

Aus dem

CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie (CC13)

Medizinische Klinik mit dem Schwerpunkt Endokrinologie und Stoffwechselmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. J. Spranger

Habilitationsschrift

Metabolische Marker des Diabetes mellitus Typ 2 und des kardiovaskulären Risikos

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Thomas Bobbert

geboren am 18.02.1975 in Barcelona

Eingereicht: September 2012

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Blüher

## Inhaltsverzeichnis:

	Seiten
1) Einleitung	1-4
2) Zusammenfassung eigener Arbeiten	
a) Veränderungen von Adiponectin Oligomeren durch moderate Gewichtsreduktion	5
b) Metabolische Einflussfaktoren des zirkulierenden Gesamt-Adiponectin und der Adiponectin Oligomere	6
c) Glykiertes Hämoglobin ist assoziiert mit der Intima Media Dicke in Personen mit normaler Glucosetoleranz	7
d) Beziehung zwischen Retinol, Retinol-binding Protein 4, Transthyretin und der Intima media Dicke	8
e) FGF-21 und Prädiktion von Typ 2 Diabetes mellitus und Metabolischem Syndrom	9
3) Diskussion	10-14
4) Zusammenfassung	15
5) Literaturverzeichnis	16-20
6) Danksagung	21
7) Erklärung	22

## 1) Einleitung

Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist eine Erkrankung mit weltweit wachsender Bedeutung. Schon heute sind ca. 255 Millionen Menschen weltweit an Typ 2 Diabetes erkrankt, und man rechnet mit einem weiteren Anstieg auf 439 Millionen im Jahr 2030 (1). Dies würde bedeuten, dass 7,7% der 20-79jährigen an T2DM erkrankt wären. Dieser Anstieg ist begründet durch eine generell höhere Lebenserwartung und Urbanisierung der Gesellschaft mit entsprechenden Veränderungen des Lebensstils (2).

Hinsichtlich der Genese des T2DM sind hierfür neben genetisch determinierten Faktoren v. a. Lebensstilveränderungen und im Besonderen die weltweite Zunahme der Adipositas als Ursache anzusehen. Dabei gilt insbesondere die Adipositas als wesentlicher Risikofaktor des Typ 2 Diabetes. Interessanterweise entwickelt allerdings ein großer Anteil der übergewichtigen Menschen keine Folgeerkrankungen. Vor diesem Hintergrund ist es von zentraler Bedeutung, Patienten mit einem hohen Erkrankungsrisiko frühzeitig erkennen zu können. Von wesentlichem Interesse ist daher die Identifizierung von Biomarkern, die einen prädiktiven Wert hinsichtlich der Genese des Typ 2 Diabetes oder der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen besitzen.

An erster Stelle stehen die Marker des Glucosestoffwechsels bzw. die Laborparameter, über die der Typ 2 Diabetes mellitus bzw. eine gestörte Glucosetoleranz definiert wird. Diagnostiziert wird der Diabetes mellitus nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft 2010 laborchemisch durch Messung der Blutglucose oder des glykierten Hämoglobins (HbA1c). Als Diagnosekriterien der DDG gelten ein HbA1c  $\geq 6,5\%$  ( $\geq 48$  mmol/mol), ein Gelegenheits-Plasmaglucozewert von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l), eine Nüchtern-Plasmaglucoze von  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7,0$  mmol/l) oder ein oraler Glucosetoleranztest (OGTT)-2-h-Wert im venösen Plasma  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l). Als Vorstufe des Diabetes mellitus Typ 2 bzw. als Pre-Diabetes gelten eine abnorme Nüchternglucoze IFG (impaired fasting glucose, „abnorme Nüchternglucoze“) für den Bereich der Nüchternglucoze von 100–125 mg/dl (5,6 mmol – 6,9 mmol/l) im venösen Plasma und eine gestörte Glucosetoleranz IGT (impaired glucose tolerance) für eine 2-h-Plasmaglucoze im OGTT im Bereich 140–199 mg/dl (7,8–11,0 mmol/l) bei Nüchtern-Glucozewerten  $< 126$  mg/dl ( $< 7,0$  mmol/l). Hiervon geringfügig abweichend sind die Diagnosekriterien der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft ADA (3). Bis vor kurzem waren nur die Nüchternglucoze und der 2h Wert im OGTT als Diagnosekriterien des T2DM zugelassen. Gegen den HbA1c als Marker sprachen u.a. die ungenügende Verfügbarkeit, fehlende internationale Standardisierung und die Variabilität durch Hb-Anomalien und Erthyrozytenkonzentrat-Transfusionen (4). Trotzdem ist die Assoziation des HbA1c mit mikro- und makrovaskulären Komplikationen des T2DM hoch und bietet zudem weitere praktische Vorteile, wie z.B. das Verzichten auf eine Nüchternblutabnahme oder die fehlenden Schwankungen durch kurzfristige Lebensstilveränderungen. Durch eine bessere weltweite Verfügbarkeit und gleichzeitig durch die internationale Standardisierung der Meßmethode konnte der HbA1c-Wert als

Diagnosekriterium etabliert werden (5). Es ist jedoch anzumerken, dass die Grenzwerte für Glucosewerte und den HbA1c einer andauernden Diskussion unterliegen, da ein linearer Zusammenhang zwischen Veränderungen des Blutzuckers und dem kardiovaskulären Risiko diskutiert wird als Gegensatz zu einem definierten Grenzwert (6). Die eben beschriebenen Grenzwerte wurden gewählt, um v.a. Personen mit einem hohen Risiko für mikrovaskuläre Komplikationen wie diabetische Retinopathie und Nephropathie zu identifizieren (7). Zudem zeigen Longitudinalstudien mit Diabetespatienten und auch Personen ohne Typ 2 Diabetes, dass das kardiovaskuläre Risiko bzw. das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses mit ansteigenden Glucosewerten erhöht ist (8-10).

Neben diesen genannten etablierten Markern, die vor allem für die Diagnostik und Therapie von Diabetespatienten im klinischen Alltag wichtig sind, gibt es verschiedene Ansätze, zusätzliche Biomarker zu identifizieren, die eine frühzeitige Risikoabschätzung des individuellen Patienten ermöglichen. Ein Biomarker ist ein „Charakteristikum, welches objektiv quantifiziert werden kann und als ein Indikator dient für einen normalen biologischen Prozess, einen pathophysiologischen Prozess oder eine Antwort auf eine therapeutische Intervention.“ (National Institute of Health). Auf Proteinebene stehen derzeit vor allem inflammatorische Marker und so genannte Adipokine im Focus.

