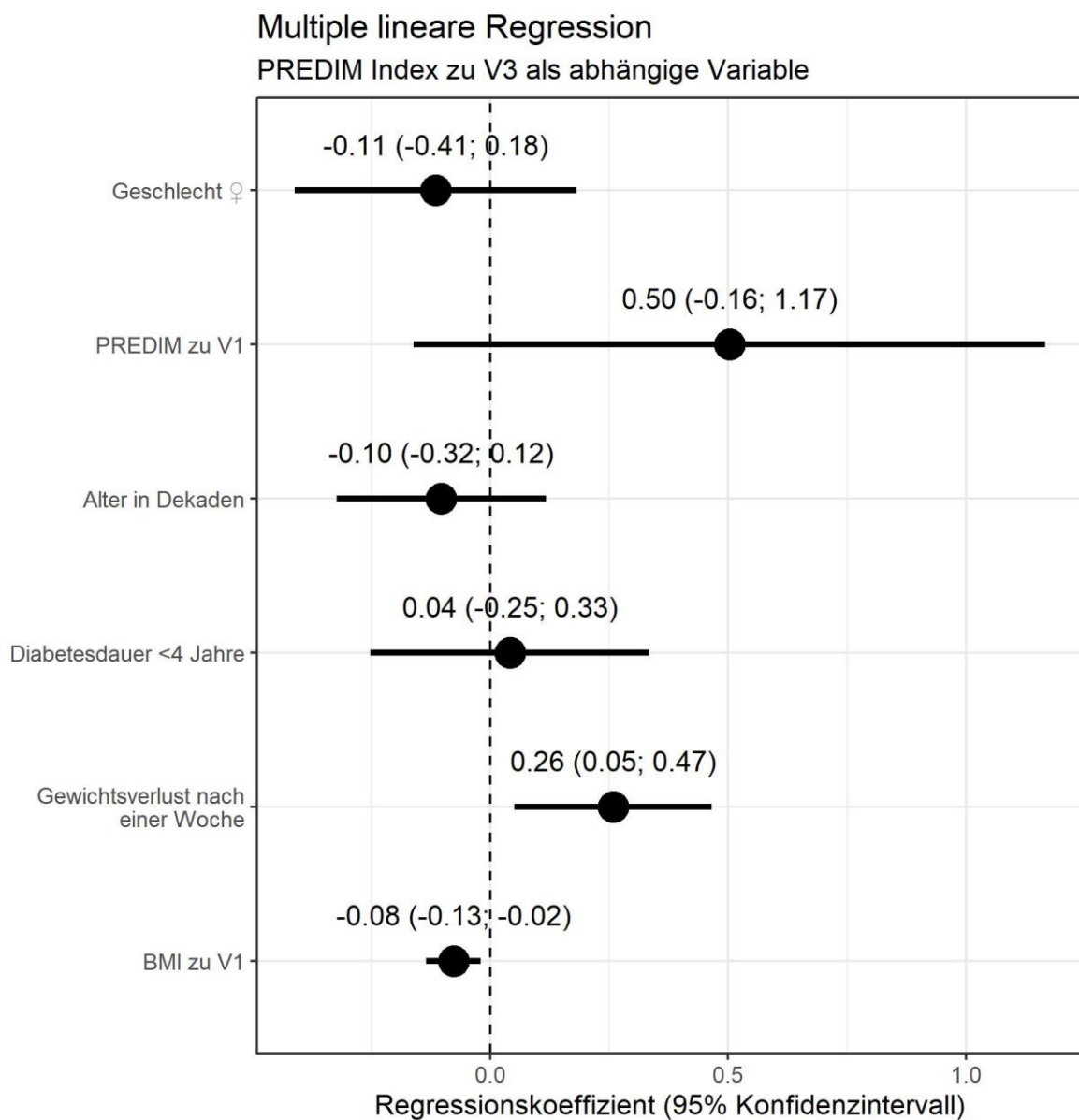


Abbildung 14: Multiple lineare Regression mit PREDIM zu V3 als abhängiger Variabel

An der Y-Achse finden sich die unabhängigen Variablen unter Angabe ihrer jeweiligen Regressionskoeffizienten ($\hat{\beta}_i$) und deren 95 %-Konfidenzintervallen.

Stimulationsassays

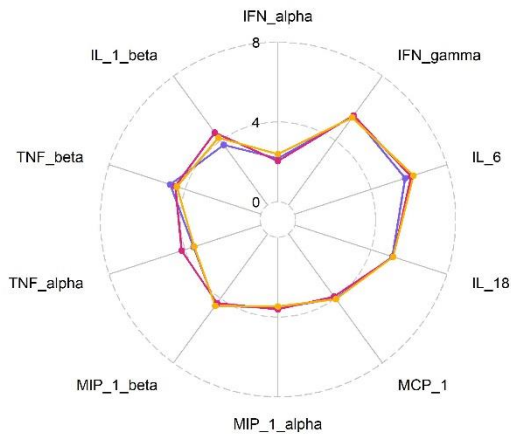
Die Funktionalität primär myeloider Zellen des angeborenen Immunsystems als Antwort auf die Stimulation mit entsprechenden TLR-Stimuli wurde in den Konzentrationsleveln diverser Cytokine und Chemokine dargestellt

Die stärkste Cytokinausschüttung folgte auf die Stimulation mit LPS ($5,3 \pm 6,5 \ln(\text{pg/ml})$) und R848 ($5,05 \pm 5,84 \ln(\text{pg/ml})$). R837 ($4,48 \pm 4,96 \ln(\text{pg/ml})$) stimulierte ebenfalls leicht stärker als die Stimuli PGN ($4,42 \pm 5,05 \ln(\text{pg/ml})$) und cAMP ($4,33 \pm 4,83 \ln(\text{pg/ml})$). Am wenigsten stark fiel die Cytokinantwort in der Kontrollgruppe aus ($4,31 \pm 4,92 \ln(\text{pg/ml})$). Die angegebenen Werte sind über die Cytokinauswahl gemittelt und dienen lediglich der Orientierung. Das Bild bestätigt sich jedoch auch nach Aufschlüsselung der jeweiligen Cytokine und Visiten (Abbildung 15).

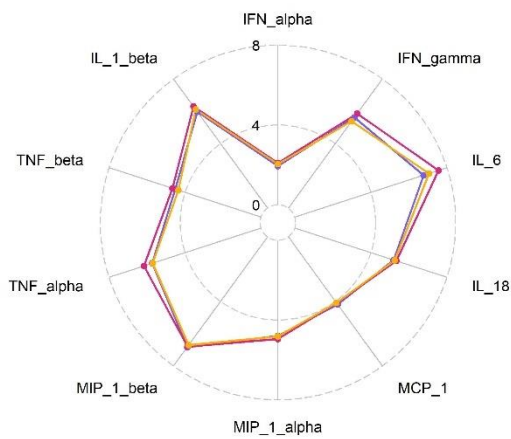
Die Cytokinantworten blieben den zeitlichen Verlauf über stabil im Ausgangsniveau. Nicht signifikante Trends zeigten sich bei Betrachtung der relativen Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle insbesondere nach Stimulation mit LPS und R848 bei den Cytokinen IL-1 β , MIP-1 β und IFN- α (Abbildung 15). So waren die Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle von IL-1 β nach Stimulation mit LPS, R837 und R848 zu V2 maximal erhöht, wohingegen sich keine Änderungen zu den Zeitpunkten V1 und V3 in den Konzentrationsleveln aufzeigten (Tabelle 6). Ein ähnliches Muster zeigte die Konzentrationsänderung des Cytokins MIP-1 β , welches nach Stimulation mit LPS, R837 und R848 zu V2 maximal erhöht war ($p > 0,05$). Zu V1 und V3 waren keine signifikanten Konzentrationsänderungen zu beobachten. Ein inverses Verhalten zeigte das Cytokin IFN- α in der Konzentrationsänderung im Vergleich zur Negativkontrolle nach Stimulation mit R848 und R837. Hier war zu V2 eine geringere Konzentrationsänderung als zu den anderen Visiten zu beobachten. Über alle Zeitpunkte im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht, jedoch ohne erkennbares Muster stellten sich die Konzentrationen der Cytokine TNF- α und MIP-1- α in den Stimulationen mit LPS und R848 dar. Signifikante Änderungen der Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle (Fold change) ergaben sich für IL-1 β nach Stimulation mit LPS und R848, MIP-1 β nach Stimulation mit LPS, R848 und R837 und IFN- α nach Stimulation mit R848 und R837 (letzteres nur zu V2) (Tabelle 6). Die Konzentrationsänderungen aller erhobenen Cytokine nach Stimulation mit PGN und cAMP blieben zu den drei Zeitpunkten unverändert ($< 0,3$ bzw. $> -0,6$; $p > 0,05$).

a

Negativkontrolle



Stimulus = LPS



Stimulus = R837

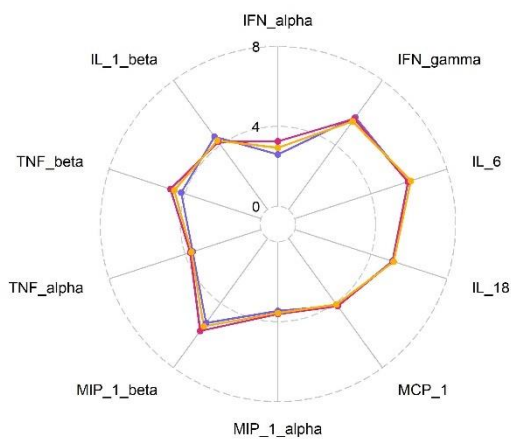
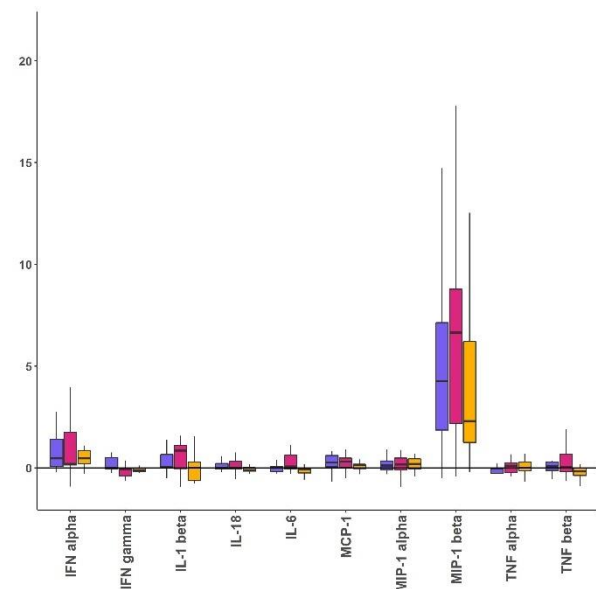
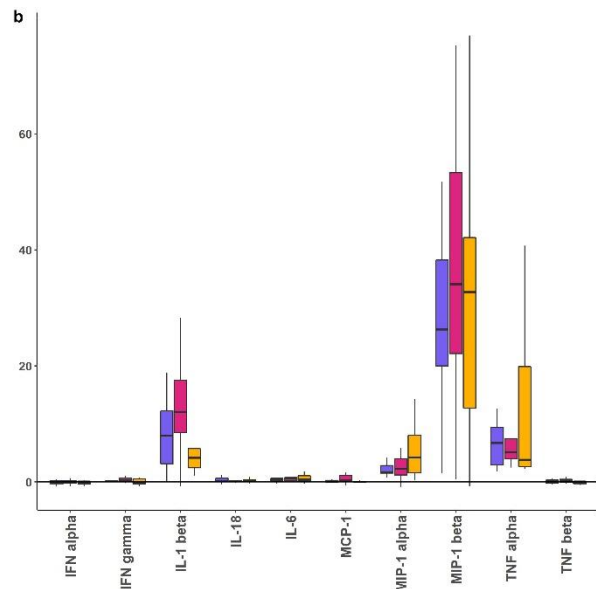
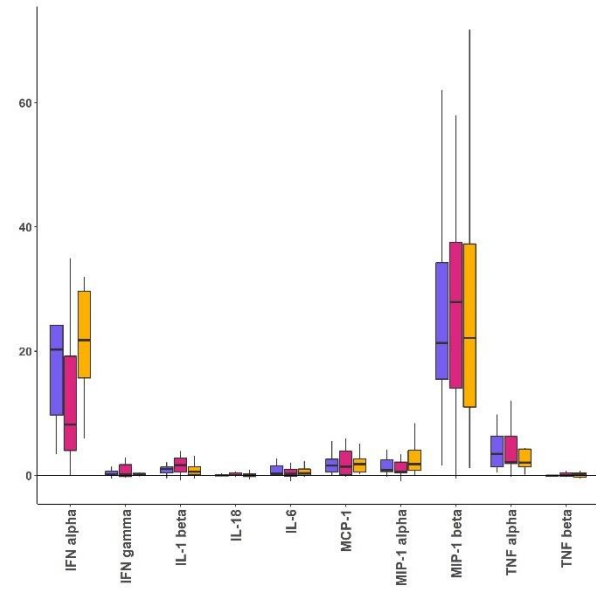
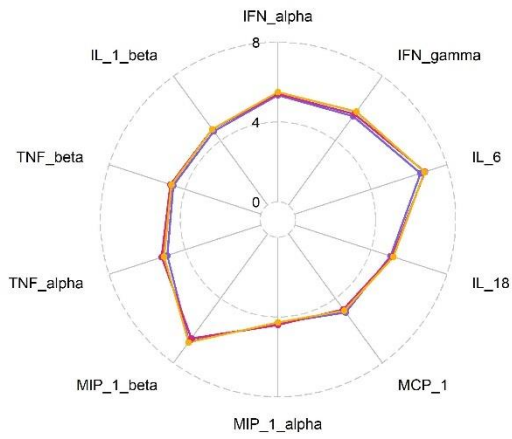


Abbildung 15: Cytokinsekretion nach Stimulation mit diversen TLR-Agonisten

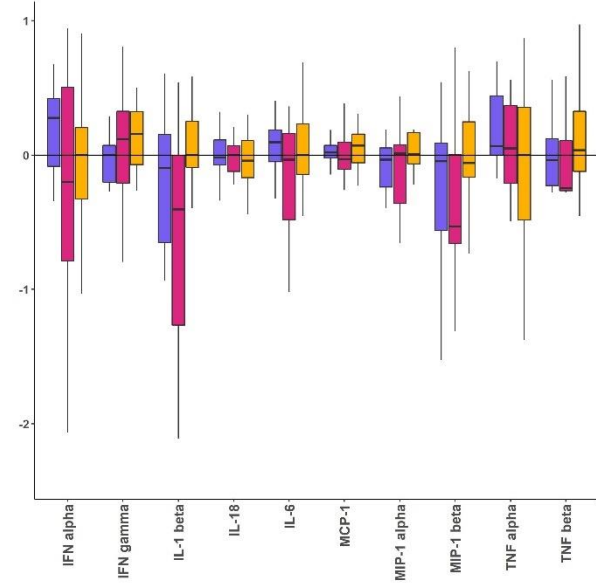
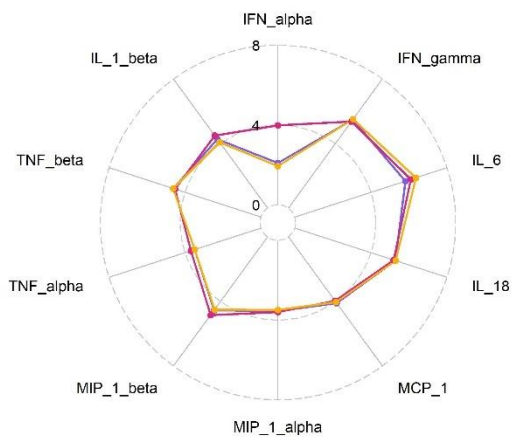
(a) Spiderplots zeigen die Cytokinkonzentrationen im Serum nach Stimulation mit dem entsprechenden TLR-Stimulus bzw. der Negativkontrolle. Die Konzentrationen sind als logarithmierte Werte dargestellt (ln). Die ursprüngliche Einheit ist pg/ml. (b) Boxplots zeigen die dem jeweiligen Stimulus zugehörige, relative Veränderung der Cytokinkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle. Auf die Abbildung von Ausreißern (Definiert als $X < Q_1 - 1,5 * IQR$; $X > Q_3 + 1,5 * IQR$) wurde verzichtet. Die Messzeitpunkte sind farblich kodiert (Violett = V1; Pink = V2; Orange = V3).



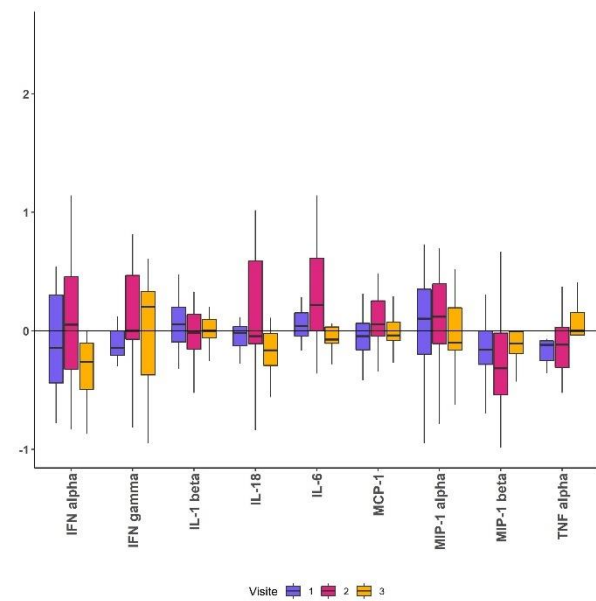
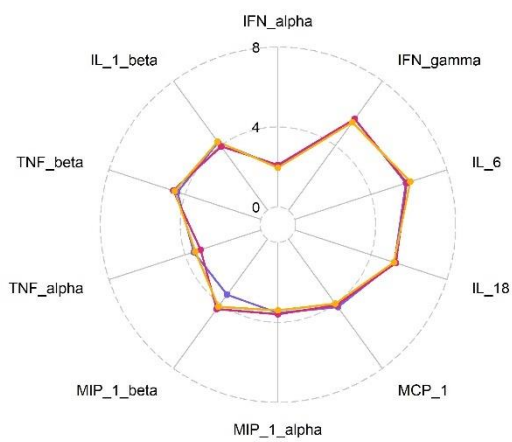
Stimulus = R848



Stimulus = PGN



Stimulus = C-di-AMP



— V1 — V2 — V3

Visite 1 2 3

Relevante Konzentrationsänderungen im Vergleich zur Negativkontrolle

Cytokin	Stimulus	V1		V2		V3	
IL-1 β	LPS	7,93 \pm 9,09	(**)	11,99 \pm 9,07	(**)	4,13 \pm 3,33	(***)
IL-1 β	R848	1,03 \pm 1,01	(**)	1,68 \pm 2,26	(*)	0,61 \pm 1,25	(**)
MIP-1 β	LPS	26,26 \pm 18,24	(***)	34,06 \pm 31,16	(***)	32,7 \pm 29,38	(***)
MIP-1 β	R837	4,26 \pm 5,29	(**)	6,64 \pm 6,58	(**)	2,3 \pm 4,96	(*)
MIP-1 β	R848	21,33 \pm 18,67	(***)	27,94 \pm 23,47	(***)	22,12 \pm 26,27	(***)
IFN- α	R837	0,47 \pm 1,355	(ns)	0,19 \pm 1,6	(*)	0,47 \pm 0,64	(ns)
IFN- α	R848	20,27 \pm 14,43	(***)	8,17 \pm 15,2	(**)	21,78 \pm 13,98	(***)
TNF- α	LPS	6,52 \pm 3,83	(***)	6,92 \pm 5,07	(**)	13,17 \pm 15,84	(****)
TNF- α	R848	4,51 \pm 4,15	(***)	4,69 \pm 4,15	(**)	4,65 \pm 4,54	(****)

Tabelle 6: Relevante Konzentrationsänderungen im Vergleich zur Negativkontrolle

Dargestellt sind relevante Konzentrationsänderungen relativ zur Negativkontrolle (fold change) von Cytokinen, gemessen nach Stimulation mit dem angegebenen Stimulus unter Angabe des Medians \pm IQR (Vergleich Abbildung 4b). Angabe des Signifikanzniveaus in Klammern. Berechnung der Signifikanzniveaus mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test in Bezug auf die Negativkontrolle des entsprechenden Cytokins zum jeweiligen Zeitpunkt. $p > 0,05^{ns}$, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,0001^{****}$.