Neben inflammatorischen Parametern wie Interleukinen oder C-reaktives Protein, scheinen Adipokine bzw. Adipozytokine eine wesentliche Rolle bei der Genese und dem Verlauf des T2DM zu spielen (11). Längst ist bekannt, dass Adipozyten nicht nur der Speicherung von Fett dienen, sondern unterschiedliche Hormone synthetisieren, die wiederum vielfältige Wirkungen auf den Stoffwechsel haben können. Diese werden als Adipozytokine bezeichnet und greifen nicht nur im Fettgewebe, sondern im ganzen Organismus auf vielfältige Weise in den Stoffwechsel ein. Ein Adipozytokin mit protektiven Eigenschaften hinsichtlich der Entstehung des T2DM oder auch der Adipositas und der KHK ist Adiponectin (12-14). Adiponectin besteht aus einer globulären Domäne am carboxyterminalen und einer kollagenähnlichen Domäne am aminoterminalen Ende. Im Plasma liegt es als Trimer, Hexamer oder als hochmolekulares Oligomer vor, wobei die einzelnen Multimere unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktivieren können und somit auch unterschiedliche Effekte auf den Stoffwechsel ausüben können.

Ein weiteres Adipozytokin, welches mit der Genese des T2DM assoziiert erscheint, ist das Retinol-bindende Protein 4 (RBP4), welches ursprünglich bekannt wurde als verantwortlich für den Transport von Vitamin A im Plasma. Mit einem Molekulargewicht von 21 kD ist RBP4 ein kleines Protein, das in einem Komplex mit Transthyretin vorliegt. Yang et al. beschrieben dann eine neue Funktion des RBP4 als ein Protein mit Einflüssen auf den Glucosestoffwechsels sowie der Insulinsensitivität bzw. Insulinresistenz (15). Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der RBP4 Spiegel eine systemische Insulinresistenz auslöst, während eine Absenkung von RBP4 im Serum die Aktivität von Insulin erhöht. Bei Probanden mit Adipositas, gestörter Glucosetoleranz oder Typ-2-Diabetes als auch bei nicht adipösen Gesunden mit Typ-2-Diabetes in der Familienanamnese korrelieren die RBP4-

Konzentrationen mit dem Ausmaß der Insulinresistenz. Erhöhte RBP4-Spiegel waren mit einem erhöhten BMI und Taille/Hüfte-Verhältnis, einem höherem Blutdruck, erhöhten Triglyzeridwerten und niedrigeren HDL-Spiegeln assoziiert(16).

Ein ebenfalls mit der Genese des T2DM und Veränderungen des Lipidstoffwechsels assoziiertes Protein ist der erst seit kurzem bekannte Fibroblast Growth Faktor 21 (FGF-21) (17). FGF-21 wird in der Leber, v.a. in Phasen des Fastens, synthetisiert und entfaltet seine Wirkung sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe (18). Dazu benötigt FGF-21 den FGF-Rezeptor sowie ein Adaptermolekül namens  $\beta$ -Klotho (19). Die bisher vorliegenden Daten aus Tier-, Zellkulturexperimenten und humanen Studien zu FGF-21 zeigen ein teilweise widersprüchliches Bild bezüglich der Interaktion mit dem Glucose- und Lipidstoffwechsel. Während v.a. in Tierexperimenten FGF-21 eher antidiabetogene Eigenschaften zugesprochen werden, erscheinen in humanen Studien erhöhte FGF-21 Spiegel mit einer erhöhten Insulinresistenz, einer gestörten Glucosetoleranz und einer Hypertriglyzeridämie einherzugehen (17;20-22).

Bei der Identifizierung von Biomarkern spielt nicht nur deren Prädiktion des Glucosestoffwechsels eine Rolle, sondern auch deren Bedeutung für das kardiovaskuläre Risiko. Wünschenswert sind hierzu Endpunktstudien, die Mortalität und kardiovaskuläre Ereignisse erfassen. Diese sind jedoch nur möglich mit entsprechend großen Studienpopulationen. Ein Ausweg stellt die Bestimmung der Intima Media Dicke (IMT) als kardiovaskulärem Surrogatparameter dar. In der „Kuopio Ischemic Heart Disease“ (KIHD) Studie wurde über einen Beobachtungszeitraum von 2,5 Jahren bei 1288 Männern beobachtet, dass eine IMT > 1 mm mit einem 2,2 fach erhöhtem Risiko bzgl. eines Myokardinfarktes einhergeht (23). Ebenso konnte die „Atherosclerosis Risk in Communities Study“ (ARIC) in 15792 Personen im Alter zwischen 45-65 Jahren über einen Beobachtungszeitraum von 4-7 Jahren zeigen, dass pro 0,19 mm Unterschied in der IMT der Arteria carotis communis das Risiko einer Herz-Kreislaufkrankung bei Männern um 1,13 steigt (24). Lorenz et al. konnten in einem Review unter der Berücksichtigung von 8 Studien und 37197 Probanden zeigen, dass die Zunahme der IMT der ACC um 0,1 mm das Risiko eines Myokardinfarktes um 10-15% und eines cerebralen Insultes um 13-18% erhöht (25). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die IMT der Arteria carotis communis unter Berücksichtigung aller traditionellen Risikofaktoren den stärksten Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse darstellt. Dieses gilt besonders auch bei Personen mit T2DM (26). Diese Ergebnisse müssen jedoch zwei wesentliche Punkte berücksichtigen: zum einen die allgemeine Schwäche von Surrogatparametern und zum anderen die genaue Standardisierung der praktischen Durchführung der IMT Messungen (27-30).

Zusammenfassend ist die Bedeutung von Biomarkern hinsichtlich der Genese des T2DM und des kardiovaskulären Risikos ein wesentlicher Bestandteil der aktuellen Forschung und stellen einen wesentlichen Schwerpunkt der hier präsentierten wissenschaftlichen Arbeit dar. In der hier vorgestellten Auswahl an wissenschaftlichen Arbeiten werden diese Themen erarbeitet und diskutiert.

Im Besonderen sollen u.a. die Fragen erörtert werden, welcher Zusammenhang zwischen Adiponectin Oligomeren und dem Glucose- und Fettstoffwechsel besteht. Bezüglich der Genese des T2DM und des Metabolischen Syndroms wird die prospektive Bedeutung von FGF-21 untersucht. Weiterhin soll die Beziehung zwischen Markern des Glucosestoffwechsels, RBP4 und dem kardiovaskulären Risiko dargestellt werden.

## 2) Eigene Arbeiten

### a) Veränderungen von Adiponectin Oligomeren durch moderate Gewichtsreduktion

Adiponectin gehört zur Gruppe der Adipozytokine und ist sowohl an der Regulation sowohl des Lipid- als auch des Glucosestoffwechsels beteiligt. Adiponectin zirkuliert im Serum in verschiedenen großen Oligomeren, einer niedrigmolekularen (LMW), mittelmolekularen (MMW) und einer hochmolekularen Form (HMW). Diese Oligomere besitzen unterschiedliche biologische Funktionen bzw. sind mit unterschiedlichen metabolischen Eigenschaften assoziiert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Gewichtsreduktion auf die Verteilung der Adiponectin Oligomere und ihrer Funktionen untersucht.