Immunzellphänotypisierung mittels FACS

Vollblutfärbung – Lineage Panel

Anhand des Lineage Panels wurden die relativen Größen der Zellpopulationen CD3⁺ T-Zellen, CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen, CD16⁺ Granulozyten und CD19⁺ B-Zellen im Blut bestimmt und Veränderungen dieser Zellpopulationen über die Zeit (V1, V2, V3) festgehalten.

Es ergaben sich diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen in der relativen Größe der analysierten Zellpopulationen. So stellte die Population der CD3⁺ T-Zellen über die Zeit einen prozentualen Anteil von 45,95 \pm 12,8 % (V1), 43,39 \pm 11,59 % (V2) und 47,1 \pm 14,4 % (V3) relativ zur Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten dar (Abbildung 16). Die Subpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen stellte einen prozentualen Anteil von 66,6 \pm 8,08 % (V1), 65,84 \pm 8,71 % (V2) beziehungsweise 65,78 \pm 1 % (V3) der CD3⁺ T-Zellen dar (Abbildung 16). Der prozentuale Anteil der CD19⁺ B-Zellen an den CD3⁺ Leukozyten betrug nahezu unverändert 19,33 \pm 1,19 % (V1), 18,86 \pm 1,4 % (V2) und 20,38 \pm 1,27 % (V3) (Abbildung 17). An den CD3⁺ Leukozyten stellten Granulozyten einen prozentualen Anteil von 27,5 \pm 2,04 % (V1), 26 \pm 2,21 % (V2) und 29,71 \pm 2,68 % (V3) (Abbildung 18).

T-Zellen und Anteil an T-Helferzellen

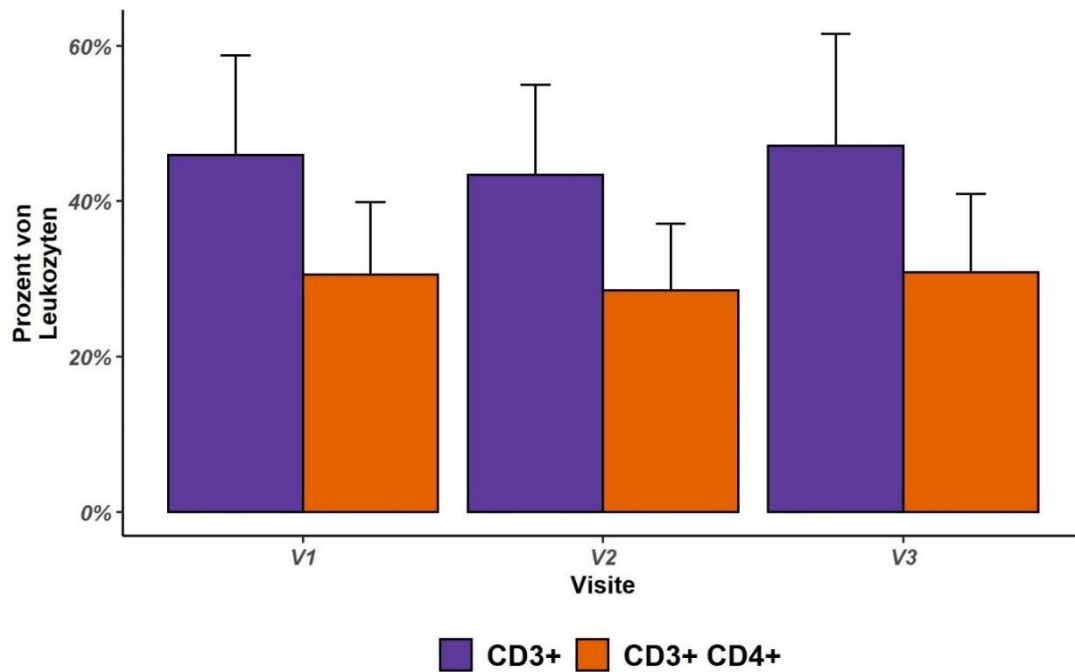


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der CD3+ T-Zellen und CD3+CD4+ T-Helferzellen im Blut

Abgebildet ist der prozentuale Anteil von CD3+ T-Zellen und CD3+CD4+ T-Helferzellen an der Gesamtheit der CD45+ Leukozyten über die drei Zeitpunkte V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

B-Zellen

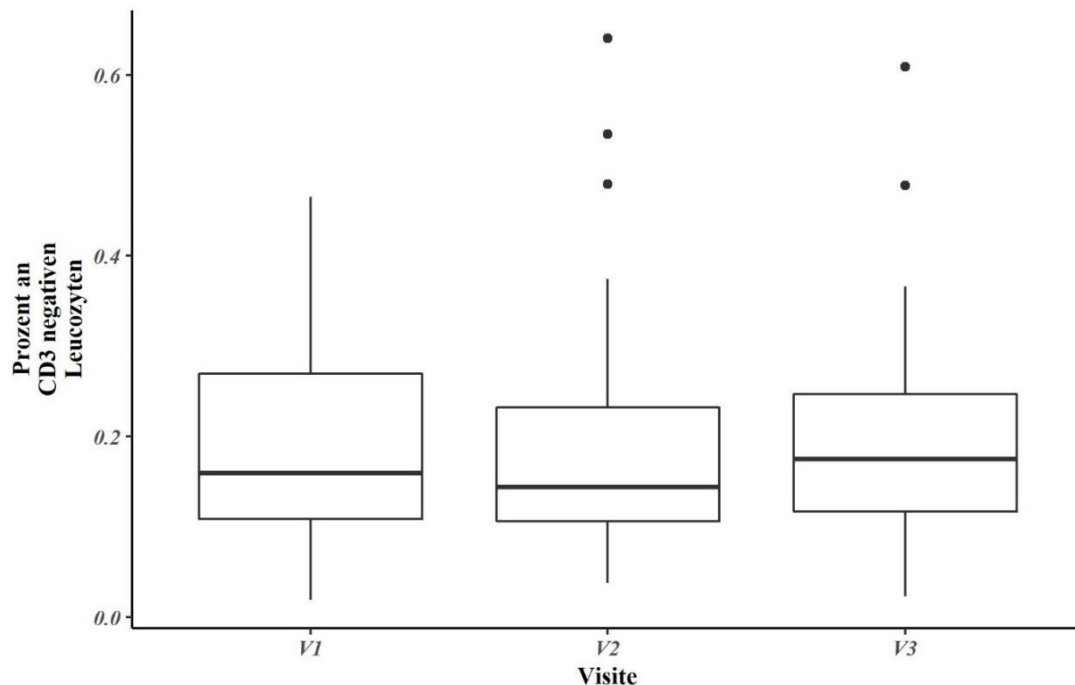


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der CD19+ B-Zellen im Blut

Abgebildet ist der prozentuale Anteil der CD19+ B-Zellen an der Gesamtheit der CD3- Leukozyten über die drei Zeitpunkte V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

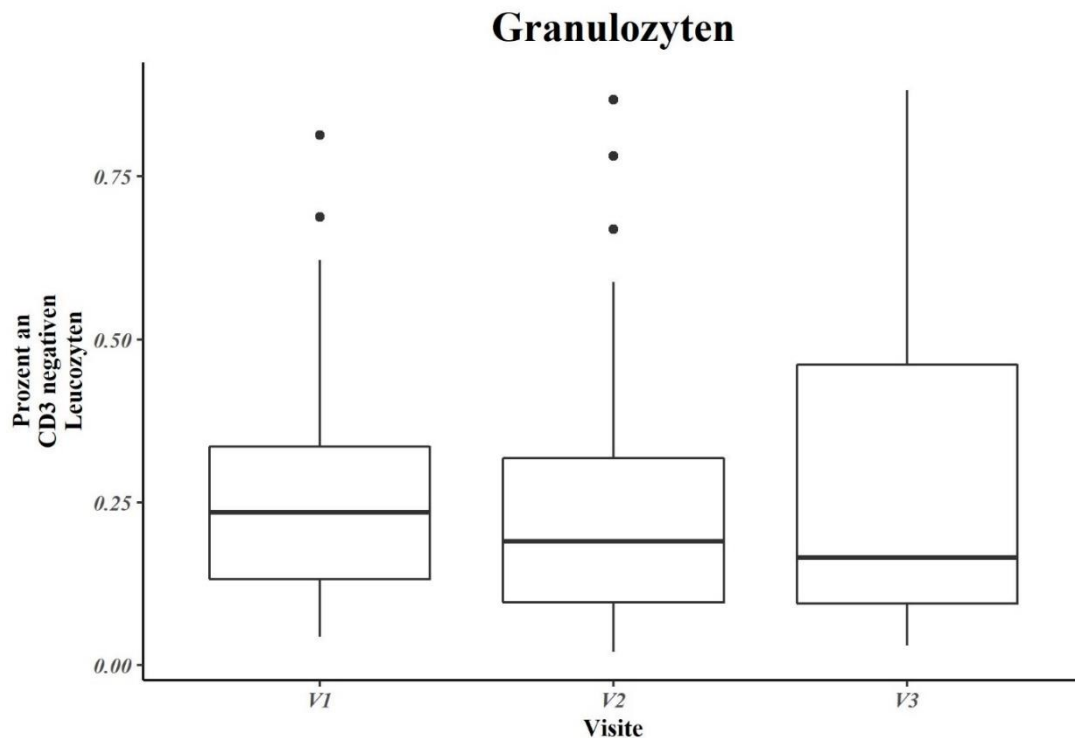


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der CD16⁺ Granulozyten im Blut

Abgebildet ist der prozentuale Anteil der CD16⁺ Granulozyten an der Gesamtheit der CD3⁻ Leukozyten über die drei Zeitpunkte V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

Monozytenpanel

Mittels des Monozytenpanels wurde die relative Größe der Monozyten- und deren Subpopulationen abgebildet. Anhand der Marker CD80, CD86, HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ wurde der Aktivierungsgrad der Monozyten subpopulationen beschrieben. Das Monozytenpanel erlaubt so eine detaillierte Aufschlüsselung der Monozyten im Blut. Aufgrund der Zusammenhänge von insbesondere Monozyten und Makrophagen und der Pathogenese lebensstilbedingter Erkrankungen wurde sich auf den Zelltyp der Monozyten fokussiert (siehe Abschnitt Immunologische Aspekte der Pathogenese des T2DM).

Ein der Dynamik des Lineage Panel vergleichbares Bild ergab auch die Auswertung der Monozytenfärbung. So stellten Monozyten über die Zeit nahezu unverändert einen prozentualen Anteil von $4,56 \pm 3,94 \%$ (V1), $5,13 \pm 4,25 \%$ (V2) sowie $5,99 \pm 3,98 \%$ (V3) an der PBMC-Population dar (Abbildung 19). Anhand der Marker CD14 und CD16 lassen sich Monozyten in die Subpopulationen der klassisch aktivierten (CD14⁺ CD16⁻) und alternativ aktivierten (CD14⁻ CD16⁺) Monozyten einteilen [47]. Klassisch aktivierte Monozyten stellten über die Zeit einen prozentualen Anteil von $41,85 \pm 20 \%$ (V1), $40,22 \pm 27 \%$ (V2) sowie $33,62 \pm 20,87 \%$ (V3) dar. Alternativ aktivierte Monozyten stellten einen prozentualen Anteil von $12,41 \pm 7,64 \%$ (V1), $15,1 \pm 10,95 \%$ (V2) und $16,74 \pm 9,56 \%$ (V3) dar (Abbildung 20). Die Analyse der Aktivierungsmarker CD80, CD86 sowie HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ in den beiden Monozytenpopulationen, gemessen durch die mean fluorescence intensity (MFI), erbrachte keine signifikanten Veränderungen über die Zeit (Abbildungen 21, 22).

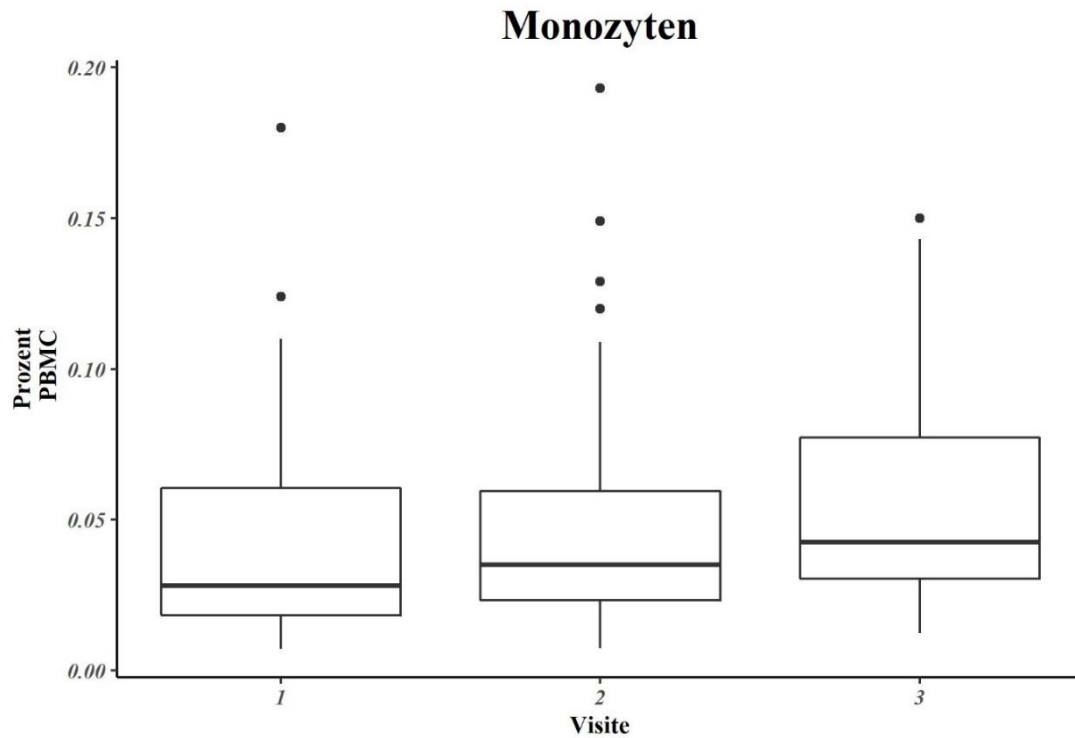


Abbildung 19: Prozentualer Anteil Monozyten im Blut

Abgebildet ist der prozentuale Anteil aller Monozyten an der Gesamtheit der PBMCs über die drei Zeitpunkte V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

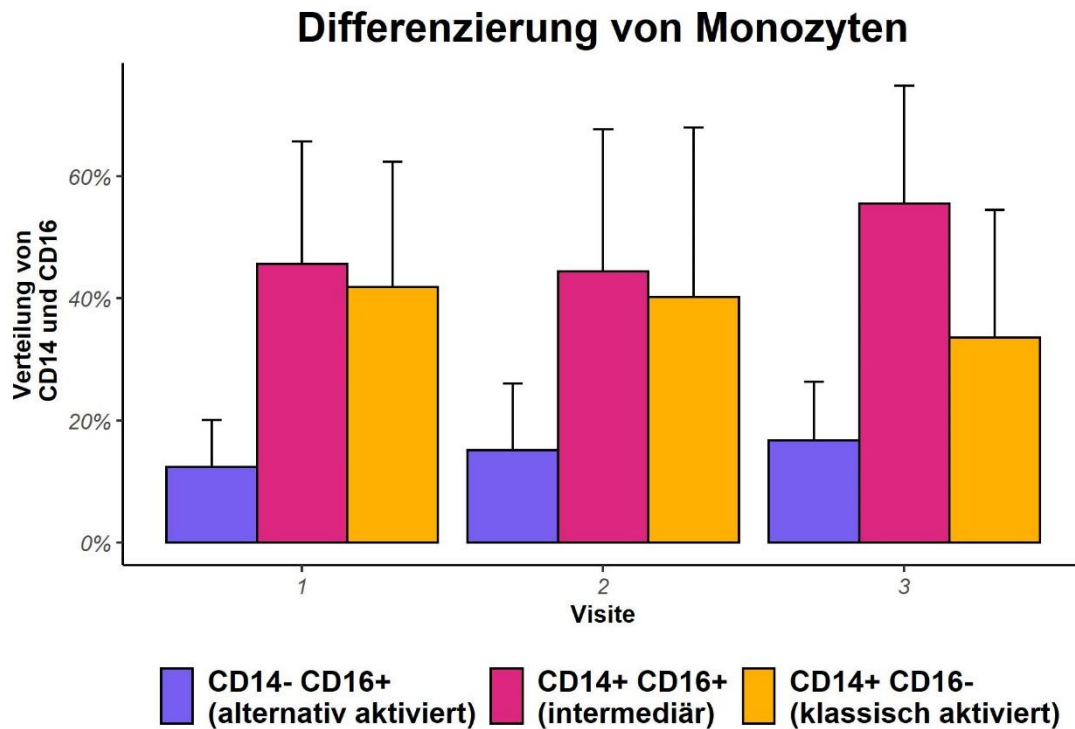


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der verschiedenen Monozytenpopulationen im Blut