17 übergewichtige Probanden (15 Frauen und 2 Männer) nahmen an einem 6 monatigen Gewichtsreduktionskurs teil. Die Teilnehmer wurden vor und nach der Intervention anthropometrisch und laborparametrisch charakterisiert. Zur Bestimmung der Insulinsensitivität wurden hyperinsulinämische euglykämische Clamps durchgeführt. Gesamt-Adiponectin wurde per ELISA bestimmt und die Adiponectin Oligomere durch einen nicht-denaturierenden Westernblot quantifiziert. Somit ergab sich für die Oligomere zunächst eine relative Verteilung, die dann in absolute Werte umgerechnet werden konnte. Die Probanden nahmen im beobachteten Zeitraum von  $35,1 \pm 1,2$  auf  $32,8 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$  ( $p < 0,001$ ) ab. Hinsichtlich Lipid- und Glucosestoffwechsel zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. So zeigten sich zwar Verbesserungen der Cholesterinparameter und der Insulinsensitivität, jedoch verfehlten diese knapp das Signifikanzniveau von  $p=0,05$ . Gesamt-Adiponectin stieg von  $5,3 \pm 0,5$  auf  $6,1 \pm 0,6 \text{ µg/ml}$  ( $p=0,076$ ) an. Die hochmolekulare Form (HMW) und die mittelmolekulare Form (MMW) stiegen signifikant an (HMW:  $0,37 \pm 0,07$  auf  $0,4 \pm 0,08 \text{ µg/ml}$ ,  $p = 0,042$ ; MMW:  $2,3 \pm 0,2$  auf  $2,9 \pm 0,3 \text{ µg/ml}$ ,  $p = 0,007$ ), während die niedrigmolekulare Form sich nicht signifikant veränderte. Das Körpergewicht korrelierte invers mit HMW ( $r = -0,695$ ,  $p = 0,002$ ) und positiv mit LMW ( $r = 0,579$ ,  $p = 0,015$ ). Interessanterweise korrelierten HMW und HDL-Cholesterin stark miteinander. HMW und freie Fettsäuren vor der Gewichtsabnahme sagten ca. 60% der HDL Veränderungen durch die Intervention voraus.

Zusammenfassend führt eine moderate Gewichtsreduktion zu einer relativen Zunahme der HMW/MMW-Fraktion und zu einer Reduktion des LMW-Adiponectin. Zudem scheint sowohl das Gesamt-Adiponectin als auch das HMW-Adiponectin mit dem zirkulierenden HDL-Cholesterin assoziiert zu sein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Adiponectin Oligomere unterschiedliche biologische Funktionen besitzen und eher mit dem Lipid- als dem Glucosestoffwechsel assoziiert sind.

(Literatur: Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, Möhlig M, Pfeiffer AF, Spranger J. Diabetes. 2005 Sep;54(9):2712-9.)

## b) Metabolische Einflussfaktoren des zirkulierenden Gesamt-Adiponectin und der Adiponectin Oligomere

Übergewicht und Insulinresistenz sind assoziiert mit niedrigen Adiponectinspiegeln. Dabei wird Adiponectin nahezu exklusiv im weißen Fettgewebe exprimiert. Die Mechanismen dieses Paradoxon sind nicht eindeutig geklärt. Außerdem ist Übergewicht mit einer Hyperlipidämie assoziiert und die Effekte von freien Fettsäuren (FFA) und Triglyzeriden (TG) auf die Adiponectinspiegel sind bisher nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde der Effekt einer euglykämischen Hyperinsulinämie auf Adiponectin Oligomere bei 23 gesunden Probanden untersucht. In einer Subgruppe von 11 Männern wurden zudem FFA und TG durch eine Lipidinfusion (+ Heparin) über 120 min erhöht. Gesamt-Adiponectin wurde per ELISA bestimmt und die Adiponectin Oligomere durch einen nicht-denaturierenden Westernblot.

Eine akute Hyperinsulinämie resultierte in einer signifikanten Reduktion des Gesamt-Adiponectins von  $8,74 \pm 1,01$  auf  $7,74 \pm 0,98$   $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,004$ ). Hochmolekulares (HMW) Adiponectin veränderte sich nicht ( $0,80 \pm 0,12$  auf  $0,81 \pm 0,14$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,887$ ), jedoch nahmen die mittelmolekularen Adiponectin oligomere (MMW) von  $4,30 \pm 0,51$  auf  $3,78 \pm 0,48$   $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,003$ ) und die niedermolekularen Adiponectin oligomere (LMW) von  $3,63 \pm 0,42$  auf  $3,15 \pm 0,46$   $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,04$ ) ab. Interessanterweise reduzierte eine Lipid-/Heparininfusion auch die Gesamt-Adiponectinspiegel ( $p = 0,001$ ), wobei dies vor allem ein Resultat der reduzierten MMW Adiponectinspiegel ( $p < 0,001$ ) war und die HMW und LMW Oligomere sich nicht signifikant veränderten.

Diese Daten weisen darauf hin, dass sowohl eine akute Hyperinsulinämie als auch eine Hyperlipidämie zu einer Reduzierung der Adiponectinspiegel führen, wobei hierbei vor allem MMW und LMW bzw. nur MMW reduziert werden. Dieses Ergebnis zeigt zum einen erneut die differentielle Regulation der Adiponectin Oligomere und zum anderen eine mögliche pathophysiologische Erklärung der erniedrigten Adiponectinspiegel im Rahmen von Übergewicht bzw. Adipositas.

(Literatur: Acute hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia modify circulating adiponectin and its oligomers. Bobbert T, Weicht J, Mai K, Möhlig M, Pfeiffer AF, Spranger J. Clin Endocrinol (Oxf). 2009 Oct;71(4):507-11.)



c) Glykiertes Hämoglobin ist assoziiert mit der Intima Media Dicke in Personen mit normaler Glucosetoleranz

Der orale Glucosetoleranztest (OGTT) stellte lange Zeit das wesentliche Diagnosekriterium für den Diabetes mellitus Typ 2 dar. Im Besonderen wurden der Nüchternglucosewert und der 2h Wert hierzu verwendet. Jedoch auch der 1h Wert wird als diagnostisches Kriterium diskutiert. In dieser Arbeit werden verschiedenen Werte des OGTT und der HbA1c mit der Intima Media Dicke (IMT) der Arteria carotis communis, die ein Ausdruck des kardiovaskulären Risikos darstellt, assoziiert.

In diese Studie wurden 1219 nichtdiabetischen Probanden (851 Frauen, 368 Männer; 558 Personen mit normalen Glucosestoffwechsel und 661 Personen mit gestörter Nüchternglucose oder gestörter Glucosetoleranz) eingeschlossen. Die IMT wurde beidseits an 3 Stellen der posterioren Arterienwand der A. carotis Communis ( $IMT_{ACC}$ ) und im Bulbus ( $IMT_{Bulbus}$ ) bestimmt. Parameter des OGTT und der HbA1c wurden mit der IMT in Beziehung gesetzt unter Berücksichtigung weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Bauchumfang, Rauchen, systolischer Blutdruck und HDL/Gesamtcholesterin Verhältnis).

Der 1h Wert im OGTT und der HbA1c korrelieren mit der IMT in Personen ohne Typ 2 Diabetes, nicht jedoch die Nüchternglucose und der 2h Wert. Wird jedoch für weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren adjustiert (Alter, Geschlecht, Bauchumfang, Rauchen, systolischer Blutdruck und HDL/Gesamtcholesterin Verhältnis), ist nur noch der HbA1c mit der IMT signifikant assoziiert und erklärt ca. 4,4% der IMT Variabilität. Vergleichbare Resultate finden sich bei Personen mit gestörter Nüchternglucose bzw. gestörter Glucosetoleranz.

HbA1c besitzt im Vergleich zu anderen Parametern des Glucosestoffwechsels die stärkste Assoziation zur IMT bei Personen ohne Typ 2 Diabetes mellitus. Dies unterstützt die These, dass eine blutzuckersenkende Therapie auch im nichtdiabetischen Bereich eine positive Wirkung auf das kardiovaskuläre Risiko besitzt.

(Literatur: A1C is associated with intima-media thickness in individuals with normal glucose tolerance. Bobbert T, Mai K, Fischer-Rosinsky A, Pfeiffer AF, Spranger J. Diabetes Care. 2010 Jan;33(1):203-4.)

d) Beziehung zwischen Retinol, Retinol-binding Protein 4, Transthyretin und der Intima media Dicke

Retinol (Vitamin A) wird im humanen Serum in einem Komplex aus Retinol-binding Protein 4 (RBP4) und Transthyretin (TTR) transportiert. Retinol und RBP4 sind mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z.B. Insulinresistenz, assoziiert, wobei bisher nicht die komplexe Verbindung der einzelnen Komponenten berücksichtigt wurde.

In 96 Probanden wurde neben anthropometrischen Parametern und Laborparametern auch Retinol, RBP4 und TTR bestimmt. RBP4 und TTR wurden mit einem nichtkommerziellen ELISA und Retinol mittels rpHPLC (reverse phase high performance liquid chromatography) bestimmt. Die IMT wurde beidseits an 3 Stellen der posterioren Arterienwand der A. carotis communis (IMT) bestimmt.

Die IMT korrelierte mit RBP4 ( $r = 0,335$ ,  $p < 0,001$ ), Retinol ( $r = -0,241$ ,  $p = 0,043$ ), RBP4/TTR Verhältnis ( $r = 0,254$ ,  $p = 0,025$ ) und Retinol/RBP4 Verhältnis ( $r = -0,549$ ,  $p < 0,001$ ). Die Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI, Blutdruck, HDL/Gesamt Cholesterin Verhältnis, Triglyceride, Diabetes mellitus und Rauchen zeigte, dass nur das Retinol/RBP4 Verhältnis signifikant unabhängig mit der IMT assoziiert ist.

Diese Daten unterstützen die These, dass der Transportkomplex des Vitamin A mit der IMT assoziiert ist. Veränderungen der RBP4 Sättigung mit Retinol könnten daher das Bindeglied zwischen Nierendysfunktion oder Insulinresistenz und Arteriosklerose darstellen.

(Literatur: Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness. Bobbert T, Raila J, Schwarz F, Mai K, Henze A, Pfeiffer AF, Schweigert FJ, Spranger J Atherosclerosis. 2010 Dec;213(2):549-51.)

#### e) FGF-21 und Prädiktion von Typ 2 Diabetes mellitus und Metabolischem Syndrom

FGF-21 ist ein Hepatokin, welches multiple Effekte auf den Glucose- und Fettstoffwechsel besitzt.

Das Ziel der Studie ist es, den prädiktiven Wert von FGF-21 auf die Inzidenz des T2DM und des Metabolischen Syndroms zu bestimmen.

Hierzu wurde eine Follow-up Untersuchung der Studie: „Metabolisches-Syndrom-Berlin-Potsdam“ (MesyBepo) mit aktuell ca. 2000 Teilnehmern initiiert. 440 Teilnehmer der MeSyBepo-Studie, deren Studienteilnahme mindestens 3 Jahre zurücklag, wurden in der Follow-up Untersuchung erneut untersucht. Ein wesentliches Ausschlusskriterium bestand in der Teilnahme an Gewichtsreduktionskursen, da diese den Gewichtsverlauf bzw. auch Therapieverlauf wesentlich beeinflussen können. Das Untersuchungsprogramm in der Follow-up Untersuchung war identisch zu dem der Baseline-Untersuchung und umfasste u.a. neben einer Phänotypisierung einen oralen Glucosetoleranztest. FGF-21 wurde in der Nüchternblutabnahme der Baseline Untersuchung mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (R&D Systems, Minneapolis, US) bestimmt. Es erfolgte eine prospektive Auswertung dieser Probanden hinsichtlich der Inzidenz eines T2DM, eines metabolischen Syndroms nach WHO-Kriterien und eines gestörten Glucosestoffwechsels (IFG: gestörte Nüchtern-glucose, IGT: gestörte Glucosetoleranz und T2DM)

Die mittlere Follow-up Zeit betrug  $5,30 \pm 0,1$  Jahre. 54 Personen entwickelten ein Metabolisches Syndrom, 35 Personen entwickelten einen T2DM und 69 Teilnehmer mit initial unauffälligem Glucosestoffwechsel entwickelten einen gestörten Glucosestoffwechsel (IFG, IGT oder T2DM). FGF-21 hatte einen prädiktiven Einfluss auf die Inzidenz des metabolischen Syndroms (lnFGF-21 OR 2,6 95 % CI 1,5 – 4,5;  $p = 0,001$ ), T2DM (lnFGF-21 OR 2,4 95 % CI 1,2 – 4,7;  $p = 0,01$ ) und die Progression zum gestörten Glucosestoffwechsel (lnFGF-21 OR 2,2 95 % CI 1,3 – 3,6;  $p = 0,002$ ) nach der Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up Zeit. Eine zusätzliche Adjustierung für WHR, systolischen Blutdruck, HDL Cholesterin, Triglyzeride und Nüchtern-glucose führte zu keinen essentiellen Veränderungen an dem prädiktiven Einfluss von FGF-21.