Abgebildet ist der prozentuale Anteil der alternativ aktivierten (lila), intermediären (pink) und klassisch aktivierten (gelb) Monozytenpopulationen an der Gesamtheit der Monozyten über die drei Zeitpunkte V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

Aktivierungsmarker CD80/86 auf Monozyten

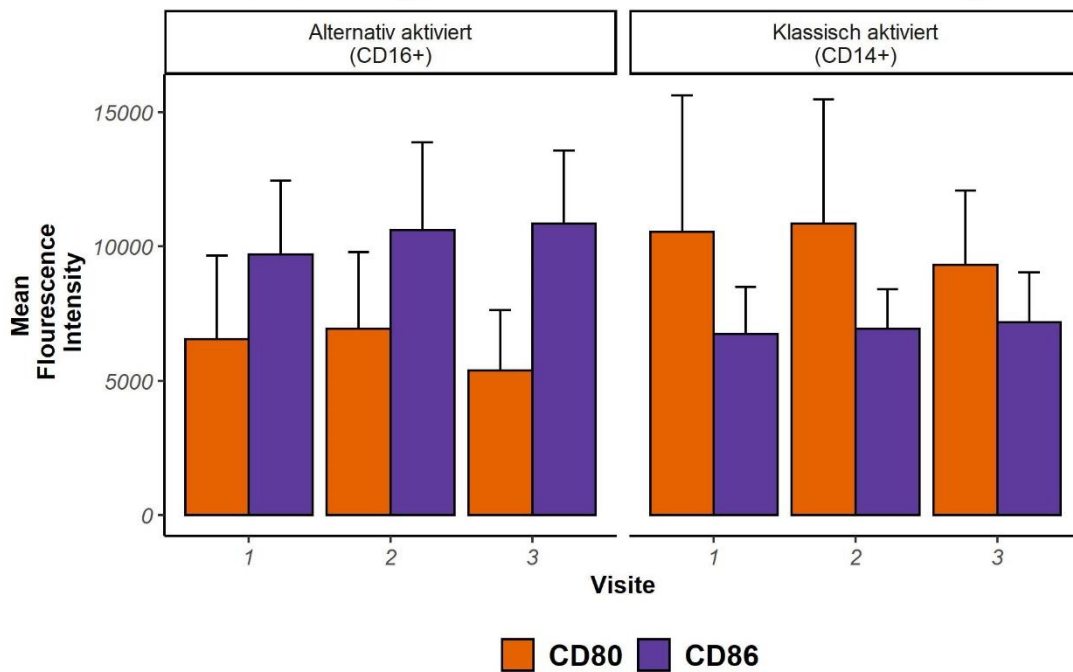


Abbildung 21: MFI der Aktivierungsmarker CD80 und CD86

Abgebildet ist die MFI der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 auf alternativ bzw. klassisch aktivierten Monozyten zu den drei Zeitpunkten V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

Aktivierungsmarker HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ auf Monozyten

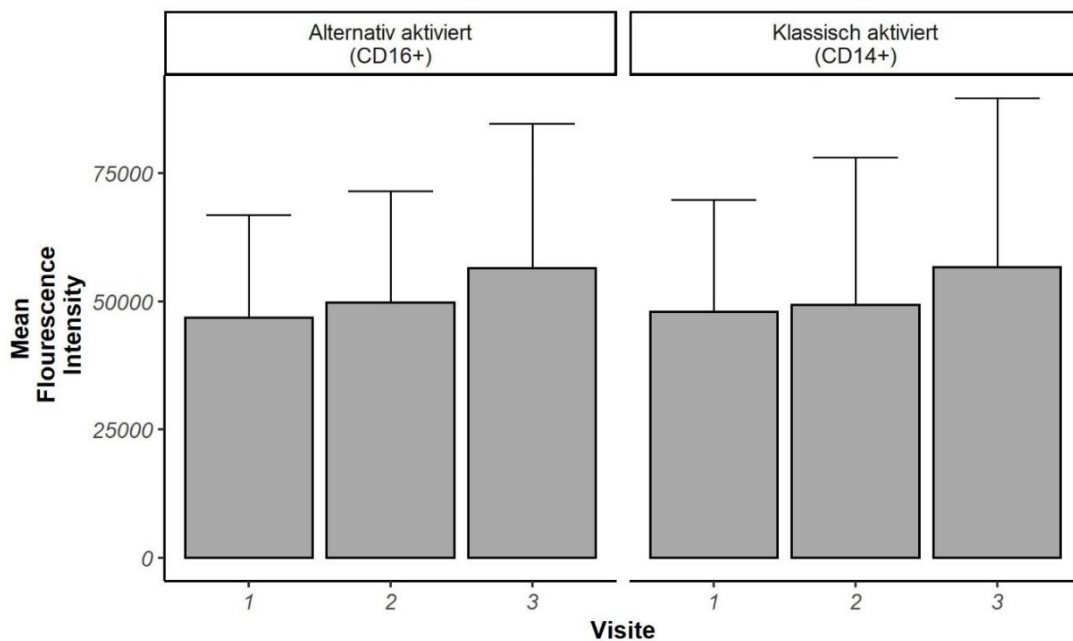


Abbildung 22: MFI der Aktivierungsmarker HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ

Abgebildet ist die MFI der Aktivierungsmarker HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ auf alternativ bzw. klassisch aktivierten Monozyten zu den drei Zeitpunkten V1, V2 und V3. Es waren keine signifikanten Änderungen über die Zeit zu beobachten.

RNA-Sequenzierung

Mittels „3'mRNA-Seq“ wurde die Genexpression zirkulierender Monozyten von 27 StudienteilnehmerInnen untersucht. Die „Core Unit for Bioinformatics Data Analysis“ des Institutes für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn, welche die statistische Aufarbeitung des Datensets vornahm, bestätigte die hohe Qualität der Proben. Mit einem unbiased und explorativen Ansatz wurden potentielle Cluster zu identifizieren, die mit Veränderungen im Genexpressionsprofil in Bezug auf Eigenschaften wie dem Probenentnahmezeitpunkt, dem Geschlecht oder der Veränderung von Stoffwechselfparametern in Zusammenhang stehen. Parameter, die neben Zeitpunkt und Geschlecht in diese Modellierungen einfließen waren Veränderungen des HbA1c, HOMA-IR, Matsuda-Index, CRP, der Leukozytenzahl, des BMI sowie des prozentualen Körperfettanteils.

Es konnte unter Anwendung der genannten Parameter kein statistisches Modell entwickelt werden, welches die Identifikation von unterschiedlichen Genexpressionsclustern zu den verschiedenen Zeitpunkten V1, V2 und V3 erlaubte.

Das vorgestellte Modell beschreibt die Veränderungen der Genexpression in Monozyten zwischen den einzelnen Visiten (Abbildung 23) sowie die Veränderung der 15 von V1 zu V2 (Abbildung 23A) am stärksten veränderten Gene über den gesamten Zeitverlauf unter Beachtung des Geschlechts der StudienteilnehmerInnen (Abbildung 24).

Unter der Annahme, dass biologisch bedeutsame Genexpressionsänderungen neben dem statistisch signifikanten Unterschied auch eine Änderungsrate in wesentlichem Maße benötigen, wurden nur Gene als relevant definiert, die zwei Gütekriterien erfüllten. Erstens mussten solche Gene ein $p \leq 0,05$ im gepaarten T-Test nach Benjamini-Hochberg-Korrektur aufweisen. Zweitens musste die Änderungsrate außerhalb von -1 und 1 des zur Basis 2 logarithmierten fold changes der Genexpression zwischen den betrachteten Zeitpunkten liegen.

Diese beiden Kriterien trafen im Vergleich der Zeitpunkte V1 und V2 für die Gene „LTF“ und „RMD1“ zu. Der $\log_2(\text{fold change})$ beider Gene war < -1 , was bedeutet, dass die beiden Gene zu V2 in geringerem Maße als zu V1 exprimiert wurden. Das Gen „LTF“ erwies sich auch zum Zeitpunkt V3 im Vergleich zu V1 als relevant herabreguliert, nicht jedoch im Vergleich der Zeitpunkte V2 und V3 (Abbildung 23).

Neben den beiden genannten Genen wiesen keine weiteren Gene signifikante Änderungen in ausreichendem Umfang auf. Durch die Aufschlüsselung der standardisierten Genexpression der Gene mit den relevantesten Veränderungen nach den drei Untersuchungszeitpunkten (V1, V2, V3) und dem Geschlecht der StudienteilnehmerInnen ließ sich keine weitere Clusterbildung erreichen. Dies ist beispielhaft an den 15 am relevantesten veränderten Genen aus dem Vergleich V1 zu V2 gezeigt (Abbildung 24). Weder die Erweiterung dieser Genliste auf die 30 am relevantesten veränderten Gene, noch die Anwendung auf die entsprechenden Gene der Vergleiche V2 zu V3 und V1 zu V3 ließen Clusterbildung zu, sondern ergaben ein zu Abbildung 24 analoges Bild.

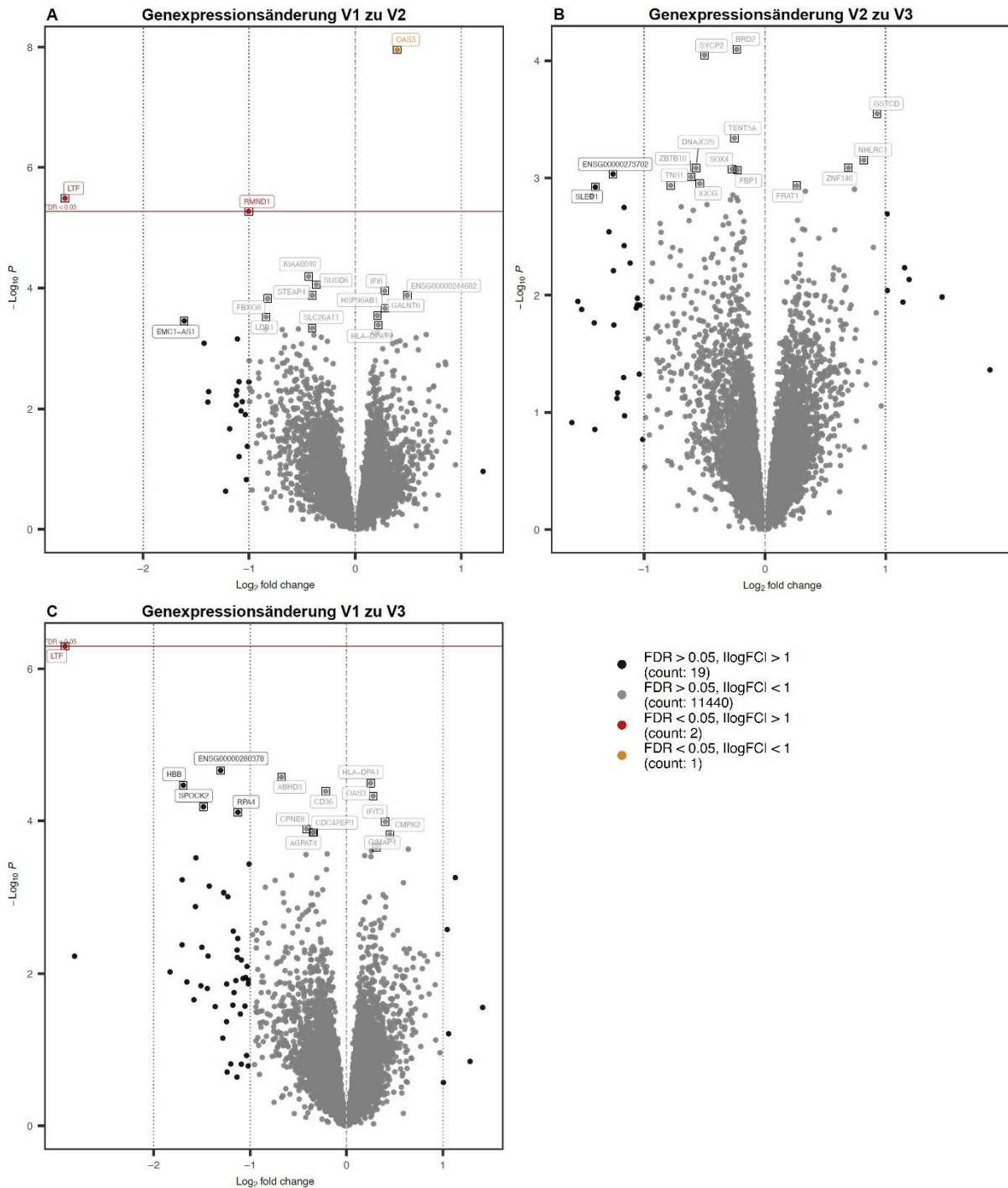


Abbildung 23: Genexpressionsänderung zwischen den Visiten

Volcano-Plots zeigen die Signifikanz der Genexpressionsänderung (Signifikant = $FDR\text{-adj. } p < 0,05$) gegen das Ausmaß der Genexpressionsänderung (bedeutsame Änderungen wurden definiert als $\log_2(\text{fold change}) > 1$ v. < -1). Die vier sich daraus ergebenden Kombinationsmöglichkeiten sind farblich kodiert:

- Grau = Unbedeutsame, nicht signifikante Genexpressionsänderung;
- Schwarz = Bedeutsame, nicht signifikante Genexpressionsänderung;
- Orange = Unbedeutsame, signifikante Genexpressionsänderung;
- Rot = Bedeutsame, signifikante Genexpressionsänderung.

A) Vergleich der Genexpression der Zeitpunkte V1 und V2; B) Vergleich der Genexpression der Zeitpunkte V2 und V3; C) Vergleich der Genexpression der Zeitpunkte V1 und V3

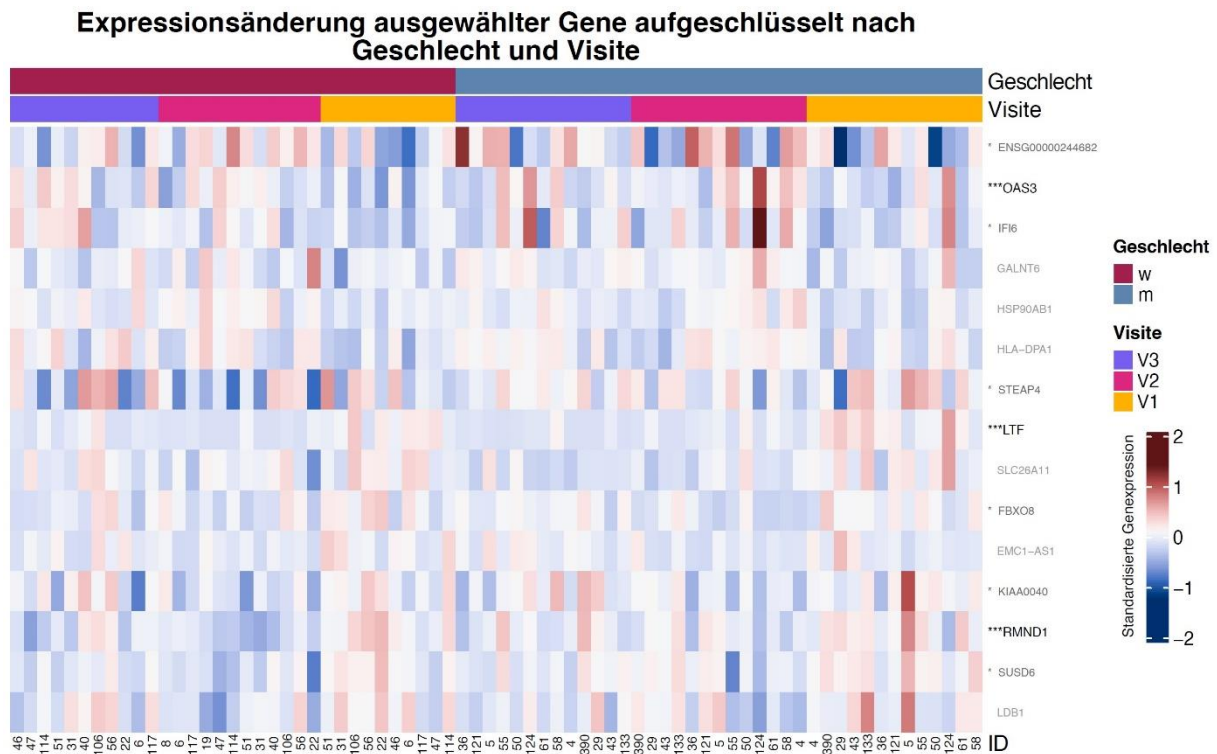


Abbildung 24: Expressionsänderung ausgewählter Gene aufgeschlüsselt nach Geschlecht und Visite

Dargestellt ist die standardisierte Genexpression auf einer Farbskala von dunkelrot zu dunkelblau der 15 Gene, deren Änderung sich im Vergleich V1-V2 am signifikantesten und stärksten zeigte (Abbildung 23A). Zeilen symbolisieren die Gene, Spalten die Proben. Die beiden Kopfzeilen visualisieren die Aufschlüsselung der Proben nach Geschlecht (w; m) und Visite (V1; V2; V3). An der X-Achse sind die IDs der StudienteilnehmerInnen aufgetragen.

Diskussion

Diabetesremission

Unsere Ergebnisse zeigen die umfassenden metabolischen Veränderungen auf, die mit dem Erreichen einer durch dreimonatige hypokalorische Diät herbeigeführten Diabetesremission einhergehen. 85% der StudienteilnehmerInnen waren nach Abschluss der Intervention per Definition von ihrer Diabeteserkrankung befreit. Da vor Beginn der Interventionsphase alle antidiabetischen Medikamente abgesetzt und mögliche Störfaktoren wie verstärkte körperliche Aktivität ausgeschlossen wurden, kann für diesen Effekt die Intervention als allein ursächlich angesehen werden. Diesen Erfolg erzielten die ProbandInnen unter realitätsnahen Bedingungen, da sie während des Interventionszeitraums ihren gewöhnlichen Aktivitäten nachgingen und lediglich periodisch visitiert und telefonisch kontaktiert wurden. Auch das Angebot, die Studienambulanz bei Bedarf zu besuchen, geht nicht über die Möglichkeiten in der hausärztlichen Versorgung hinaus und spiegelt somit ebenfalls realitätsnahe Bedingungen wieder. Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass die Diabetesremission durch Ernährungsintervention mittels Formuladiät ein realistisches, sicheres und niederschwellig durchzuführendes Therapiekonzept ist. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate der „DiRECT“-Studie, in der 86% der Teilnehmer, die nach 12 Monaten ≥ 15 kg abgenommen haben, ihren Diabetes verloren [25]. Der mittlere Gewichtsverlust in unserer Studienpopulation betrug $15,06 \pm 5,58$ kg, was sich mit den genannten Resultaten deckt. Einzig der Zeitpunkt der Datenerhebung lag in unserer Studie bereits 3 Monate nach Beginn der Intervention im Vergleich zu 12 Monaten bei „DiRECT“ [25]. Mutmaßlich wird

sich die Gruppe mit derart ausgeprägten Gewichtsverlust über die 9 Monate Differenz etwas verkleinern, und den Erfolg unseres Follow-Up Angebotes definieren.

14,01 ± 3,87 kg des verlorenen Gewichts innerhalb der Studienkohorte entfiel auf das Kompartiment des Fettgewebes und lediglich 1,78 ± 2,48 kg auf die fettfreie Masse. Prozentual ausgedrückt verkleinerte sich das Fettkompartiment um 8,16 ± 3,08 % und das fettfreie Kompartiment nahm um den entsprechenden Anteil zu (Tabelle 5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die StudienteilnehmerInnen kaum an Muskelmasse verloren und unterstützt die bereits in der „Twin Cycle Hypothesis“ postulierte Bedeutung des Verlustes von Fettmasse bei der Diabetesremission [31-34]. In Bezug auf die Hypothese wäre es interessant, das Fettkompartiment weiter zu spezifizieren und den Anteil des hepatischen Fettverlustes zu bestimmen. Dies könnte in einer Folgestudie durch magnetresonanzspektroskopische Leberfettbestimmung untersucht werden. Einen Hinweis auf eine starke Abnahme des Leberfettgehalt der StudienteilnehmerInnen bieten die signifikant gefallene ALT und gGT, welche als Prädiktoren des intrahepatischen TAG-Gehalts herangezogen werden können [82-84]. Ebenfalls in diese Richtung weisen die signifikant gefallen Indices FLI und NAFLD-FLS, anhand derer der Leberfettgehalt vorhergesagt werden kann [77, 78]. Gemäß der beiden Indices verringerte sich die Gruppe der StudienteilnehmerInnen mit erhöhtem Leberfettgehalt während der Intervention von 33 auf 16 (FLI) bzw. von 37 auf 19 (NAFLD-FLS) StudienteilnehmerInnen. Die Indices unterscheiden sich hinsichtlich der Methodik zur Erfassung des Leberfettgehaltes sowie der Interpretation der Ergebnisse, weshalb sie schwer direkt zu vergleichen sind. Beide spiegeln jedoch eine starke Abnahme des Leberfettgehaltes im Verlauf der Intervention wieder und erhärten so die Annahme, der Verlust von Leberfett spiele eine zentrale Rolle in der Diabetesremission.

Auffallend ist, dass 66% der Non-ResponderInnen eine Diabetesdauer >8 Jahre hatte und lediglich 33% eine Erkrankungshistorie <4 Jahre. Dies wohlbeachtet, obwohl die Gruppe „Diabetesdauer >8 Jahre“ mit 12 aus 39 (30,77%) in unserer Studienpopulation unterrepräsentiert war. Die OR für das Erreichen der Remission in der Gruppe „Diabetesdauer >8 Jahren“ war ebenfalls deutlich erniedrigt (0,16), wenn auch nicht signifikant (95 %-KI = 0,02-1,04; p = 0,06). Die fehlende Signifikanz ist hier vermutlich der kleinen Gruppengröße der „Diabetesdauer >8 Jahren“ geschuldet. Der Unterschied der beiden Gruppen wird noch deutlicher bei Betrachtung der strengeren Definition des Prädiabetes. Dass hier 100% der Gruppe mit Diabetesdauer >8 Jahren die Krankheitskriterien erfüllten und lediglich 15 aus 27 (55,56%) der Gruppe mit Diabetesdauer <4 Jahren, weist eindeutig auf ein mit steigender Erkrankungsdauer absinkendes Rekuperationsvermögen des Glucosstoffwechsels hin. Die OR für das Erreichen dieser strengeren Krankheitsdefinition war für die Gruppe mit Diabetesdauer >8 Jahren im Vergleich zur Gruppe mit Diabetesdauer <4 Jahren signifikant herabgesetzt (OR = 0,05; 95 %-KI = 0,00 – 0,92; p ≤ 0,05). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit weiteren Studien, in denen ResponderInnen eine durchschnittliche Diabetesdauer von 3,8 Jahre ± 1 Jahr hatten gegenüber 9,8 Jahre ± 1,6 Jahre bei Non-ResponderInnen [24]. In einer weiteren Arbeit erreichten 87% einer Gruppe mit Diabetesdauer <4 Jahren die Remission und lediglich 50% einer Gruppe mit Diabetesdauer >8 Jahren [23].

Die Ergebnisse der MTTs lassen Rückschlüsse auf die Mechanismen hinter der Diabetesremission zu. Im Gegensatz zu den häufig verwendeten intravenösen Clamps oder oralen Glucosetoleranztests zur Determination der Insulinsekretion liefert der MTT durch die oral eingenommene vollwertige Mahlzeit physiologische Untersuchungsbedingungen. So kann durch den MTT auch der Einfluss von Aminosäuren oder Inkretinhormonen auf die Insulinausschüttung berücksichtigt werden. Im Vergleich mit den anderen Testmöglichkeiten geht der MTT ebenfalls mit einer herabgesetzten Gefahr einer Stoffwechsellentgleisung einher [85].

Die Antwortkurven der Hormone Insulin und Glucagon auf Stimulation durch die zugeführte Mahlzeit spiegeln die deutlich verbesserte Stoffwechselsituation wieder. Zu allen Zeitpunkten lagen die Kurven der Visite V3 signifikant unter denen der Visite V1. Bei den Kurven des Hormons Glucagon ist dies sogar in ausgeprägterem Maße als beim Insulin zu beobachten (Abbildung 9). Beeinträchtigungen im Glucagonstoffwechsel können bei PatientInnen mit T2DM beobachtet werden und neue Therapeutika wie Dipeptidyl-Peptidase-4-Inhibitoren oder Glucagon-like peptide-1-Rezeptor Agonisten vermitteln ihre antidiabetische Wirkung zum Teil über Effekte auf den Glucagonspiegel [86]. Glucagon kommt folglich eine zentrale Rolle in der Pathogenese des T2DM zu und, wie unsere Ergebnisse vermuten lassen, auch in dessen Remission.

Unseres Wissens nach hat bislang keine Studie die Auswirkungen der hormonellen Änderung von Glucagon auf die Diabetesremission untersucht, da sich bisherige Arbeiten auf die Verbesserung der Insulinsekretion fokussierten und nicht mit dem MTT gearbeitet wurde [16, 28]. Der MTT hingegen eignet sich aufgrund der oralen Aufnahme einer komplexen Mahlzeit in besonderem Maße zur Detektion der Glucagonantwort [87]. Interessanterweise konnten wir bei einigen ResponderInnen eine stark verbesserte Antwort des Glucagons bei gleichzeitig unveränderter Insulinantwort beobachten. Andere ResponderInnen zeigten das gegenteilige Bild (Abbildung 11). Dies wirft die Frage auf, ob die Diabetesremission über zwei verschiedene Achsen vermittelt werden kann. Zum einen über einen verbesserten Glucagonstoffwechsel bei nahezu unveränderten Insulinstoffwechsel oder zum anderen über die gegensätzliche Kombination aus starken Veränderungen in der Insulinantwort gegenüber schwachen in der Antwort des Glucagons. Aktuell von uns durchgeführte Analysen deuten in diese Richtung und werden in Kürze in einer weiteren Arbeit detailliert beschrieben.

Durch die Berechnung von Stoffwechselindices aus den Ergebnissen des MTT konnten die Veränderungen in Insulinsensitivität bzw. -resistenz sichtbar gemacht werden. Der Index HOMA-IR wird typischerweise mit der hepatischen Insulinresistenz in Verbindung gebracht [88]. Die anderen errechneten Indices (Stumvoll, Matsuda, OGIS, PREDIM) dienen der Abbildung der peripheren Insulinsensitivität bzw. der im hyperinsulinämisch, euglykämischen Clamp als Goldstandard zur Messung der Insulinsensitivität erhobenen Glucose-Infusionsrate (M-value) [73-76, 89]. Um die Präzision der Berechnung zu erhöhen wurden verschiedene Indices ausgewählt und miteinander korreliert. Die hohe Korrelation legt nahe, dass die Indices trotz ihrer unterschiedlichen Berechnungen das Stoffwechselgeschehen adäquat und einheitlich abbilden.

Die signifikante Verbesserung der hepatischen Insulinresistenz, abgebildet durch den HOMA-IR, weist ein weiteres Mal auf die Schlüsselrolle der Leber in der Pathogenese des T2DM und der Diabetesremission hin und stützt die Idee der „Twin cycle Hypothesis“, dass durch eine Abnahme des Leberfettgehaltes die hepatische Insulinresistenz abnimmt [31]. Dies erscheint auch vor dem Hintergrund, dass die hepatische Insulinresistenz maßgeblich durch Akkumulation von Fettsäuren in Hepatozyten vermittelt wird, plausibel [35]. In Bezug auf die Diabetesremission konnte die Abnahme des Leberfettgehaltes durch konsekutive Abnahme des Exportes von Fettsäuren als Treiber der Rekuperation von β -Zellen während der Diabetesremission identifiziert werden [90]. Eine weitere Arbeit fand die Abnahme von Leber- und pankreatischen Fett sogar als notwendige Bedingung für das Erreichen der Diabetesremission [28].

Durch die Indices Stumvoll, Matsuda, OGIS und PREDIM konnten wir die signifikante Verbesserung der Ganzkörper-Insulinsensitivität im Rahmen der Diabetesremission zeigen. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien, in denen die verbesserte Insulinsekretion und periphere Insulinsensitivität bei Diabetesremission beschrieben wurden [16, 24].

Wie viele Krankheitsdefinitionen setzt auch die des T2DM einen harten Cutoff in ein Kontinuum zwischen guter und schlechter Kontrolle der Erkrankungsparameter. Die Ergebnisse zur Insulinsensitivität – wie im übrigen auch die der anderen klinischen Parameter – zeigen, wie

ebenso diejenigen von der Intervention profitieren, die der Kategorie der Non-ResponderInnen zugeordnet wurden und können als Argument für ein dynamischeres Verständnis von Krankheit und Genesung aufgefasst werden.

Blutdruckveränderungen

Arterielle Hypertonie ist eine mit T2DM assoziierte Erkrankung, die bei über zwei Dritteln der an T2DM erkrankten PatientInnen vorliegt [91]. PatientInnen mit T2DM und arterieller Hypertonie haben ein signifikant erhöhtes Risiko sowohl für mikrovaskuläre (diabetische Retinopathie oder Albuminurie) als auch makrovaskuläre (Myokardinfarkt oder Schlaganfall) Komplikationen im Vergleich zu PatientInnen mit T2DM ohne arterielle Hypertonie [91].

Eine gute Blutdruckkontrolle ist essenziell in der Therapie des T2DM, weshalb wir in unserer Studie die Blutdruckverläufe der ProbandInnen aufgezeichnet haben. Aufgrund der im Vorfeld berichteten Erfahrungen bezüglich Umsetzbarkeit und Sicherheit, wurden die StudienteilnehmerInnen dazu angehalten, ihre medikamentöse antihypertensive Therapie mit Beginn der Intervention abzusetzen, sofern eine solche bestand [27, 92].

Bemerkenswerterweise sank der Blutdruck bereits innerhalb der ersten Woche nach Beginn der Nahrungsrestriktion signifikant, wohingegen sich signifikante Gewichtsverluste erst zu einem späteren Zeitpunkt einstellten. Signifikante Gewichtsverluste ergaben sich im Vergleich der Zeitpunkte V1-V3 und V2-V3. Signifikante Blutdruckänderungen hingegen zwischen V1-V2 und V1-V3, nicht jedoch zwischen V2-V3. In diesem Zeitraum (V2-V3) jedoch, verloren die PatientInnen das meiste Gewicht (Abbildung 6). Diese Beobachtungen legen eine gewisse Entkopplung der Blutdruckänderung von der Änderung des Gewichtes nahe. Die Assoziation von Bluthochdruck und Adipositas konnte durch epidemiologische Untersuchungen im Rahmen der „Framingham Heart Study“ bereits früh belegt werden [93]. Über den Gesamtzeitraum betrachtet zeigt sich diese Assoziation auch in unserem Studienkollektiv. So verbesserten sich die ProbandInnen gemessen am systolischen Blutdruck über den Untersuchungszeitraum im Mittel von der Blutdruckkategorie „Hochnormal“ zu „Normal“, begleitet von einer Verbesserung der Adipositaskategorien von „Adipositas Grad II“ zu „Adipositas Grad I“ [94, 95].

Die bei uns aufgetretene Entkopplung des frühen Blutdruckabfalls vom Gewichtsverlust kann auch bei PatientInnen nach bariatrischer Chirurgie beobachtet werden, bei denen sich ebenfalls ein signifikanter Blutdruckabfall vor einem signifikanten Gewichtsverlust einstellt [96]. Es gibt für dieses Phänomen verschiedene Erklärungsansätze.

Ein möglicher Mechanismus besteht in einer den Blutfluss beeinträchtigenden Kompression zuführender renaler Gefäße durch ektope Fettablagerungen und somit Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mit konsekutiver Blutdrucksteigerung [97]. Die Mobilisierung dieser Fettdepots und damit Entblockade der Nieren würde sich potentiell nicht in einer signifikanten Änderung des Gesamtkörpergewichts widerspiegeln und könnte den frühen Blutdruckabfall erklären.

Eine weiterer, viel diskutierter Erklärungsansatz von adipositasinduzierter Hypertonie besteht in der Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch verschiedene Aspekte der Adipositaserkrankung. So führen beispielsweise Insulinresistenz, vermehrte Freisetzung von Insulin und Leptin sowie das bei Adipositas oft als Begleiterkrankung auftretende obstruktive Schlafapnoe-Syndrom zur Sympathikusaktivierung und somit Blutdrucksteigerung [96].

Von diesen Faktoren steht das hauptsächlich von Adipozyten sezernierte Hormon Leptin im Fokus aktueller Forschung, welches physiologischer Weise zentral eine herabgesetzte Nahrungsaufnahme und vermehrte Energiebereitstellung vermittelt. Über eine Sympathikusaktivierung nimmt es jedoch auch eine kritische Rolle in der Vermittlung von adipositasbedingter Hypertonie ein [98, 99]. Im Hinblick auf die durch akute Energierestriktion vermittelten Blutdruckeffekte könnte sich Leptin als Schlüsselfaktor erweisen. So zeigt das Hormon nach Energierestriktion

durch bariatrische Chirurgie einen weit über den Gewichtsverlust hinausgehenden, schnellen Abfall [96]. Ergebnisse aus Studien an bariatrisch operierten PatientInnen sind nicht mit unserem Studiendesign gleichzusetzen. Nichtsdestotrotz sind solche Studien aufgrund fehlender anderweitiger Daten wohl die der Unseren am nächsten kommend. Für die Zukunft wäre es äußerst interessant, die Leptindynamiken im Rahmen der konservativen Diabetesremission aufzuzeichnen.

Mögliche Vorhersagewerte

Die konservative Diabetesremission durch hypokalorische Formuladiät stellt ein relativ neues Therapiekonzept dar, welches sowohl von Betroffenen als auch von therapeutischer Seite aus teils kritisch betrachtet wird. Zwar konnte herausgearbeitet werden, dass die diätetische Interventionsphase für TeilnehmerInnen einfacher verläuft als ursprünglich erwartet, stieg der Bedarf an Unterstützung doch über das vorausbestehende Niveau an. Als motivierend für Teilnehmende stellte sich der schnelle Gewichtsverlust sowie die Verbesserung der Parameter des T2DM heraus [22, 100, 101]. Besondere Bedenken hatten TherapeutInnen bezüglich des Absetzens von antidiabetischer und antihypertensiver Medikation im Rahmen der Ernährungsintervention. Wurde die Intervention von den TherapeutInnen jedoch durchgeführt und von gut geschultem Personal begleitet, so konnten zu Beginn bestehende Bedenken ausgeräumt werden und wurde die Intervention von den TherapeutInnen nach Abschluss als äußerst dienlich für die Therapie des T2DM eingeschätzt [102].

In der Zusammenschau zeigt dies, dass vor Therapiebeginn bei allen Involvierten Bedenken bestehen. Obwohl diese ausgeräumt werden können und sich im Nachhinein oft als unbegründet herausstellen, ist die Ernährungsintervention zur Diabetesremission kein Selbstläufer. Sie erfordert im Gegenteil kontinuierliche Unterstützung auf beiden Seiten und ist für EmpfängerInnen mit einem hohen Maß an Disziplin und Durchhaltevermögen verbunden. Es wäre daher fatal, Menschen die Therapie anzugedeihen, die von ihr nicht profitieren oder sogar Schaden nehmen würden. Unsere Antwort auf diese Frage bestand in dem Versuch der Identifikation von Faktoren, die den Erfolg oder Misserfolg der Therapie bereits zu Beginn derselben diskriminieren könnten. Anhand der drei im Ergebnisteil vorgestellten multiplen linearen Modelle konnten wir Faktoren herausarbeiten, die einen Therapieerfolg wahrscheinlicher bzw. unwahrscheinlicher machen. Keiner dieser Faktoren erwies sich als geeignet, Grundlage für die Entscheidung gegen einen Therapieversuch mittels hypokalorischer Diät zu sein. Dies ist insbesondere unter Beachtung der Vorteile einer sich zwar verbesserten, jedoch weiterhin über dem Cutoff der Diabetesdefinition befindlichen Glucosekontrolle und der drastischen Verbesserungen sonstiger klinischer Parameter der StudienteilnehmerInnen der Fall.

Bezüglich der Kontrolle des Glucosestoffwechsels als wesentlicher Marker der Diabeteserkrankung (Abbildungen 12, 13) ergaben sich die Glucosewerte zu Therapiebeginn als wegweisend für die Werte nach Abschluss der Therapie. Dies ist nicht verwunderlich und zeigt, dass sich die Verbesserung der Stoffwechselsituation (Tabelle 5) durch die Intervention relativ zu den Ausgangswerten der Teilnehmenden einstellt.