FGF-21 ist somit ein unabhängiger Risikofaktor für das metabolische Syndrom und des T2DM. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hinweisen, dass eine FGF-21 Resistenz der Entstehung des metabolischen Syndroms und des T2DM vorausgehen.

(Literatur: Fibroblast growth factor 21 predicts the metabolic syndrome and type 2 diabetes in Caucasians. Bobbert T, Schwarz F, Fischer-Rosinsky A, Pfeiffer AF, Möhlig M, Mai K, Spranger J. Diabetes Care. 2013 Jan;36(1):145-9.)

### 3) Diskussion

Die Verbesserungen in der Prädiktion des Typ 2 Diabetes (T2DM) und kardiovaskulärer Erkrankungen stellen einen wesentlichen Punkt in der Identifizierung von Hochrisikopatienten dar, um rechtzeitig präventive therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können. Beide Erkrankungen überschneiden sich bezüglich ihrer Ätiologie und ihres Pathomechanismus. Wesentlich Prädiktoren beider Erkrankungen sind Alter, Geschlecht, anthropometrische und metabolische Variablen, sowie sozioökonomischen Faktoren und der recht weit fassbare Begriff des Lebensstils.

Ein wesentlicher Prädiktor für die Genese des T2DM und auch von kardiovaskulären Erkrankungen bzw. von Arteriosklerose sind Glucosewerte (31-34). Hierbei haben sich vor allem die Werte der Nüchtern-glucose und der zwei Stunden Wert im OGTT durchgesetzt und diese dienen auch zur Definition des T2DM (3). Ein weiterer Prädiktor, der ebenfalls den Glucosestoffwechsel repräsentiert, ist der HbA1c, der lange nur als Verlaufsparemeter diente und erst seit kurzem als Diagnosekriterium etabliert wurde (35;36). Die Grenzwerte der jeweiligen Parameter unterliegen einer ständigen Veränderung, die durch aktuelle Studien getragen wird, da physiologische und pathologische Werten oftmals fließend und nicht scharf voneinander abzugrenzen sind und nicht selten ein linearer Zusammenhang zwischen den Parametern und dem kardiovaskulärem Risiko besteht (37-39). So induziert Glucose selbst einen atherogenen Prozeß , z.B. durch erhöhten oxidativen Stress, nichtenzymatischer Glykierung von LDL, anderen Apolipoproteinen oder anderen Faktoren, die die Gefäßwand beeinträchtigen (40-42). Zudem haben gering erhöhte Glucosewerte eine positive prädiktive Aussagekraft über den zukünftigen Anstieg dieser Werte und/oder der Entwicklung einer gestörten Glucosetoleranz oder eines Diabetes mellitus. Außerdem können leicht erhöhte Glucosewerte mit anderen pathologischen Konditionen wie einer Hyperinsulinämie, Bluthochdruck, Hypertriglyceridämie oder viszeraler Adipositas assoziiert sein, die ebenfalls kardiovaskuläre Risikofaktoren darstellen. Davon abgesehen sind die Ursachen für erhöhte Glucosewerte und kardiovaskuläre Erkrankungen häufig die gleichen, wie z.B. genetische Faktoren, niedriges Geburtsgewicht und multiple Umweltfaktoren. Somit besteht ein enger Zusammenhang in der Genese bzw. im Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen und dem T2DM.

Wir konnten zeigen, dass auch bei Personen ohne T2DM der 1h Wert im OGTT und der HbA1c am besten mit der IMT der Arteria carotis communis, als Ausdruck des kardiovaskulären Risikos, korrelieren (43). Dies zeigte sich sowohl für Personen ohne als auch solchen mit gestörter Glucosetoleranz und legte die Vermutung nahe, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Parametern des Glucosestoffwechsels und des kardiovaskulären Risikos besteht und ein Grenzwert zur Definition des T2DM in dieser Hinsicht nur einen beschreibenden Charakter besitzt. Zudem konnten wir zeigen, dass bezüglich der gängigen Parameter der HbA1c die stärkste Assoziation mit dem kardiovaskulären Risiko besitzt, wenn für weitere gängige kardiovaskuläre Risikofaktoren adjustiert wird und somit eine Kontrolle des Glucosestoffwechsels wohl auch im definierten gesunden Bereich

einen Einfluss auf die IMT bzw. das kardiovaskuläre Risiko besitzt. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass konkrete Grenzwerte für die Diagnostik des T2DM zwar eine Vereinfachung, aber nicht unbedingt die pathophysiologische Realität und das damit verbundene kardiovaskuläre Risiko darstellen.

Einen kürzlich entdeckten kardiovaskulären Risikofaktor stellt das Retinol bindende Protein 4 (RBP4) dar, da Studien einen Zusammenhang zwischen RBP4, Insulinresistenz, T2DM und Arteriosklerose zeigen konnten (15;16). Das RBP4 ist ein viszerales Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa und wird vornehmlich in der Leber und in Adipozyten synthetisiert. Die Datenlage bezüglich RBP4 und IMT als Marker kardiovaskulärem Risikos ist dagegen uneinheitlich (44;45). Diese Studien berücksichtigen nicht die komplexe Interaktion des Vitamin A (Retinol) Transportes im humanen Kreislauf. In den Leberzellen gespeichertes Retinol gelangt dann in das Endoplasmatische Retikulum der Hepatocyten und bildet dort einen Komplex mit RBP4, wodurch anschließend der Transport des hydrophoben Retinols im wässrigen Milieu des Blutes ermöglicht wird. An diesen Komplex bindet noch das Transthyretin (TTR), was zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes des Retinol-RBP4-TTR Komplexes führt, so dass eine frühzeitige renale Eliminierung des RBP4 und des Retinols verhindert wird (46). Dieser Komplex wird über den Golgi-Apparat in das Blut ausgeschleust und gelangt über die Zirkulation zu den Zielzellen des Retinols. Dort wird Retinol aufgenommen und der verbliebene Komplex aus RBP4 und TTR löst sich aufgrund der nun nicht mehr vorhandenen Affinität von RBP4 und TTR auf. Während TTR im Blut verbleibt und für weitere Transportvorgänge zur Verfügung steht, wird das freie RBP4 durch sein geringes Molekulargewicht in den Glomeruli der Nieren filtrierte. In den proximalen Tubuli wird RBP4 über Megalin-vermittelte Endocytose in die proximalen Nierenzellen aufgenommen und weiter abgebaut.

In unserer Arbeit konnten wir einen inversen Zusammenhang zwischen Retinol und der IMT zeigen, der den Zusammenhang zwischen Vitamin A und Arteriosklerose bestätigt (47). Zudem konnten wir zeigen, dass vor allem das Verhältnis von Retinol/RBP4 mit IMT assoziiert war, auch nach der Adjustierung für weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren. Dies könnte darauf hindeuten, dass das retinolfreie RBP4 (apo-RBP4) einen wesentlichen Einfluss auf die Genese der Arteriosklerose besitzt.