Interessant ist die Betrachtung der Dauer seit Erkrankungsbeginn auf die Zielvariablen des Glucosestoffwechsels sowie der Insulinsensitivität (Abbildungen 12-14). So zeigte sich eine geringere Erkrankungsdauer als förderlich für das Erreichen einer besseren Glucosekontrolle, im Trend bezogen auf die AUC der Glucoseantwort auf den MTT und signifikant bezogen auf die Nüchtern-glucose zu V3. Nicht abbilden ließ sich dieser Zusammenhang in Bezug auf die Insulinsensitivität, dargestellt durch den PREDIM-Index. Diese Ergebnisse sind kohärent mit früheren Beobachtungen, die eine erhöhte Chance auf das Erreichen der Diabetesremission in einer Kohorte mit niedrigerer Diabetesdauer zeigten. Die Insulinsensitivität wurde in dieser Studie

nicht erhoben [23]. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich die Insulinsensitivität im Gegensatz zur Glucosehomöostase unabhängig von der Erkrankungsdauer verbessert und stellen somit ein weiteres Argument für den Nutzen der Ernährungsintervention auch für Menschen mit bereits länger bestehender Diabeteserkrankung dar.

Eine frühere Arbeit konnte den Gewichtsverlust unabhängig vom BMI als stärksten Prädiktor für die Diabetesremission nach 12 Monaten identifizieren [30]. Zwar liegt der Endpunkt in unseren Analysen bereits nach 3 Monaten, jedoch finden wir die Ergebnisse trotz der unterschiedlich gewählten Zeitpunkte in unseren Analysen bestätigt. So stellte sich der Gewichtsverlust nach einer Woche als signifikanter Prädiktor für das Erreichen einer niedrigeren Nüchtern-glucose und einer verbesserten Insulinsensitivität heraus (Abbildung 12 und 12). Bezogen auf die AUC der Glucoseantwort im MTT war der Einfluss des Gewichtsverlustes nach einer Woche zwar nicht signifikant, ein Trend in die Richtung einer verbesserten Kontrolle bei vermehrter Gewichtsabnahme war dennoch klar erkennbar (Abbildung 13). Der BMI zu Therapiebeginn erwies sich im Hinblick auf die Verbesserung des Glucosestoffwechsels als irrelevant (Abbildung 12 und 11). Im Gegensatz dazu hatte der BMI zu Therapiebeginn einen leicht negativen Effekt auf die Verbesserung der Insulinsensitivität (Abbildung 14), was möglicherweise durch die potentiell stärker vorliegende und durch Lipotoxizität vermittelte Insulinresistenz bei erhöhten BMI zu erklären ist [35].

Ebenfalls mit vorigen Untersuchungen im Einklang stehend ist unsere Erkenntnis, dass das Geschlecht der StudienteilnehmerInnen keinen Effekt auf die Verbesserung des Glucosestoffwechsels oder die Insulinsensitivität hat (Abbildung 12-12) [30].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir keine Faktoren ermitteln konnten, die einem Therapieversuch mittels Ernährungsintervention generell entgegenstünden. Dies ist als positives Zeichen für Menschen mit durch Adipositas bedingten T2DM zu werten, da die Therapie nach unseren Analysen für fast alle dieser Menschen – trotz ihrer individuellen Unterschiede - infrage kommt. Einen Ausblick auf mögliche durch die Therapie erreichbare Glucosewerte können die Ausgangswerte des jeweiligen Parameters geben. Stärkere Verbesserungen im Glucosestoffwechsel scheinen bei kürzerer Erkrankungsdauer wahrscheinlicher, wobei dagegenzuhalten ist, dass auch schwächere Verbesserungen als positiv zu werten sind. Bereits eine Woche nach Therapiebeginn kann der erreichte Gewichtsverlust Hinweise dazu geben, wie stark sich Glucosestoffwechsel und Insulinsensitivität nach drei Monaten verbessern werden.

Stimulationsassays

Durch die Bestimmung von Cytokin- und Chemokinkonzentrationen nach in vitro Stimulation von Zellen des angeborenen Immunsystems im Vollblut können Rückschlüsse auf die Verantwortlichkeit dieser Zellen geschlossen werden. Nicht zuletzt um Gewebeschädigungen zu vermeiden, ist das Antwortverhalten von Zellen des angeborenen Immunsystems auf einen potentiell pathogenen Stimulus nicht statisch, sondern unterliegt einer dynamischen Anpassung an die im jeweiligen Gewebe vorherrschenden Bedingungen. Diese Anpassung ist streng reguliert, beispielsweise über die Hemmung oder Aktivierung von Bestandteilen der Rezeptorkaskaden von TLRs, welche durch Cytokine oder TLR-Liganden im Sinne eines negativen Feedbacks induziert werden [103]. Eine andere Möglichkeit der Regulation ist die epigenetische Modifikation von Promotor- und Enhancerregionen für Zielgene der TLRs, wodurch diese der Transkription zugänglicher oder weniger zugänglich werden und TLR-Zielgene wie proinflammatorische Cytokine stärker oder weniger stark transkribiert und folglich sezerniert werden [104, 105]. Solche epigenetischen Modifikationen bilden eine der Grundlagen des bereits erwähnten Phänomens „Trained Immunity“ [64].

Wir haben Zellen des angeborenen Immunsystems mit diversen TLR-Liganden in vitro stimuliert und die Konzentrationen verschiedener Cyto- und Chemokine nach Stimulation gemessen. Die Zellen wurden umgehend nach Blutentnahme mit der entsprechenden Konzentration des jeweiligen Stimulus bei 37 °C für 6 Stunden inkubiert. Der Versuchsaufbau ist darauf optimiert, möglichst wenige Arbeitsschritte zu beinhalten, um mögliche Störfaktoren zu minimieren. Dies hat jedoch zum Nachteil, dass es nicht möglich ist zu differenzieren, welcher Immunzellpopulation des angeborenen Immunsystems die Cytokinänderungen im Serum zuzuschreiben sind. Während wir uns in anderen Analysen - wie der RNA-Sequenzierung - auf die Population der Monozyten fokussiert haben, muss bei der Interpretation der Ergebnisse der Stimulationsassays der Einfluss anderer Zelltypen mit beachtet werden. Hier sind insbesondere Granulozyten zu nennen, welche 35–80 % der Gesamtleukozytenpopulation im Blut ausmachen [38].

Global betrachtet ließen sich in unseren Analysen die stärksten Cytokinantworten nach Stimulation mit LPS und R848 beobachten. Beide Stimuli sind als starke Induktoren des angeborenen Immunsystems bekannt. Sie vermitteln ihre Effekte über den membranständigen TLR-4 (LPS) oder die intrazellulären TLR-7/8 (R848) [106, 107]. Der Stimulus R837 vermittelt seine Effekte über TLR-7, nicht jedoch TLR-8 [108]. Dies könnte ein Grund für die deutlich schwächer ausfallende Änderung der Cytokinkonzentration (Abbildung 15b) von R837 im Vergleich zu R848 sein.

Die Cytokinkonzentrationen nach Stimulation mit PGN und cAMP waren im Vergleich zur Negativkontrolle unverändert. In einer Studie fielen die Cytokinkonzentrationen nach Stimulation von Monozyten mit einem TLR-2 Induktor, wie PGN es ist, im direkten Vergleich geringer aus als die Cytokinkonzentrationen nach Stimulation der TLR-4, -7 und -8 [60, 109]. Dies könnte die nach Stimulation mit PGN ausgebliebenen Änderungen der Cytokinkonzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle erklären und ähnlich auch für den Stimulus cAMP zutreffen, welcher seine Effekte über den STING-Rezeptor vermittelt [110].

Das hauptsächlich durch Monozyten und Makrophagen sekretierte IL-1 β steht in enger Verbindung mit der Entgleisung des Glucosestoffwechsels beim T2DM [52, 53, 66-68]. Für die Sekretion von IL-1 β ist ein zweischrittiger Prozess notwendig. Dieser besteht erstens aus der Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Nuclear Factor Kappa B“ (NF- κ B) und zweitens aus der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Beispielsweise kann NF- κ B durch einen TLR-Agonisten aktiviert werden. NF- κ B bewirkt unter anderem die Expression der Gene des NLRP3-Inflammasoms und des Propeptids von IL-1 β (Pro-IL-1 β), womit die Grundlage für die spätere Aktivierung gelegt ist. Dieser Schritt wird „Priming“ genannt. Nach dem Priming kann das NLRP3-Inflammasom über verschiedene Wege aktiviert werden (Zweiter Schritt: „Trigger-Stimulus“). Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mündet in der Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-1 über das Adaptorprotein ASC. Aktive Caspase-1 kann dann pro-IL-1 β und pro-IL-18 in ihre biologisch aktive Formen spalten [111]. Beispiele für solche Trigger im Kontext metabolischer Erkrankungen sind Palmitinsäure, Ceramide oder Glucose [62, 65-67]. Fasten hingegen führte bei adipösen ProbandInnen mit T2DM zu einer verminderten Expression des NLRP3-Inflammasoms und IL-1 β [68]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das NLRP3-Inflammasom durch den während des Fastens freigesetzten Ketonkörper β -Hydroxybutyrat inhibiert wird [69]. Wir haben deshalb ein besonderes Augenmerk auf die Cytokine IL-1 β und IL-18 in unseren Stimulationsassays gelegt. Nach Stimulation mit den sich in unserem Kontext als relevant erweisenden Stimuli (LPS, R848, R837) zeigte sich IL-18 zu allen drei Zeitpunkten unverändert sowohl in der absoluten Konzentration wie in der zur Negativkontrolle relativen Konzentrationsänderung. Die Konzentrationsänderungen im Vergleich zur Negativkontrolle von IL-1 β hingegen zeigten sich nach Stimulation mit LPS und R848 zu allen drei Zeitpunkten

signifikant erhöht (Abbildung 15, Tabelle 6). Dieser Unterschied der beiden Cytokine könnte dadurch bedingt sein, dass zwar die Propeptide von IL-1 β und IL-18 über die gleiche Endstrecke des NLRP3-Inflammasoms aktiviert werden, Pro-IL-1 β jedoch im Gegensatz zu Pro-IL-18 ebenfalls über den „Priming-Stimulus“ für das NLRP3-Inflammasom transkribiert wird und somit bereits früher mit dem NLRP3-Inflammasom synchronisiert ist [111].

Die Dynamik der Konzentrationsänderungen von IL-1 β über die drei Zeitpunkte V1-V3 nach Stimulation mit LPS und R848 war nicht signifikant unterschiedlich, jedoch zeigte sich jeweils der Zeitpunkt V2 erhöht gegenüber V1 und V3 (Abbildung 15b). Diese Ergebnisse stehen früheren Beobachtungen entgegen, die eine Konzentrationsabnahme von IL-1 β durch Fasten beschrieben [68, 69]. Nur eine der beiden Studien wurde an adipösen Menschen mit T2DM durchgeführt, die eine Diätintervention erhielten [68]. Diese bestand in einer nicht näher beschriebene Kalorienrestriktion + Aktivitätssteigerung über den Zeitraum von einem Jahr [68]. Die Ergebnisse der zweiten Studie stützen sich auf die Beobachtung isolierter humaner Monozyten, welche *ex-vivo* mit β -Hydroxybutyrat inkubiert und so behandelt eine verringerte IL-1 β Sekretion nach Stimulation mit LPS aufwiesen [69]. Mutmaßlich sind diese Unterschiede im Studienaufbau an den von unseren Ergebnissen abweichenden Resultaten beteiligt.

Für die Dynamik der Cytokinänderungen von IL-1 β (sowie auch MIP-1 β) im Hinblick auf den Messzeitpunkt V2 gibt es zwei Erklärungsansätze, die vermutlich beide einen Teil der Antwort bilden. Erstens ist die akute Ernährungsumstellung für die StudienteilnehmerInnen nicht nur mit metabolischen, sondern auch mit psychischem Stress verbunden, welcher sich auf die Responsibilität von Immunzellen auswirken kann. Dieser durch Adaptationsprozesse an die neue Diät bedingte Streß ist aufgrund der zeitlichen Assoziation im Zeitpunkt V2 stark abgebildet und hat einen mutmaßlich geringeren Einfluss auf den Messzeitpunkt V3. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass *ex-vivo* mit Noradrenalin behandelte Monozyten 6 Tage nach der Exposition eine verstärkte Cytokinantwort auf Stimulation mit LPS aufwiesen [112]. Noradrenalin ist ein wichtiger Transmitter des sympathischen Nervensystems, welches vom Organismus unter anderem für die Vermittlung von Antworten auf Stressoren genutzt wird [113]. Diese Ergebnisse sind sicherlich nicht eins zu eins auf die *in situ* Situation während der akuten Ernährungsumstellung zu übertragen, sie zeigen jedoch die klare Verbindung von akutem psychischen Stress und Zellen des angeborenen Immunsystems.

Ein zweiter Erklärungsansatz liegt in freien Fettsäuren, welche im Rahmen der katabolen Stoffwechselsituation aus dem Fettgewebe mobilisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass freie Fettsäuren über das Adaptorprotein „FetA“ direkt TLR-4 stimulieren können [114, 115]. Auch das NLRP3-Inflammasom kann durch freie Fettsäuren, insbesondere Palmitinsäure, aktiviert werden [62, 116]. Durch die Stoffwechselumstellung ist die Konzentration freier Fettsäuren innerhalb der ersten Interventionswoche höher als zum Zeitpunkt V3 zum Ende der Intervention. Dies wird gestützt durch die vergleichbare Dynamik der Enzyme ALT und AST, welche ebenfalls zum Zeitpunkt V2 erhöhte Werte aufweisen gefolgt von unter das Ausgangsniveau fallenden Werten zu V3 (Abbildung 7). Mutmaßlich reflektiert dies den Leberzellstreß bei der Mobilisierung hepatischer Fettspeicher sowie der allgemeinen Umstellung des Hauptenergieträgers von Glucose (Glykolyse) zu Fettsäuren (β -Oxidation).

MIP-1 β ist ein mit Monozyten- und Makrophagenmigration assoziiertes Chemokin der Familie der CC-Chemokine, welches von Monozyten und Granulozyten sezerniert wird und weitere Immunzellen anzieht [38, 117]. Die Konzentration des Chemokins MIP-1 β war nach Stimulation mit LPS, R848 und R837 zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht und folgte der schon beim IL-1 β beschriebenen Dynamik mit einer maximalen Konzentrationsänderung zum Zeitpunkt V2. MIP-1 β wurde unseres Wissens nach bisher nicht im Kontext von T2DM oder Fasten untersucht. Vermutlich spiegeln die Änderungen von MIP-1 β eine

verstärkte Alarmbereitschaft des angeborenen Immunsystems wieder, um im Falle der Detektion von Pathogenen schnell weitere Monozyten und Makrophagen rekrutieren zu können. Dies scheint auch vor dem Hintergrund der starken Stoffwechselveränderungen und der diskutierten Freisetzung freier Fettsäuren plausibel. In weiteren an die Studie angelehnten Versuchen sollte der Einfluss freier Fettsäuren auf die Freisetzung von Chemokinen wie MIP-1 β genauer untersucht werden.

Die Konzentrationsänderungen im Vergleich zur Negativkontrolle des Cytokins TNF- α nach Stimulation mit LPS fielen mit Fortschreiten der Intervention geringer aus. Auch nach Stimulation mit R848 lag die Konzentrationsänderung von TNF- α zu V2 und V3 unter der von V1 (Abbildung 15b). Diese Ergebnisse sind kongruent mit den Ergebnissen einer Studie, die die Korrelation von TNF- α im Serum mit dem BMI und HOMA-IR zeigte [118]. BMI und HOMA-IR zeigen in unseren Analysen eine analoge Dynamik den genannten Konzentrationsänderungen von TNF- α (Abbildung 7 und 10).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von uns untersuchten Zellen des angeborenen Immunsystems über die drei Messzeitpunkte hinweg zwar Veränderungen in ihrer Responsivität zeigten, diese sich jedoch im Zeitverlauf nicht als signifikant erwiesen. Die Veränderungen sind deshalb zu vernachlässigen, was insbesondere im Hinblick auf die sonstigen massiven Stoffwechselveränderungen während der Ernährungsintervention bemerkenswert ist. Wie die gemessenen Cytokinkonzentrationen im Hinblick auf eine gesunde Vergleichspopulation einzuordnen sind, lässt sich aufgrund der im Studiendesign nicht vorgesehenen Vergleichsgruppe momentan nicht beantworten. In einer nächsten Studie wäre es interessant, eine solche Vergleichsgruppe heranzuziehen.

Des Weiteren ist zu sagen, dass die Versuchsreihen mit den Stimuli LPS, R848 und R837 gute Ergebnisse zeigten, wohingegen sich die Reihen mit den Stimuli PGN und cAMP nicht von der Negativkontrolle unterschieden. Unseren Ergebnissen zufolge könnte in Zukunft auf die Verwendung der beiden letzteren Stimuli verzichtet werden.

Immunzellphänotypisierung

Monozyten und Makrophagen sind Schlüsselzellen in der Pathogenese des T2DM und seiner Begleiterkrankungen wie der Arteriosklerose [119]. Das Blut von PatientInnen mit T2DM enthält mehr Monozyten und insbesondere mehr proinflammatorische, alternativ aktivierte Monozyten (CD14⁻ CD16⁺) als das Blut gesunder Kontrollen [120, 121]. Interessanterweise zeigten sich alternativ aktivierte Monozyten (CD14⁻ CD16⁺) besonders empfänglich für Veränderungen in Ernährungsgewohnheiten. So fiel der relative Anteil dieser Subpopulation signifikant im Blut gesunder ProbandInnen in Antwort auf eine 19-stündige Fastenperiode [122]. In einer Mausstudie war sowohl die Anzahl an Monozyten im Blut, als auch die Expression des proinflammatorischen Aktivierungsmarkers CD86 größer in Mäusen, die eine hochkalorische und fettreiche Ernährung erhielten im Vergleich zu Artgenossen, welche auf normaler Diät gehalten wurden [60].

Wir wollten deshalb wissen, wie sich Monozyten, deren Subpopulationen und Aktivierungsgrade im Rahmen der Ernährungsintervention zur Diabetesremission verhalten. Um einen globalen Blick auf die Veränderungen von Zellen des Immunsystems während der Intervention zu erhalten, haben wir den zeitlichen Verlauf der großen Immunzellpopulationen, T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten ebenfalls aufgezeichnet. Wir haben zu diesem Zweck zwei FACS-Panels (Lineage- und Monozytenpanel; Siehe Methodenteil) aufgesetzt, mit denen wir die Immunzellen phänotypisieren und anhand der Expression von Aktivierungsmarkern ihren Aktivierungsgrad bestimmen konnten.

Entgegen der beschriebenen Erwartungen, zeigte keine der von uns untersuchten Immunzellpopulationen einen Unterschied im relativen Anteil der Gesamtleukozyten über die drei Zeitpunkte V1-V3 (Abbildungen 15-19). Auch die relative Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und HLA-DR, -DP, -DQ auf Monozyten zeigte keine Veränderung über die Zeit (Abbildungen 20, 21). Betrachtet in absoluten Zahlen sank die Menge der Leukozyten im Blut signifikant vom Zeitpunkt V1 zum Zeitpunkt V3 (Abbildung 6). Diese Veränderung hatte in unserer Studie offenbar keinen Einfluss auf die relative Zusammensetzung der einzelnen Immunzellpopulationen und ihres Aktivierungsgrades im Blut.

Bemerkenswerterweise machte die Population der intermediären Monozyten in unseren Untersuchungen einen im Zeitverlauf konstanten Anteil von über 40% der Gesamtmonozyten aus, entgegen den erwarteten 10% für diese Population (Abbildung 20) [47]. Die biologische Rolle intermediärer Monozyten ist Gegenstand aktueller Debatten, vermutlich aber bilden sie zum Teil diejenigen Monozyten ab, die sich im Prozess der Differenzierung von patrouillierenden, klassisch aktivierten hin zu proinflammatorischen, alternativ aktivierten Monozyten in einem Übergangsstadium befinden [123]. Diesem Konzept zufolge hielten die Monozyten in unseren Untersuchungen ein stärker proinflammatorisches Profil inne, als es durch die alleinige Betrachtung der maximal polarisierten alternativen und klassischen Monozyten suggeriert wird. Die Betrachtung einer gesunden Kontrollgruppe wäre diesbezüglich interessant.

Die starke Repräsentation intermediärer Monozyten könnte jedoch auch einen Artefakt widerspiegeln, bedingt durch die Arbeit an per Dichtegradient isolierten PBMCs (siehe Methodenteil). So wurde gezeigt, dass sich bestimmte Immunzellpopulationen in FACS-Untersuchungen unterschiedlich darstellen, je nachdem ob die Analysen an Vollblut oder aufgereinigten PBMCs stattfanden [124]. Die Methode der PBMC-Aufbereitung ist jedoch gut etabliert und wird weiträumig für die FACS-Untersuchungen von Immunzellen angewandt, was diese Theorie weniger wahrscheinlich macht.

RNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von RNA aus isolierten Monozyten der StudienteilnehmerInnen mittels „3'mRNA-Seq“ erlaubte unvoreingenommene Analysen der globalen Genexpressionsveränderungen im Zuge der Diabetesremission. Im Gegensatz zur gezielten Untersuchung spezifischer, bereits im Vorfeld definierter Gene konnten wir uns durch diese Methode dem Datensatz explorativ nähern. Wir konnten unsere Analyse auf diejenigen Gene fokussieren, die aufgrund ihrer veränderten Expression auffielen und so den statistischen „selection bias“ ausräumen.

Mit Hilfe der RNA-Analysen konnten wir die Frage beantworten, ob sich Veränderungen auf funktioneller Ebene von Zellen des angeborenen Immunsystems (Stimulationsassays) auch auf Ebene der Genexpression widerspiegeln, was auf eine tiefere Umprogrammierung dieser Zellen hindeuten würde. Eine Studie fand die Genexpression der Chemokinrezeptoren Chemokin-C-C-motif-Rezeptor (CCR)-1, -2, -3 sowie der TLR-2 und -4 in Monozyten adipöser PatientInnen mit T2DM nach Durchführung einer zweiwöchigen, hypokalorischen Diät (600 kcal/Tag) signifikant herabreguliert [125]. Dem entgegenstehend konnte eine andere Studie keine relevanten Unterschiede in der Genexpression von Monozyten im Blut adipöser PatientInnen nach bariatrischer Chirurgie über einen Zeitverlauf von 2 Jahren nach der Operation finden. Starke Veränderungen der Genexpression in Richtung einer reduzierten Inflammation wurden in dieser Studie jedoch in Adipozyten aus subkutanen Fettgewebe gefunden [126]. Diese Ergebnisse deuten auf das Fettgewebe als zentralen Ort der metabolischen Inflammation und stehen im Einklang mit unserer Erkenntnis, kein sinnvolles Clustering in der Genexpression von

Monozyten des peripheren Blutes über den Zeitverlauf der Ernährungsintervention vornehmen zu können (Abbildung 24).

Als signifikant und relevant verändert zeigten sich in unserer Studie die beiden Gene „LTF“ und „RMD1“. Die Expression dieser beiden Gene war herabreguliert und wurde im Vergleich der Zeitpunkte V1 und V2 beobachtet. Für „LTF“ war die Herabregulierung zwischen den Zeitpunkten V1 und V3 ebenfalls signifikant und relevant (Abbildung 23 A und C).

„LTF“ kodiert für das von mononukleären Zellen sezernierte 80 kDA schwere Glycoprotein Lactoferrin, welches freies Eisen bindet und antiinflammatorische sowie immunmodulatorische Funktionen inneht [127]. „RMD1“ ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, dessen Genprodukt vermutlich an der Verbindung von Mikrotubuli und Chromosomen während der Mitose beteiligt ist [128].

Das Gen „LTF“, erwies sich in unseren Analysen als im Hinblick der metabolischen Inflammation interessanter Kandidat. Lactoferrin werden immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben, welche eine proinflammatorische wie antiinflammatorische Komponente beinhalten. So konnte gezeigt werden, dass Lactoferrin über eine Kohlenhydratkette TLR-4 und so den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann, was zu einer der LPS-Stimulation ähnlichen Immunantwort führt [129]. Gleichzeitig ist Lactoferrin dazu in der Lage, LPS-Response Cytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 herabzuregulieren, mutmaßlich über eine Polypeptidstruktur des Moleküls [129, 130]. Der Wegfall dieser immunsupprimierenden Komponente von Lactoferrin könnte den von uns in mehreren Stimulationsassays beobachteten Anstieg in der Änderung der Cytokinsekretion zum Zeitpunkt V2 erklären (beispielsweise IL-1 β nach Stimulation mit LPS; Abbildung 15b). Um dies mit größerer Sicherheit sagen zu können, müsste jedoch die Konzentration von Lactoferrin im Serum bestimmt werden, welche nicht notwendigerweise mit der Genexpression in Monozyten übereinstimmt.

Generell konnten wir kaum Veränderungen in der Genexpression von peripheren Monozyten während der Diabetesremission beobachten. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen unserer funktionellen Stimulationsassays und der Immunzellphänotypisierung (FACS-Messungen) und es entsteht der Eindruck, tiefgreifende immunologische Veränderungen seien an anderer Stelle als dem peripheren Blut zu suchen. Als aussichtsreicher Kandidat hierfür präsentiert sich das subkutane Fettgewebe mit seinen gewebständigen Makrophagen. Dieses Gewebe wäre per Biopsie einfacher zu erreichen als beispielsweise Pankreasgewebe und ist durch die Mobilisierung von Fettsäuren, endokriner Eigenschaften von Adipozyten und den bei Adipositas proinflammatorisch differenzierten geweberesidenten Makrophagen ein zentraler Schauplatz der Orchestrierung von sowohl Gewichtsverlust als auch lokaler Inflammation [42, 56].

Limitationen

Die FAIR-Studie fand unter der Primärversorgung ähnlichen Bedingungen statt. Bei Bedarf konnten die ProbandInnen die Studienambulanz unabhängig der Studienvisten besuchen und über regelmäßige Telefonanrufe wurde sichergestellt, dass der Kontakt zu den TeilnehmerInnen nicht abbrach. Möglicherweise bestehende Probleme waren so direkt adressierbar. Nichtsdestotrotz können wir durch das Studiendesign nicht mit letzter Gewissheit garantieren, dass sich die StudienteilnehmerInnen zu jeder Zeit an die Ernährungsvorgaben gehalten haben. Unsere Ergebnisse beschreiben die drastischen Veränderungen von Stoffwechsel und Anthropometrie der StudienteilnehmerInnen, was auf eine gute Therapieadhärenz von Seiten der EmpfängerInnen hindeutet. Dass unsere Ergebnisse trotz der nicht auszuschließenden Protokollverletzungen seitens der StudienteilnehmerInnen einen eindeutigen Nutzen für InterventionsempfängerInnen darlegen ist als starker Hinweis dafür zu deuten, dass die Diabetesremission durch

hypokalorische Ernährungsintervention eine außerhalb des Studiensettings durchführbare Therapieoption darstellt.

Eine gesunde Kontrollgruppe hätte den Analysen zu einer größeren Trennschärfe verholfen, weshalb das Fehlen dieser eine Limitation der Arbeit darstellt. In der Studienplanung wurde sich aufgrund der in der Literatur beschriebenen, starken Veränderungen insbesondere der inflammatorischen Parameter durch Fasten bewusst gegen eine gesunde Kontrollgruppe entschieden. Die Interventionsgruppe konnte so größer gefasst werden, wodurch die statistischen Berechnungen über den Zeitverlauf belastbarer wurden. Viele der durch Ernährungsgewohnheiten getriebenen immunologischen Prozesse sind bislang primär im Tiermodell beschrieben und zeigen dort starke Veränderungen. Vermutlich ist es auch dem Transfer vom Tiermodell zur klinischen Studie geschuldet, dass einige Veränderungen schwächer als erwartet ausfielen und mutmaßlich durch den Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe besser einzuordnen gewesen wären.

Eine weitere Limitation stellt die vergleichsweise große Heterogenität der Studienpopulation und das nicht gänzliche Erfüllen der Matching-Strategie dar (Abbildung 5, Tabelle 4). So konnten keine ProbandInnen jünger 50 Jahre mit einem BMI $<30 \text{ kg/m}^2$ bei vorliegenden T2DM rekrutiert werden. Vermutlich ist dies zum Teil dadurch zu erklären, dass bei Personen mit dieser Alters- und BMI-Konstellation häufig ein schwerer Insulinmangel-Diabetes (severe insulin-deficient diabetes (SID)) nach Ahlqvist et al. vorliegt [131]. PatientInnen mit SID bedürfen oft früh im Krankheitsverlauf einer Insulintherapie und wären somit ab diesem Zeitpunkt per Ausschlusskriterium nicht für die Studienteilnahme qualifiziert.

In unserer Studie leicht überrepräsentiert war die Gruppe der Männer ≥ 50 Jahren mit einem BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$. Die Studienergebnisse beschreiben daher die Verhältnisse innerhalb dieser Gruppe besonders gut. Um den Unterschied zwischen den Erkrankungsdauern >8 Jahren und <4 Jahren besser herausarbeiten zu können, wäre eine gleichere Verteilung über die beiden Gruppen hilfreich gewesen.

Etwaige Messfehler stellen eine Limitation der vorliegenden Arbeit dar. Um diese möglichst zu verhindern wurden alle Schritte der Datenerhebung per Protokoll standardisiert und die Daten nach Erhebung auf ihre Plausibilität geprüft. Des Weiteren wurde die Primärdatenbank nach Dateneingabe und -überprüfung gesperrt und die Analysen ausschließlich an entsprechenden Kopien der Primärdatenbank durchgeführt.

Naturgemäß kann dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Fehler bei einzelnen Messungen oder Übertragungen unterliefen und diese trotz Kontrollen Eingang in die Analysen fanden. Darüber hinaus müssen verfahrensbedingte Messvarianzen sowie physiologische Schwankungen einzelner Parameter bei der Dateninterpretation berücksichtigt werden. Alle Ergebnisse sind aus diesem Grund mit von der Genauigkeit des jeweiligen Messverfahrens abhängigen Standardabweichung angegeben. Um den Einfluss tageszeitlicher Schwankungen von Parametern wie Stoffwechselformonen oder dem Gewicht zu minimieren, begannen die Visiten stets zwischen 7:00-9:00 Uhr morgens unter Beibehaltung einer definierten Reihenfolge der einzelnen Messungen. Möglicherweise ist es dennoch zu Abweichungen einzelner Parametern durch weitere Einflussfaktoren gekommen, beispielsweise ist eine Verzerrung des in dieser Arbeit zentralen Parameters der Nüchtern-glucose durch individuellen Stress der StudienteilnehmerInnen denkbar [132].

Durch die von uns eingesetzten Messmethoden konnte die in der Pathophysiologie der Diabetesremission bedeutsame Abnahme der Leberverfettung nur anhand von Surrogatparametern eingeschätzt werden, was die Aussagekraft dieser Veränderungen beschränkt. Über den Verlust hepatischen Fettes bei Gewichtsabnahmen in Größenordnungen, wie sie in unserem Kollektiv zu beobachten waren, besteht jedoch Konsens [133-135]. Dies

spiegelt sich auch in den von uns erhobenen Surrogatparametern des Leberfettgehaltes wieder. Wir haben deshalb auf eine genaue Bestimmung des Leberfettgehaltes mittels Magnetresonanzspektroskopie verzichtet. Belastbarer wären Ergebnisse dieser Messmethode jedoch zweifelsohne.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich im Verlauf der Studie einige Herausforderungen herausstellen haben, denen jedoch im überwiegenden Teil adäquat begegnet werden konnte. Durch detaillierte Ausarbeitung und strikte Einhaltung des Studienprotokolls konnte ein hoher Qualitätsstandard gewährleistet werden. Messvarianzen wurden bei der Datenanalyse anerkannt und fanden Einfluss in die Interpretation der Ergebnisse. Um Fragen zu Veränderungen bestimmter immunologischer Parameter im Vergleich zu gesunden Kontrollen besser einordnen zu können bedarf es einer Folgestudie unter Hinzuziehung einer entsprechenden Gruppe.

Als besonders wertvoll bei der Durchführung der Studie hat sich das interdisziplinäre Arbeiten durch die Zusammenführung der Kompetenzen der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, des Institutes für angeborene Immunität der Universität Bonn und der „Core Unit for Bioinformatics Data Analysis“ der Universität Bonn hervorgetan.

Konklusion und offene Fragen

Die Zusammenschau unserer Ergebnisse zeigt die Durchführbarkeit, Sicherheit und Effektivität der Diabetesremission durch hypokalorische Ernährungsintervention mittels Formuladiät. Wir konnten zeigen, dass es sich hierbei um ein realistisches Konzept zur kurativen Therapie des durch Adipositas bedingten T2DM handelt. Neben vorteilhaften Veränderungen von Parametern der Diabeteserkrankung rief die Intervention starke Veränderungen weiterer Parameter wie dem Blutdruck, dem Serumlipidprofil oder Entzündungsparametern wie der Leukozytenzahl hervor.

Unsere primäre Hypothese, die Diabetesremission sei durch hypokalorische Ernährungsintervention möglich und abhängig von der Bestehensdauer der Erkrankung, bestätigte sich. 85 % der StudienteilnehmerInnen erreichten die Diabetesremission nach Abschluss der Ernährungsintervention. Der Anteil der Gruppe StudienteilnehmerInnen mit Erkrankungsdauer >8 Jahren an den Non-Responder betrug 66 %, obwohl diese Gruppe in unserem Kollektiv nur etwas über 30 % der Gesamtpopulation ausmachte. Die OR für das Erreichen der Diabetesremission für Teilnehmende mit Diabetesdauer >8 Jahren war erniedrigt, jedoch nicht signifikant unter alleiniger Heranziehung der Diabetesdefinition. Signifikant wurde sie bei Betrachtung der strengeren Definition des Prädiabetes. Dies in Zusammenschau mit dem signifikant negativen Regressionskoeffizienten, welcher der Diabetesdauer <4 Jahre in multiplen linearen Regressionsanalysen zur Glucoseantwort auf Mahlzeitenstimulation zugewiesen wurde (Abbildung 13), unterstreicht den Einfluss der Erkrankungsdauer auf das Rekuperationsvermögen des Glucosestoffwechsels.

Unsere sekundären Hypothesen bestätigten sich zum Teil. So erwies sich die Hypothese, dass den Erfolg der Diabetesremission voraussagende Faktoren bereits zu Beginn der Ernährungsintervention erhebbare sind, als korrekt. Dies jedoch mit der Einschränkung, dass kein Faktor identifiziert werden konnte, der stark genug wäre, eine Entscheidung gegen den Therapieversuch des durch Adipositas bedingten T2DM zu rechtfertigen. Als wichtige Parameter zur Einschätzung des Therapieerfolges erwiesen sich die Baseline-Werte der Nüchtern-glucose, die Erkrankungsdauer, sowie der Gewichtsverlust innerhalb der ersten Interventionswoche.

Die Hypothese, dass sich die Stoffwechseleränderungen während der Diabetesremission auf Ebene der Funktionalität, des Phänotyps sowie der Genexpression von Zellen des angeborenen Immunsystems widerspiegeln, bestätigte sich nur bedingt. So blieb die relative Anzahl der untersuchten Immunzellpopulationen über die Zeit unverändert. Die in der Responsivität von Zellen des angeborenen Immunsystems auf Stimulation mit bestimmten TLR-Stimuli detektierten Veränderungen erwiesen sich als nicht signifikant. Auf Ebene der Genexpression konnte das Gen „LTF“ als signifikant herabreguliert im Vergleich der Zeitpunkte V1-V2 und V1-V3 identifiziert werden. Ein Clustering relevant veränderter Gene konnte nicht vorgenommen werden und somit kein Genexpressionsprofil in Monozyten etabliert werden, welches die Stoffwechseleränderungen während der Diabetesremission widerspiegeln würde.

Hinweise für Veränderungen in Monozyten und Makrophagen im Rahmen von Adipositas, T2DM und Fasten sind bereits detailliert dokumentiert (siehe Abschnitt Immunologische Aspekte der Pathogenese des T2DM), weshalb die Anpassung dieses Zelltyps im Rahmen der Diabetesremission unserer Ergebnisse zum Trotz weiterhin wahrscheinlich erscheint. Da wir keine Veränderungen in zirkulierenden Monozyten finden konnten, wäre es aussichtsreich, im Gewebe ansässige Makrophagen nach unserem Protokoll zu untersuchen und somit den Fokus auf diese stärker differenzierten Zellen zu lenken. Denkbar wäre in diesem Sinne die Isolierung und Untersuchung von Makrophagen aus Biopsien des subkutanen Fettgewebes. Das Expressionsverhalten des Genes „LTF“ sollte bei diesen Untersuchungen Beachtung finden, da sich das Gen in unseren Analysen als interessanter Kandidat für die Mediation einer herabgesetzten proinflammatorischen Orientierung von Zellen des angeborenen Immunsystems im Rahmen der Diabetesremission herausstellte.