Für ein erst kürzlich entdecktes Hepatokin, der Fibroblast Growth Factor – 21 (FGF-21), konnte in Querschnittsstudien ein positiver linearer Zusammenhang zu Übergewicht, T2DM und dem Metabolischen Syndrom gezeigt werden (22;48). Trotz dieser epidemiologischen Korrelation sind die pathophysiologischen Effekte von FGF-21 auf den Glucose- und Fettstoffwechsel nicht gut verstanden. Im Besonderen konnte zunächst in Tier- und Zellexperimenten ein Glucose senkender Effekt bzw. eine Verbesserung des Fettstoffwechsels beobachtet werden. In Mausexperimenten konnte die FGF-21 Expression in der Leber durch den Transkriptionsfaktor Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) kontrolliert werden, welcher u.a. durch Fasten aktiviert wird (18;49). Interessanterweise kann die FGF-21 Expression in 3T3-L1 Zellen durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$

induziert werden und somit wie Rosiglitazone zu einer vermehrten GLUT1 Expression führen (17;50). FGF-21 mRNA Expression in der Leber und im Fettgewebe kann allerdings auch durch eine Fettdiät bzw. in Mäusen mit genetisch induziertem Übergewicht gesteigert werden. Stimulation von 3T3-L1 Zellen mit FGF-21 führt zu erhöhten Glycerinspiegeln als Marker einer gesteigerten Lipolyse, wobei in kultivierten humanen Fettzellen FGF-21 einen inhibitorischen Effekt auf die Lipolyse zeigt (18;51). Positive metabolische Effekte auf den Glucose- und Fettstoffwechsel wurden in diabetischen Rhesusaffen gefunden, die 6 Wochen mit FGF-21 behandelt wurden. Neben Glucosespiegeln und Triglyzeriden wurde auch das LDL-Cholesterin gesenkt und das HDL-Cholesterin gesteigert (52).

Diese unterschiedlichen Daten aus Tier- und Zellkulturexperimenten bzw. aus humanen Studien führen zu einer komplexen Sicht auf den FGF-21 Stoffwechsel. In unserer Arbeit konnten wir in einer prospektiven Studie zeigen, dass FGF-21 einen prädiktiven Wert für die Entstehung des metabolischen Syndroms, des T2DM bzw. der Entwicklung eines gestörten Glucosestoffwechsels besitzt (Bobbert et al, Diabetes Care, 2012, in press). Hohe FGF-21 Werte scheinen somit mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines metabolischen Syndroms oder eines T2DM einherzugehen bzw. diesen Erkrankungen vorauszugehen. Vergleichbar zu einer Insulinresistenz könnten dabei die erhöhten FGF-21 Werte Ausdruck einer „FGF-21 Resistenz“ sein.

Vor dem Hintergrund der dringenden Notwendigkeit, Biomarker für die Entwicklung des T2DM zu finden, sind die Daten zu FGF-21 von hohem Interesse. Der klinische Nutzen dieser Daten muss jedoch gründlich abgewogen werden. Obwohl wir in unserer Arbeit FGF-21 als unabhängigen Risikofaktor identifizieren konnten, war der additive Nutzen zu bekannten und etablierten Risikofaktoren (wie z.B. Alter, Geschlecht, Zeitverlauf) nur von geringer Bedeutung.

Ein weiterer Prädiktor des T2DM ist das Adipozytokin Adiponectin. Dieses unterscheidet sich von anderen Adipozytokinen in zwei wesentlichen Punkten. Zum einen ist es ein protektiver Faktor bzgl. des T2DM und zum anderen ist der Adiponectinspiegel einer Person umso höher, je weniger Fettmasse vorhanden ist (53). Dabei ist zu berücksichtigen, dass Adiponectin im Plasma sowohl als Trimer, als Hexamer oder als hochmolekulares Multimer vorliegen kann, und diese verschiedenen Multimere unterschiedliche Funktionen besitzen. So können z.B. LMW Oligomere in Monozyten und Makrophagen eine lipopolysachharid-vermittelte IL-6 Freisetzung inhibieren und eine Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 Zytokins bewirken, während HMW-Adiponectin eine IL-6 Sekretion in Monozyten selbst auslösen kann (54). In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass v. a. das hochmolekulare Multimer mit den protektiven Eigenschaften des Adiponectin bei Insulinresistenz assoziiert ist. Für Adiponectin konnte sowohl in Tierexperimenten als auch in humanen Studien gezeigt werden, dass es ein Zytokin mit insulinsensitivierenden Eigenschaften ist, welches dazu wohl antiinflammatorische, antiapoptotische und proangiogene Eigenschaften besitzt, wobei die Wirkmechanismen hierzu noch weitestgehend unbekannt sind. Eine Hypoadiponectinämie kann in vielen metabolischen Erkrankungen trotz Adjustierung für den BMI gefunden werden wie, z.B. beim

T2DM, einer Lipodystrophie, der nichtalkoholischen Steatosis hepatis oder beim arteriellen Bluthochdruck (55;56). Personen mit genetisch induzierter Hypoadiponectinämie besitzen zudem ein weit höhere Wahrscheinlichkeit, an den Komponenten des metabolischen Syndroms zu erkranken (57).

Eine wesentliche Fragestellung ist, inwieweit niedrige Adiponectinspiegel Ursache oder Resultat von Übergewicht und Insulinresistenz sind. Tierexperimente legen die Vermutung nahe, dass niedrige Adiponectinspiegel durch Übergewicht und Insulinresistenz des Fettgewebes induziert werden, aber dass Adiponectin ein Mediator des Übergewichtes und der Insulinresistenz in anderen Geweben, wie z.B. Muskel oder Leber, darstellt (58;59). Humane Beobachtungsstudien unterstützen diese These. Genetische Varianten des Adiponectingens sind durchaus mit Übergewicht und Insulinresistenz assoziiert, jedoch nur schwach und z.B. weit weniger ausgeprägt als dies z.B. für Leptin gezeigt werden konnte (60;61). So konnte u.a. auch noch keine Mutation des Adiponectingens mit morbidem Adipositas in Verbindung gebracht werden. Weiterhin konnte in einer prospektiven Studie kein Zusammenhang zwischen einer Hypoadiponectinämie und der Entwicklung von Übergewicht nachgewiesen werden (62). Jedoch konnte gezeigt werden, dass Adiponectin einen Prädiktor des T2DM darstellt, und wir konnten zudem nachweisen, dass eine Gewichtsreduktion zu einer Verbesserung der Insulinresistenz und Erhöhung der Adiponectinspiegel führen kann. Diese Daten legen nahe, dass die niedrigen Adiponectinspiegel durch Übergewicht und Insulinresistenz induziert werden und auch hier Adiponectin eher ein Mediator dieser Effekte für periphere Gewebe darstellt (14;63).