Grundsätzlich bleibt im Anschluss an unsere Untersuchungen zu klären, über welchen Zeitraum die erzielten Remissionserfolge bestanden haben. Bei StudienteilnehmerInnen mit einem Gewichtsverlust von 10 kg oder mehr durch die Ernährungsintervention im Rahmen der „DiRECT“-Studie, blieb der T2DM bei 64 % über zwei Jahre hinweg in Remission [26].

Unsere StudienteilnehmerInnen wurden nach Abschluss der Intervention strukturiert in eine gesunde, ausgewogene Diät eingeführt und bleiben weiterhin an die Studienambulanz angebunden. Zur Zeit sehen wir die Teilnehmenden zu den Folgevisiten nach einem halben und einem vollen Jahr nach Interventionsabschluss. Bislang unveröffentlichte Analysen der Daten dieser Visiten zeigen, dass die Diabetesremission durch hypokalorische Formuladiät auch mittelfristig Bestand haben kann.

Mit Spannung erwarten wir die laufenden Analysen zur Rolle des Hormons Glucagon in der Vermittlung der Diabetesremission. Bei einem Teil der ResponderInnen ist eine starke Änderung der Glucagonantwort bei ausbleibender Änderung der Insulinantwort auf Mahlzeitenstimulation nach der Ernährungsintervention im Vergleich zu davor zu beobachten. Ein anderer Teil zeigte die gegensätzliche Konstellation (Abbildung 11). Die Diabetesremission scheint daher über verschiedene hormonelle Muster zu vermitteln zu sein. Glucagon wurde bislang nicht in diesem Kontext untersucht, weshalb es hier weiterer Studien bedarf.

Acknowledgement

Hepafast® wurde vom Hersteller kostenlos zu Verfügung gestellt. Der Hersteller hatte keinen Einfluss auf das Studiendesign, die Datenanalyse oder -interpretation.

Referenzen

1. World Health, O., *Global report on diabetes*. 2016, Geneva: World Health Organization.
2. Franco, M., U. Bilal, P. Orduñez, M. Benet, A. Morejón, B. Caballero, J.F. Kennelly, and R.S. Cooper, *Population-wide weight loss and regain in relation to diabetes burden and cardiovascular mortality in Cuba 1980-2010: repeated cross sectional surveys and ecological comparison of secular trends*. *Bmj*, 2013. **346**: p. f1515.
3. Cosentino, F., P.J. Grant, V. Aboyans, C.J. Bailey, A. Ceriello, V. Delgado, M. Federici, G. Filippatos, D.E. Grobbee, T.B. Hansen, H.V. Huikuri, I. Johansson, P. Jüni, M. Lettino, N. Marx, L.G. Mellbin, C.J. Östgren, B. Rocca, M. Roffi, N. Sattar, P.M. Seferović, M. Sousa-Uva, P. Valensi, and D.C. Wheeler, *2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD*. *Eur Heart J*, 2020. **41**(2): p. 255-323.
4. Kasper, D.L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L, *Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th edition*. New York: McGraw Hill Education. 2015.
5. McCombie, L., W. Leslie, R. Taylor, B. Kennon, N. Sattar, and M.E.J. Lean, *Beating type 2 diabetes into remission*. *Bmj*, 2017. **358**: p. j4030.
6. Riddle, M.C., W.T. Cefalu, P.H. Evans, H.C. Gerstein, M.A. Nauck, W.K. Oh, A.E. Rothberg, C.W. le Roux, F. Rubino, P. Schauer, R. Taylor, and D. Twenefour, *Consensus Report: Definition and Interpretation of Remission in Type 2 Diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022. **107**(1): p. 1-9.
7. Pories, W.J., M.S. Swanson, K.G. MacDonald, S.B. Long, P.G. Morris, B.M. Brown, H.A. Barakat, R.A. deRamon, G. Israel, and J.M. Dolezal, *Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus*. *Ann Surg*, 1995. **222**(3): p. 339-50; discussion 350-2.
8. Henry, R.R., L. Scheaffer, and J.M. Olefsky, *Glycemic effects of intensive caloric restriction and isocaloric refeeding in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985. **61**(5): p. 917-25.
9. Long, S.D., K. O'Brien, K.G. MacDonald, Jr., N. Leggett-Frazier, M.S. Swanson, W.J. Pories, and J.F. Caro, *Weight loss in severely obese subjects prevents the progression of impaired glucose tolerance to type II diabetes. A longitudinal interventional study*. *Diabetes Care*, 1994. **17**(5): p. 372-5.
10. Wiggins, T., M.S. Majid, and S. Agrawal, *From the Knife to the Endoscope-a History of Bariatric Surgery*. *Curr Obes Rep*, 2020. **9**(3): p. 315-325.
11. Purnell, J.Q., F. Selzer, A.S. Wahed, J. Pender, W. Pories, A. Pomp, G. Dakin, J. Mitchell, L. Garcia, M.A. Staten, C. McCloskey, D.E. Cummings, D.R. Flum, A. Courcoulas, and B.M. Wolfe, *Type 2 Diabetes Remission Rates After Laparoscopic Gastric Bypass and Gastric Banding: Results of the Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery Study*. *Diabetes Care*, 2016. **39**(7): p. 1101-7.
12. Hamza, N., M.H. Abbas, A. Darwish, Z. Shafeek, J. New, and B.J. Ammori, *Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic gastric banding and bypass*. *Surg Obes Relat Dis*, 2011. **7**(6): p. 691-6.
13. Bradley, D., C. Conte, B. Mittendorfer, J.C. Eagon, J.E. Varela, E. Fabbrini, A. Gastaldelli, K.T. Chambers, X. Su, A. Okunade, B.W. Patterson, and S. Klein, *Gastric bypass and banding equally improve insulin sensitivity and β cell function*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(12): p. 4667-74.
14. Petersen, K.F., S. Dufour, D. Befroy, M. Lehrke, R.E. Hendler, and G.I. Shulman, *Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(3): p. 603-8.
15. Guidone, C., M. Manco, E. Valera-Mora, A. Iaconelli, D. Gniuli, A. Mari, G. Nanni, M. Castagneto, M. Calvani, and G. Mingrone, *Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery*. *Diabetes*, 2006. **55**(7): p. 2025-31.
16. Lim, E.L., K.G. Hollingsworth, B.S. Aribisala, M.J. Chen, J.C. Mathers, and R. Taylor, *Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol*. *Diabetologia*, 2011. **54**(10): p. 2506-14.

17. Kashyap, S.R., S. Daud, K.R. Kelly, A. Gastaldelli, H. Win, S. Brethauer, J.P. Kirwan, and P.R. Schauer, *Acute effects of gastric bypass versus gastric restrictive surgery on beta-cell function and insulinotropic hormones in severely obese patients with type 2 diabetes*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(3): p. 462-71.
18. Steven, S., K.G. Hollingsworth, P.K. Small, S.A. Woodcock, A. Pucci, B. Aribisala, A. Al-Mrabeh, A.K. Daly, R.L. Batterham, and R. Taylor, *Weight Loss Decreases Excess Pancreatic Triacylglycerol Specifically in Type 2 Diabetes*. Diabetes Care, 2016. **39**(1): p. 158-65.
19. Yoshino, M., B.D. Kayser, J. Yoshino, R.I. Stein, D. Reeds, J.C. Eagon, S.R. Eckhouse, J.D. Watrous, M. Jain, R. Knight, K. Schechtman, B.W. Patterson, and S. Klein, *Effects of Diet versus Gastric Bypass on Metabolic Function in Diabetes*. N Engl J Med, 2020. **383**(8): p. 721-732.
20. Colquitt, J.L., K. Pickett, E. Loveman, and G.K. Frampton, *Surgery for weight loss in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **2014**(8): p. Cd003641.
21. Arterburn, D.E., D.A. Telem, R.F. Kushner, and A.P. Courcoulas, *Benefits and Risks of Bariatric Surgery in Adults: A Review*. Jama, 2020. **324**(9): p. 879-887.
22. Rehackova, L., V. Araújo-Soares, A.J. Adamson, S. Steven, R. Taylor, and F.F. Sniehotta, *Acceptability of a very-low-energy diet in Type 2 diabetes: patient experiences and behaviour regulation*. Diabet Med, 2017. **34**(11): p. 1554-1567.
23. Steven, S. and R. Taylor, *Restoring normoglycaemia by use of a very low calorie diet in long- and short-duration Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2015. **32**(9): p. 1149-55.
24. Steven, S., K.G. Hollingsworth, A. Al-Mrabeh, L. Avery, B. Aribisala, M. Caslake, and R. Taylor, *Very Low-Calorie Diet and 6 Months of Weight Stability in Type 2 Diabetes: Pathophysiological Changes in Responders and Nonresponders*. Diabetes Care, 2016. **39**(5): p. 808-15.
25. Lean, M.E., W.S. Leslie, A.C. Barnes, N. Brosnahan, G. Thom, L. McCombie, C. Peters, S. Zhyzhneuskaya, A. Al-Mrabeh, K.G. Hollingsworth, A.M. Rodrigues, L. Rehackova, A.J. Adamson, F.F. Sniehotta, J.C. Mathers, H.M. Ross, Y. McIlvenna, R. Stefanetti, M. Trenell, P. Welsh, S. Kean, I. Ford, A. McConnachie, N. Sattar, and R. Taylor, *Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial*. Lancet, 2018. **391**(10120): p. 541-551.
26. Lean, M.E.J., W.S. Leslie, A.C. Barnes, N. Brosnahan, G. Thom, L. McCombie, C. Peters, S. Zhyzhneuskaya, A. Al-Mrabeh, K.G. Hollingsworth, A.M. Rodrigues, L. Rehackova, A.J. Adamson, F.F. Sniehotta, J.C. Mathers, H.M. Ross, Y. McIlvenna, P. Welsh, S. Kean, I. Ford, A. McConnachie, C.M. Messow, N. Sattar, and R. Taylor, *Durability of a primary care-led weight-management intervention for remission of type 2 diabetes: 2-year results of the DiRECT open-label, cluster-randomised trial*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019. **7**(5): p. 344-355.
27. Leslie, W.S., I. Ford, N. Sattar, K.G. Hollingsworth, A. Adamson, F.F. Sniehotta, L. McCombie, N. Brosnahan, H. Ross, J.C. Mathers, C. Peters, G. Thom, A. Barnes, S. Kean, Y. McIlvenna, A. Rodrigues, L. Rehackova, S. Zhyzhneuskaya, R. Taylor, and M.E. Lean, *The Diabetes Remission Clinical Trial (DiRECT): protocol for a cluster randomised trial*. BMC Fam Pract, 2016. **17**: p. 20.
28. Taylor, R., A. Al-Mrabeh, S. Zhyzhneuskaya, C. Peters, A.C. Barnes, B.S. Aribisala, K.G. Hollingsworth, J.C. Mathers, N. Sattar, and M.E.J. Lean, *Remission of Human Type 2 Diabetes Requires Decrease in Liver and Pancreas Fat Content but Is Dependent upon Capacity for beta Cell Recovery*. Cell Metab, 2018. **28**(4): p. 547-556 e3.
29. Zhyzhneuskaya, S.V., A. Al-Mrabeh, C. Peters, A. Barnes, B. Aribisala, K.G. Hollingsworth, A. McConnachie, N. Sattar, M.E.J. Lean, and R. Taylor, *Time Course of Normalization of Functional β -Cell Capacity in the Diabetes Remission Clinical Trial After Weight Loss in Type 2 Diabetes*. Diabetes Care, 2020. **43**(4): p. 813-820.
30. Thom, G., C.M. Messow, W.S. Leslie, A.C. Barnes, N. Brosnahan, L. McCombie, A. Al-Mrabeh, S. Zhyzhneuskaya, P. Welsh, N. Sattar, R. Taylor, and M.E.J. Lean, *Predictors of type 2 diabetes remission in the Diabetes Remission Clinical Trial (DiRECT)*. Diabet Med, 2020: p. e14395.

31. Taylor, R., *Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause*. Diabetologia, 2008. **51**(10): p. 1781-1789.
32. Taylor, R., *Type 2 diabetes: etiology and reversibility*. Diabetes Care, 2013. **36**(4): p. 1047-55.
33. Taylor, R. and A.C. Barnes, *Translating aetiological insight into sustainable management of type 2 diabetes*. Diabetologia, 2018. **61**(2): p. 273-283.
34. Taylor, R., *Type 2 Diabetes and Remission: Practical Management Guided by Pathophysiology*. J Intern Med, 2020.
35. Samuel, V.T., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism*. Lancet, 2010. **375**(9733): p. 2267-77.
36. Pinnick, K., M. Neville, A. Clark, and B. Fielding, *Reversibility of metabolic and morphological changes associated with chronic exposure of pancreatic islet beta-cells to fatty acids*. J Cell Biochem, 2010. **109**(4): p. 683-92.
37. Talchai, C., S. Xuan, H.V. Lin, L. Sussel, and D. Accili, *Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1223-34.
38. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology*. Vol. 9. 2016, New York: Garland Science.
39. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
40. Christ, A., M. Lauterbach, and E. Latz, *Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection*. Immunity, 2019. **51**(5): p. 794-811.
41. Hotamisligil, G.S., *Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders*. Nature, 2017. **542**(7640): p. 177-185.
42. Kloting, N. and M. Bluher, *Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome*. Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(4): p. 277-87.
43. Roche, H.M., *Dietary modulation of energy homeostasis and metabolic-inflammation*. Proc Nutr Soc, 2019. **78**(3): p. 313-318.
44. Martinez, F.O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati, *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
45. Lumeng, C.N., J.B. DelProposto, D.J. Westcott, and A.R. Saltiel, *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
46. Mantovani, A. and M. Locati, *Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(7): p. 1478-83.
47. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
48. Pickup, J.C. and M.A. Crook, *Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?* Diabetologia, 1998. **41**(10): p. 1241-8.
49. Böni-Schnetzler, M. and D.T. Meier, *Islet inflammation in type 2 diabetes*. Semin Immunopathol, 2019. **41**(4): p. 501-513.
50. Banaei-Bouchareb, L., V. Gouon-Evans, D. Samara-Boustani, M.C. Castellotti, P. Czernichow, J.W. Pollard, and M. Polak, *Insulin cell mass is altered in Csf1op/Csf1op macrophage-deficient mice*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 359-67.
51. Spranger, J., A. Kroke, M. Mohlig, K. Hoffmann, M.M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing, and A.F. Pfeiffer, *Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 812-7.
52. Kany, S., J.T. Vollrath, and B. Relja, *Cytokines in Inflammatory Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
53. Larsen, C.M., M. Faulenbach, A. Vaag, A. Vølund, J.A. Ehses, B. Seifert, T. Mandrup-Poulsen, and M.Y. Donath, *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1517-26.
54. Lundberg, M., P. Seiron, S. Ingvast, O. Korsgren, and O. Skog, *Insulinitis in human diabetes: a histological evaluation of donor pancreases*. Diabetologia, 2017. **60**(2): p. 346-353.

55. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
56. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
57. Netea, M.G., J. Quintin, and J.W. van der Meer, *Trained immunity: a memory for innate host defense*. Cell Host Microbe, 2011. **9**(5): p. 355-61.
58. Bekkering, S., R.J.W. Arts, B. Novakovic, I. Kourtzelis, C. van der Heijden, Y. Li, C.D. Popa, R. Ter Horst, J. van Tuijl, R.T. Netea-Maier, F.L. van de Veerdonk, T. Chavakis, L.A.B. Joosten, J.W.M. van der Meer, H. Stunnenberg, N.P. Riksen, and M.G. Netea, *Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 135-146.e9.
59. Cheng, S.C., J. Quintin, R.A. Cramer, K.M. Shephardson, S. Saeed, V. Kumar, E.J. Giamarellos-Bourboulis, J.H. Martens, N.A. Rao, A. Aghajani-Refah, G.R. Manjari, Y. Li, D.C. Ifrim, R.J. Arts, B.M. van der Veer, P.M. Deen, C. Logie, L.A. O'Neill, P. Willems, F.L. van de Veerdonk, J.W. van der Meer, A. Ng, L.A. Joosten, C. Wijmenga, H.G. Stunnenberg, R.J. Xavier, and M.G. Netea, *mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity*. Science, 2014. **345**(6204): p. 1250684.
60. Christ, A., P. Gunther, M.A.R. Lauterbach, P. Duewell, D. Biswas, K. Pelka, C.J. Scholz, M. Oosting, K. Haendler, K. Bassler, K. Klee, J. Schulte-Schrepping, T. Ulas, S. Moorlag, V. Kumar, M.H. Park, L.A.B. Joosten, L.A. Groh, N.P. Riksen, T. Espevik, A. Schlitzer, Y. Li, M.L. Fitzgerald, M.G. Netea, J.L. Schultze, and E. Latz, *Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 162-175.e14.
61. Ding, S., S. Xu, Y. Ma, G. Liu, H. Jang, and J. Fang, *Modulatory Mechanisms of the NLRP3 Inflammasomes in Diabetes*. Biomolecules, 2019. **9**(12).
62. Próchnicki, T. and E. Latz, *Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control*. Cell Metab, 2017. **26**(1): p. 71-93.
63. Broz, P. and V.M. Dixit, *Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(7): p. 407-20.
64. Netea, M.G., J. Domínguez-Andrés, L.B. Barreiro, T. Chavakis, M. Divangahi, E. Fuchs, L.A.B. Joosten, J.W.M. van der Meer, M.M. Mhlanga, W.J.M. Mulder, N.P. Riksen, A. Schlitzer, J.L. Schultze, C. Stabell Benn, J.C. Sun, R.J. Xavier, and E. Latz, *Defining trained immunity and its role in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(6): p. 375-388.
65. De Nardo, D. and E. Latz, *NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 373-9.
66. Dror, E., E. Dalmas, D.T. Meier, S. Wuest, J. Thévenet, C. Thienel, K. Timper, T.M. Nordmann, S. Traub, F. Schulze, F. Item, D. Vallois, F. Pattou, J. Kerr-Conte, V. Lavallard, T. Berney, B. Thorens, D. Konrad, M. Böni-Schnetzler, and M.Y. Donath, *Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation*. Nat Immunol, 2017. **18**(3): p. 283-292.
67. Donath, M.Y., É. Dalmas, N.S. Sauter, and M. Böni-Schnetzler, *Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 860-872.
68. Vandanmagsar, B., Y.H. Youm, A. Ravussin, J.E. Galgani, K. Stadler, R.L. Mynatt, E. Ravussin, J.M. Stephens, and V.D. Dixit, *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 179-88.
69. Youm, Y.H., K.Y. Nguyen, R.W. Grant, E.L. Goldberg, M. Bodogai, D. Kim, D. D'Agostino, N. Planavsky, C. Lupfer, T.D. Kanneganti, S. Kang, T.L. Horvath, T.M. Fahmy, P.A. Crawford, A. Biragyn, E. Alnemri, and V.D. Dixit, *The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease*. Nat Med, 2015. **21**(3): p. 263-9.
70. Mercodia, *Mercodia Glucagon ELISA - Directions for Use*. 2021(Version 12.0): p. 1-12.
71. Mercodia, *Mercodia Insulin ELISA - Directions for Use*. 2021(Version 17.0): p. 1-12.
72. Matthews, D.R., J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, and R.C. Turner, *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.