Eine wesentliche Bedeutung in der Vermittlung der Wirkung von Adiponectin kommt dabei den unterschiedlichen Adiponectin Multimeren zu (53). In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass vor allem die hochmolekularen Multimere mit den positiven metabolischen Effekten assoziiert sind. So ist das HMW-Adiponectin sowohl mit der Verbesserung der Insulinsensitivität als auch mit dem Anstieg des HDL-Cholesterin assoziiert. Es zeigte sich, dass es sowohl bei moderatem Gewichtsverlust im Rahmen einer Lifestylemodifikation als auch bei massivem Gewichtsverlust im Rahmen der bariatrischen Chirurgie zu einer Verschiebung der Multimere kommt (64;65). Inwieweit diese Veränderungen funktionelle Relevanz haben, muss noch in tierexperimentellen Studien geklärt werden. Dass eine Verbesserung der Insulinsensitivität nicht generell durch Adiponectin vermittelt wird, konnten wir zeigen, indem wir eine Verbesserung der Insulinsensitivität durch akute körperliche Aktivität und durch regelmäßiges Training induzierten (66). Dabei zeigte sich keine signifikante Veränderung des Gesamt-Adiponectins bzw. der Adiponectin Oligomere. Dies zeigte sich in Übereinstimmung mit anderen Studien, wobei eine Veränderung der Gesamt-Adiponectinspiegel bei extrem hohen körperlichen Belastungen scheinbar durchaus induziert werden kann (67).

Eine direkte Regulation der Adiponectin Komposition durch Insulin konnten wir in einer weiteren Studie zeigen, bei der die Veränderungen im Rahmen eines hyperinsulinämischen euglykämischen

Clamp untersucht wurden. Unter kontinuierlicher Insulininfusion kommt es zu einer Abnahme des Gesamt-Adiponectins, welcher vor allem durch eine Abnahme der MMW und LMW Oligomere verursacht wird. Interessanterweise konnte dies ebenfalls durch eine Erhöhung der freien Fettsäuren und der Triglyceride erreicht werden, wobei es hier vor allem zu einer Erniedrigung der MMW Oligomere kommt (68).

Wir konnten ebenso wie andere Arbeitsgruppen zeigen, dass HDL-Cholesterin unabhängig von der Insulinsensitivität mit Adiponectin-Spiegeln, insbesondere mit hochmolekularen Adiponectin Oligomeren, assoziiert ist (66). HDL-Cholesterin wird im Allgemeinen aus lipidfreiem Apolipoprotein A-I oder lipidarmen pre-beta1-HDL Vorläufern generiert. Diese Vorläufer werden teilweise in der Leber produziert und könnten somit durch Adiponectin Oligomere beeinflusst werden (69). Auf molekularer Ebene vermittelt Adiponectin seine Effekte über die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2. Diese Rezeptoren gehören zur Klasse I der PAQR (Progestin und AdipoQ Rezeptor) Familie, die sich durch homologe invariante intrazelluläre Aminosäuren auszeichnet. Die Aktivierung beider Rezeptoren führt zu ähnlichen Effekten, die über ERK 1/2 vermittelt werden. Trotzdem besitzen beide Rezeptoren auch unabhängige Kaskaden. So wird über AdipoR1 vor allem die AMP-Kinase aktiviert, während AdipoR2 vor allem zu der Aktivierung von PPAR  $\alpha$  führt (70).

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit verschiedene neue Biomarker (FGF-21, Adiponectin) bezüglich des Glucose- und Lipidstoffwechsels evaluiert. Zudem sind etablierte Parameter des Glucosestoffwechsels (HbA1c, Glucosewerte im oralen Glucosetoleranztest) als auch RBP4 bezüglich des kardiovaskulären Risikos validiert worden. Diese Resultate können Ansätze bieten, um in Zukunft eine bessere Prognose und frühzeitigere Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko, an einem T2DM zu erkranken, bzw. mit hohem kardiovaskulärem Risiko zu ermöglichen.



#### 4) Zusammenfassung

Die Inzidenz des Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist weltweit steigend und eine wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Folgeerkrankungen. Die multifaktorielle Genese des Typ 2 Diabetes mellitus führt zu der Schwierigkeit einer frühzeitigen Identifizierung von Personen mit einem hohen Erkrankungsrisiko. Somit sind Biomarker in der präventiven Diagnostik des T2DM als auch von kardiovaskulären Erkrankungen von wesentlicher Bedeutung. Im Vordergrund stehen dabei natürlich bekannte Parameter wie Nüchternnglucose, Parameter des oralen Glucosetoleranztestes oder der HbA1c.

In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass sowohl der 1h Wert im OGTT als auch der HbA1c mit dem kardiovaskulären Risiko, hier in der Bestimmung der Intima Media Dicke (IMT) ausgedrückt, korrelieren. Jedoch korreliert nur der HbA1c Wert weiterhin signifikant mit der IMT nach der Adjustierung für weitere bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren. Neben diesen etablierten Parametern besitzen jedoch auch primär nicht mit dem Glucosestoffwechsel assoziierte Metabolite einen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko. So konnten wir auch den unterschiedlichen Einfluss von Retinol, Retinol bindendem Protein 4 (RBP4) und Transthyretin auf die Intima Media Dicke darstellen. Dabei ist interessanterweise festzustellen, dass v.a. das Verhältnis von Retinol/RBP4 mit der IMT korreliert, selbst nach der Adjustierung für gängige kardiovaskuläre Risikofaktoren.

Bezüglich der Genese des Typ 2 Diabetes mellitus konnten wir durch eine Follow-up Untersuchung der Studie: „Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam“ zudem erste prospektive Aussagen treffen. So zeigte es sich, dass das Hepatokin FGF-21 (Fibroblast Growth Faktor 21) einen signifikanten Einfluss auf die Inzidenz des T2DM und des Metabolischen Syndroms besitzt, auch wenn dieser relativ gering gegenüber etablierten Risikofaktoren erscheint. Interessanterweise scheinen erhöhte FGF-21 Spiegel dabei mit einer erhöhten Inzidenz des T2DM und des Metabolischen Syndroms einherzugehen, da aus experimentellen Untersuchungen eher ein glucosesenkender Effekt von FGF-21 erwartet wurde. Ähnlich dem Modell der Insulinresistenz könnte somit auch eine FGF-21 Resistenz ein frühes Anzeichen für die Entwicklung einer Störung im Glucose- und Lipidstoffwechsel darstellen.