73. Stumvoll, M., A. Mitrakou, W. Pimenta, T. Jenssen, H. Yki-Järvinen, T. Van Haeften, W. Renn, and J. Gerich, *Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(3): p. 295-301.
74. Matsuda, M. and R.A. DeFronzo, *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp*. *Diabetes Care*, 1999. **22**(9): p. 1462-70.
75. Mari, A., G. Pacini, E. Murphy, B. Ludvik, and J.J. Nolan, *A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test*. *Diabetes Care*, 2001. **24**(3): p. 539-48.
76. Tura, A., G. Chemello, J. Szendroedi, C. Göbl, K. Færch, J. Vrbíková, G. Pacini, E. Ferrannini, and M. Roden, *Prediction of clamp-derived insulin sensitivity from the oral glucose insulin sensitivity index*. *Diabetologia*, 2018. **61**(5): p. 1135-1141.
77. Bedogni, G., S. Bellentani, L. Miglioli, F. Masutti, M. Passalacqua, A. Castiglione, and C. Tiribelli, *The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population*. *BMC Gastroenterol*, 2006. **6**: p. 33.
78. Kotronen, A., M. Peltonen, A. Hakkarainen, K. Sevastianova, R. Bergholm, L.M. Johansson, N. Lundbom, A. Rissanen, M. Ridderstråle, L. Groop, M. Orho-Melander, and H. Yki-Järvinen, *Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(3): p. 865-72.
79. ThermoFisher, *ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay USER GUIDE*. 2020(Publication Number MAN0016941): p. 1-25.
80. Qiagen, *Quick-Start Protocol RNeasy® Mini Kit, Part 1*. 2016(HB-0570-001): p. 1-2.
81. Qiagen, *Quick-Start Protocol RNeasy® Mini Kit, Part 2*. 2016(HB-0570-002): p. 1-2.
82. Chen, Z., C.K. Han, L.L. Pan, H.J. Zhang, Z.M. Ma, Z.F. Huang, S. Chen, X.J. Zhuang, Z.B. Li, X.Y. Li, X.J. Li, and S.Y. Yang, *Serum alanine aminotransferase independently correlates with intrahepatic triglyceride contents in obese subjects*. *Dig Dis Sci*, 2014. **59**(10): p. 2470-6.
83. Fujii, H., H. Doi, T. Ko, T. Fukuma, T. Kadono, K. Asaeda, R. Kobayashi, T. Nakano, T. Doi, Y. Nakatsugawa, S. Yamada, T. Nishimura, N. Tomatsuri, H. Sato, Y. Okuyama, H. Kimura, E. Kishimoto, N. Nakabe, and T. Shima, *Frequently abnormal serum gamma-glutamyl transferase activity is associated with future development of fatty liver: a retrospective cohort study*. *BMC Gastroenterol*, 2020. **20**(1): p. 217.
84. Ikai, E., R. Honda, and Y. Yamada, *Serum gamma-glutamyl transpeptidase level and blood pressure in nondrinkers: a possible pathogenetic role of fatty liver in obesity-related hypertension*. *J Hum Hypertens*, 1994. **8**(2): p. 95-100.
85. Forbes, S., A. Lam, A. Koh, S. Imes, P. Dinyari, A.J. Malcolm, A.M.J. Shapiro, and P.A. Senior, *Comparison of metabolic responses to the mixed meal tolerance test vs the oral glucose tolerance test after successful clinical islet transplantation*. *Clin Transplant*, 2018. **32**(8): p. e13301.
86. Hædersdal, S., A. Lund, F.K. Knop, and T. Vilsbøll, *The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes*. *Mayo Clin Proc*, 2018. **93**(2): p. 217-239.
87. Yoo, S., D. Kim, and G. Koh, *The Change in Glucagon Following Meal Ingestion Is Associated with Glycemic Control, but Not with Incretin, in People with Diabetes*. *J Clin Med*, 2021. **10**(11).
88. Vittal, A., M. Shapses, B. Sharma, D. Sharma, Q. Sun, M. Sampson, W. Lee, G. Ben Yakov, and Y. Rotman, *Lipoprotein Insulin Resistance Index Reflects Liver Fat Content in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Hepatol Commun*, 2021. **5**(4): p. 589-597.
89. Picchini, U., A. De Gaetano, S. Panunzi, S. Ditlevsen, and G. Mingrone, *A mathematical model of the euglycemic hyperinsulinemic clamp*. *Theor Biol Med Model*, 2005. **2**: p. 44.
90. Al-Mrabeh, A., S.V. Zhyzhneuskaya, C. Peters, A.C. Barnes, S. Melhem, A. Jesuthasan, B. Aribisala, K.G. Hollingsworth, G. Lietz, J.C. Mathers, N. Sattar, M.E.J. Lean, and R. Taylor, *Hepatic Lipoprotein Export and Remission of Human Type 2 Diabetes after Weight Loss*. *Cell Metab*, 2020. **31**(2): p. 233-249.e4.

91. Ferrannini, E. and W.C. Cushman, *Diabetes and hypertension: the bad companions*. *Lancet*, 2012. **380**(9841): p. 601-10.
92. Leslie, W.S., E. Ali, L. Harris, C.M. Messow, N.T. Brosnahan, G. Thom, E.L. McCombie, A.C. Barnes, N. Sattar, R. Taylor, and M.E.J. Lean, *Antihypertensive medication needs and blood pressure control with weight loss in the Diabetes Remission Clinical Trial (DiRECT)*. *Diabetologia*, 2021. **64**(9): p. 1927-1938.
93. Garrison, R.J., W.B. Kannel, J. Stokes, 3rd, and W.P. Castelli, *Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study*. *Prev Med*, 1987. **16**(2): p. 235-51.
94. Williams, B., G. Mancia, W. Spiering, E. Agabiti Rosei, M. Azizi, M. Burnier, D.L. Clement, A. Coca, G. de Simone, A. Dominiczak, T. Kahan, F. Mahfoud, J. Redon, L. Ruilope, A. Zanchetti, M. Kerins, S.E. Kjeldsen, R. Kreutz, S. Laurent, G.Y.H. Lip, R. McManus, K. Narkiewicz, F. Ruschitzka, R.E. Schmieder, E. Shlyakhto, C. Tsioufis, V. Aboyans, and I. Desormais, *2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension*. *Eur Heart J*, 2018. **39**(33): p. 3021-3104.
95. Wabitsch, M., A. Berg, M. Colombo-Benkmann, and ... *S3-Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas. Deutsche Adipositas Gesellschaft (DAG). Stand: 2014. Aberufen am: 02.05.2022*.
96. Samson, R., K. Ayinapudi, T.H. Le Jemtel, and S. Oparil, *Obesity, Hypertension, and Bariatric Surgery*. *Curr Hypertens Rep*, 2020. **22**(7): p. 46.
97. Owen, J.G., F. Yazdi, and E. Reisin, *Bariatric Surgery and Hypertension*. *Am J Hypertens*, 2017. **31**(1): p. 11-17.
98. Bell, B.B. and K. Rahmouni, *Leptin as a Mediator of Obesity-Induced Hypertension*. *Curr Obes Rep*, 2016. **5**(4): p. 397-404.
99. Simonds, S.E., J.T. Pryor, E. Ravussin, F.L. Greenway, R. Dileone, A.M. Allen, J. Bassi, J.K. Elmquist, J.M. Keogh, E. Henning, M.G. Myers, Jr., J. Licinio, R.D. Brown, P.J. Enriori, S. O'Rahilly, S.M. Sternson, K.L. Grove, D.C. Spanswick, I.S. Farooqi, and M.A. Cowley, *Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity*. *Cell*, 2014. **159**(6): p. 1404-16.
100. Rehackova, L., V. Araújo-Soares, S. Steven, A.J. Adamson, R. Taylor, and F.F. Sniehotta, *Behaviour change during dietary Type 2 diabetes remission: a longitudinal qualitative evaluation of an intervention using a very low energy diet*. *Diabet Med*, 2020. **37**(6): p. 953-962.
101. Rehackova, L., A.M. Rodrigues, G. Thom, N. Brosnahan, A.C. Barnes, L. McCombie, W.S. Leslie, S. Zhyzhneuskaya, C. Peters, A.J. Adamson, M.E.J. Lean, R. Taylor, and F.F. Sniehotta, *Participant experiences in the Diabetes REmission Clinical Trial (DiRECT)*. *Diabet Med*, 2022. **39**(1): p. e14689.
102. Rehackova, L., R. Taylor, M. Lean, A. Barnes, L. McCombie, G. Thom, N. Brosnahan, W.S. Leslie, and F.F. Sniehotta, *Delivering the Diabetes Remission Clinical Trial (DiRECT) in primary care: Experiences of healthcare professionals*. *Diabet Med*, 2022. **39**(3): p. e14752.
103. Liew, F.Y., D. Xu, E.K. Brint, and L.A. O'Neill, *Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(6): p. 446-58.
104. Foster, S.L., D.C. Hargreaves, and R. Medzhitov, *Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications*. *Nature*, 2007. **447**(7147): p. 972-8.
105. Ostuni, R., V. Piccolo, I. Barozzi, S. Polletti, A. Termanini, S. Bonifacio, A. Curina, E. Prosperini, S. Ghisletti, and G. Natoli, *Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells*. *Cell*, 2013. **152**(1-2): p. 157-71.
106. Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A.M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford, and S. Bauer, *Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(6): p. 499.
107. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler, *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.

108. Lee, J., T.H. Chuang, V. Redecke, L. She, P.M. Pitha, D.A. Carson, E. Raz, and H.B. Cottam, *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6646-51.
109. Dziarski, R. and D. Gupta, *Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 5212-6.
110. Jin, L., K.K. Hill, H. Filak, J. Mogan, H. Knowles, B. Zhang, A.L. Perraud, J.C. Cambier, and L.L. Lenz, *MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2595-601.
111. Kelley, N., D. Jeltema, Y. Duan, and Y. He, *The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
112. van der Heijden, C., L. Groh, S.T. Keating, C. Kaffa, M.P. Noz, S. Kersten, A.E. van Herwaarden, A. Hoischen, L.A.B. Joosten, H. Timmers, M.G. Netea, and N.P. Riksen, *Catecholamines Induce Trained Immunity in Monocytes In Vitro and In Vivo*. Circ Res, 2020. **127**(2): p. 269-283.
113. Eiden, L.E., *Neuropeptide-catecholamine interactions in stress*. Adv Pharmacol, 2013. **68**: p. 399-404.
114. Yin, J., Y. Peng, J. Wu, Y. Wang, and L. Yao, *Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and β -cell dysfunction*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(1): p. 47-52.
115. Eguchi, K., I. Manabe, Y. Oishi-Tanaka, M. Ohsugi, N. Kono, F. Ogata, N. Yagi, U. Ohto, M. Kimoto, K. Miyake, K. Tobe, H. Arai, T. Kadowaki, and R. Nagai, *Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation*. Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 518-33.
116. Grant, R.W. and V.D. Dixit, *Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 50.
117. Palomino, D.C. and L.C. Marti, *Chemokines and immunity*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(3): p. 469-73.
118. Swaroop, J.J., D. Rajarajeswari, and J.N. Naidu, *Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus*. Indian J Med Res, 2012. **135**(1): p. 127-30.
119. Kuznetsova, T., K.H.M. Prange, C.K. Glass, and M.P.J. de Winther, *Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(4): p. 216-228.
120. Min, D., B. Brooks, J. Wong, R. Salomon, W. Bao, B. Harrisberg, S.M. Twigg, D.K. Yue, and S.V. McLennan, *Alterations in monocyte CD16 in association with diabetes complications*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 649083.
121. Yang, M., H. Gan, Q. Shen, W. Tang, X. Du, and D. Chen, *Proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes are associated with microinflammation in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy uremia*. Inflammation, 2012. **35**(1): p. 388-96.
122. Jordan, S., N. Tung, M. Casanova-Acebes, C. Chang, C. Cantoni, D. Zhang, T.H. Wirtz, S. Naik, S.A. Rose, C.N. Brocker, A. Gainullina, D. Hornburg, S. Horng, B.B. Maier, P. Cravedi, D. LeRoith, F.J. Gonzalez, F. Meissner, J. Ochando, A. Rahman, J.E. Chipuk, M.N. Artyomov, P.S. Frenette, L. Piccio, M.L. Berres, E.J. Gallagher, and M. Merad, *Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool*. Cell, 2019. **178**(5): p. 1102-1114.e17.
123. Kapellos, T.S., L. Bonaguro, I. Gemünd, N. Reusch, A. Saglam, E.R. Hinkley, and J.L. Schultze, *Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2035.
124. Appay, V., S. Reynard, V. Voelter, P. Romero, D.E. Speiser, and S. Leyvraz, *Immuno-monitoring of CD8⁺ T cells in whole blood versus PBMC samples*. J Immunol Methods, 2006. **309**(1-2): p. 192-9.
125. Mraz, M., Z. Lacinova, J. Drapalova, D. Haluzikova, A. Horinek, M. Matoulek, P. Trachta, P. Kavalkova, S. Svacina, and M. Haluzik, *The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. E606-13.

126. Trachta, P., I. Dostálová, D. Haluzíková, M. Kasalický, P. Kaválková, J. Drápalová, M. Urbanová, Z. Lacinová, M. Mráz, and M. Haluzík, *Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients*. *Mol Cell Endocrinol*, 2014. **383**(1-2): p. 96-102.
127. Ward, P.P., E. Paz, and O.M. Conneely, *Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(22): p. 2540-8.
128. Oishi, K., H. Okano, and H. Sawa, *RMD-1, a novel microtubule-associated protein, functions in chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans**. *J Cell Biol*, 2007. **179**(6): p. 1149-62.
129. Ando, K., K. Hasegawa, K. Shindo, T. Furusawa, T. Fujino, K. Kikugawa, H. Nakano, O. Takeuchi, S. Akira, T. Akiyama, J. Gohda, J. Inoue, and M. Hayakawa, *Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling*. *Febs j*, 2010. **277**(9): p. 2051-66.
130. Håversen, L., B.G. Ohlsson, M. Hahn-Zoric, L.A. Hanson, and I. Mattsby-Baltzer, *Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B*. *Cell Immunol*, 2002. **220**(2): p. 83-95.
131. Ahlqvist, E., P. Storm, A. Käräjämäki, M. Martinell, M. Dorkhan, A. Carlsson, P. Vikman, R.B. Prasad, D.M. Aly, P. Almgren, Y. Wessman, N. Shaat, P. Spégel, H. Mulder, E. Lindholm, O. Melander, O. Hansson, U. Malmqvist, Å. Lernmark, K. Lahti, T. Forsén, T. Tuomi, A.H. Rosengren, and L. Groop, *Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. **6**(5): p. 361-369.
132. Zhao, Z., L. Wang, W. Gao, F. Hu, J. Zhang, Y. Ren, R. Lin, Q. Feng, M. Cheng, D. Ju, Q. Chi, D. Wang, S. Song, M. Luo, and C. Zhan, *A Central Catecholaminergic Circuit Controls Blood Glucose Levels during Stress*. *Neuron*, 2017. **95**(1): p. 138-152.e5.
133. Mummadi, R.R., K.S. Kasturi, S. Chennareddygar, and G.K. Sood, *Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(12): p. 1396-402.
134. Vilar-Gomez, E., Y. Martinez-Perez, L. Calzadilla-Bertot, A. Torres-Gonzalez, B. Gra-Oramas, L. Gonzalez-Fabian, S.L. Friedman, M. Diago, and M. Romero-Gomez, *Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(2): p. 367-78.e5; quiz e14-5.
135. Pouwels, S., N. Sakran, Y. Graham, A. Leal, T. Pintar, W. Yang, R. Kassir, R. Singhal, K. Mahawar, and D. Ramnarain, *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss*. *BMC Endocr Disord*, 2022. **22**(1): p. 63.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kilian Rüter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Fastenassoziierter Immunometabolismus und Diabetes Remission (FAIR) / Fasting induced Immunometabolism and Remission of Diabetes (FAIR) 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 AutorInnen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum Unterschrift

Persönlicher Lebenslauf

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die exzellente Betreuung bedanken, die ich von Prof. Dr. med. Andreas Pfeiffer, Dr. rer. nat. Anette Christ und Dr. med. Stefan Kabisch erhalten habe. Als projektverantwortliche Personen standen sie mir bei der Durchführung der konzeptuellen, praktischen und analytischen Teile dieser Arbeit tatkräftig zur Seite und fungierten während der gesamten Zeit als stets ansprechbare Mentoren für mich. Ohne ihre freie, kreative Art zu denken und Probleme zu bewältigen, wäre die FAIR-Studie nicht umsetzbar gewesen!

Ebenfalls gilt mein großer Dank meinen KollegInnen am Institut für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin, welche direkt an der Umsetzung der Arbeit beteiligt waren. In erster Linie zu nennen sind in diesem Sinne Elena Lalama, Jiudan Zhang, Marta Csanalosi, Bettina Schuppelius, Barbara Opitz und Anja Henkel.

Für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Analysen dieser Arbeit danke ich Oliver Schweizerhof vom Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Universitätsmedizin Berlin sowie PhD Svetozar Nesic und Andreas Buness vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn.

Nur durch den Rückhalt aus meiner Familie war es mir möglich, die nötige Zeit und Kraft für die Umsetzung der FAIR-Studie und der vorliegenden Dissertation aufzubringen, weshalb ihnen mein ausgesprochener Dank gilt.

Kilian Rüter im Juli 2022

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (IBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Rüter, Kilian
Emailadresse: kilian.ruether@charite.de
Matrikelnummer: 222519
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Andreas Pfeiffer
Promotionsinstitution / Klinik: Medizinische Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin
Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Kilian Rüter innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 03.12.2021
- Termin 2: 18.03.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Verwendung von geeigneten Lage- und Streumaßen
- Überprüfung von Normalverteilungsannahmen
- Berücksichtigung der Datenstruktur (Messwiederholungen)
- Hypothesengenerierende Interpretation der p-Werte bei sekundären Endpunkten (explorativ)

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 05.05.2022

Name des Beraters/ der Beraterin: Oliver Schweizerhof



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