Ein bereits bekannter Risikofaktor des T2DM ist das Körpergewicht, wobei die Interaktion von Gewicht bzw. Fettgewebe und Glucose- und Lipidstoffwechsel Gegenstand aktueller Forschung ist. In unseren Arbeiten konnten wir den Einfluss einer Gewichtsreduktion Adiponectin und seiner Isoformen zeigen. Dabei kam es bei einem Gewichtsverlust zu einem Anstieg des Adiponectins, welches v.a. durch die hochmolekularen Adiponectin Oligomere bedingt war. Diese Beobachtung fügte sich gut in das Bild, welches wir in weiteren Untersuchungen zum Zusammenhang von Adiponectin Oligomeren und dem Glucose- und Lipidstoffwechsel feststellten. So kam es sowohl durch Insulin- als auch durch Lipidgabe zu einem Abfall der Adiponectinspiegel, wobei dafür anscheinend der Abfall der eher höhermolekularen Isoformen des Adiponectins verantwortlich war. Somit stützen unsere Daten die These, dass am ehesten die hochmolekularen Isoformen des Adiponectins für die Vermittlung der positiven bzw. protektiven Eigenschaften des Adiponectins verantwortlich sind.

## 5) Literaturverzeichnis

- (1) Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87(1):4-14.
- (2) Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414(6865):782-787.
- (3) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011; 34 Suppl 1:S62-S69.
- (4) Gomez-Perez FJ, guilar-Salinas CA, meda-Valdes P, Cuevas-Ramos D, Lerman G, I, Rull JA. HbA1c for the diagnosis of diabetes mellitus in a developing country. A position article. *Arch Med Res* 2010; 41(4):302-308.
- (5) International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(7):1327-1334.
- (6) Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999; 22(2):233-240.
- (7) Viberti G. A glycemic threshold for diabetic complications? *N Engl J Med* 1995; 332(19):1293-1294.
- (8) Andersson DK, Svardsudd K. Long-term glycemic control relates to mortality in type II diabetes. *Diabetes Care* 1995; 18(12):1534-1543.
- (9) Wilson PW, Cupples LA, Kannel WB. Is hyperglycemia associated with cardiovascular disease? The Framingham Study. *Am Heart J* 1991; 121(2 Pt 1):586-590.
- (10) Balkau B, Shipley M, Jarrett RJ et al. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged nondiabetic men. 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study. *Diabetes Care* 1998; 21(3):360-367.
- (11) Spranger J, Kroke A, Mohlig M et al. 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):812-817.
- (12) Spranger J, Kroke A, Mohlig M et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003; 361(9353):226-228.
- (13) Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291(14):1730-1737.
- (14) Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360(9326):57-58.
- (15) Yang Q, Graham TE, Mody N et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436(7049):356-362.
- (16) Graham TE, Yang Q, Bluher M et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006; 354(24):2552-2563.
- (17) Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1627-1635.

- (18) Inagaki T, Dutchak P, Zhao G et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007; 5(6):415-425.
- (19) Kharitonov A, Dunbar JD, Bina HA et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol* 2008; 215(1):1-7.
- (20) Chavez AO, Molina-Carrion M, bdul-Ghani MA, Folli F, DeFronzo RA, Tripathy D. Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care* 2009; 32(8):1542-1546.
- (21) Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z et al. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(3):369-375.
- (22) Zhang X, Yeung DC, Karpisek M et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008; 57(5):1246-1253.
- (23) Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(5):1245-1249.
- (24) Chambless LE, Heiss G, Folsom AR et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997; 146(6):483-494.
- (25) Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115(4):459-467.
- (26) Lundby-Christensen L, Almdal TP, Carstensen B, Tarnow L, Wiinberg N. Carotid intima-media thickness in individuals with and without type 2 diabetes: a reproducibility study. *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9:40.
- (27) Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. *Stroke* 1997; 28(3):665-671.
- (28) Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S et al. Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis* 2004; 18(4):346-349.
- (29) Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23(1):75-80.
- (30) Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P et al. Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study. *Stroke* 1999; 30(4):841-850.
- (31) bdul-Ghani MA, Lyssenko V, Tuomi T, DeFronzo RA, Groop L. Fasting versus postload plasma glucose concentration and the risk for future type 2 diabetes: results from the Botnia Study. *Diabetes Care* 2009; 32(2):281-286.
- (32) Aroda VR, Ratner R. Approach to the patient with prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9):3259-3265.

- (33) Hsueh WA, Orloski L, Wyne K. Prediabetes: the importance of early identification and intervention. *Postgrad Med* 2010; 122(4):129-143.
- (34) Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl:S65-S73.
- (35) Peter A, Fritsche A, Stefan N, Heni M, Haring HU, Schleicher E. Diagnostic value of hemoglobin A1c for type 2 diabetes mellitus in a population at risk. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; 119(4):234-237.
- (36) Bonora E, Kiechl S, Mayr A et al. High-normal HbA1c is a strong predictor of type 2 diabetes in the general population. *Diabetes Care* 2011; 34(4):1038-1040.
- (37) bdul-Ghani MA, Williams K, DeFronzo R, Stern M. Risk of progression to type 2 diabetes based on relationship between postload plasma glucose and fasting plasma glucose. *Diabetes Care* 2006; 29(7):1613-1618.
- (38) Gerstein HC, Yusuf S. Dysglycaemia and risk of cardiovascular disease. *Lancet* 1996; 347(9006):949-950.
- (39) Gerstein HC. Glucose: a continuous risk factor for cardiovascular disease. *Diabet Med* 1997; 14 Suppl 3:S25-S31.
- (40) Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40(4):405-412.
- (41) Lyons TJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 1992; 41 Suppl 2:67-73.
- (42) Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992; 15(12):1835-1843.
- (43) Bobbert T, Mai K, Fischer-Rosinsky A, Pfeiffer AF, Spranger J. A1C is associated with intima-media thickness in individuals with normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2010; 33(1):203-204.
- (44) Solini A, Santini E, Madec S, Rossi C, Muscelli E. Retinol-binding protein-4 in women with untreated essential hypertension. *Am J Hypertens* 2009; 22(9):1001-1006.
- (45) Ingelsson E, Lind L. Circulating retinol-binding protein 4 and subclinical cardiovascular disease in the elderly. *Diabetes Care* 2009; 32(4):733-735.
- (46) Zanotti G, Berni R. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 2004; 69:271-295.
- (47) Bobbert T, Raila J, Schwarz F et al. Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness. *Atherosclerosis* 2010; 213(2):549-551.
- (48) Li L, Yang G, Ning H, Yang M, Liu H, Chen W. Plasma FGF-21 levels in type 2 diabetic patients with ketosis. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 82(2):209-213.
- (49) Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 2007; 5(6):426-437.

- (50) Moyers JS, Shiyanova TL, Mehrbod F et al. Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J Cell Physiol* 2007; 210(1):1-6.
- (51) Arner P, Pettersson A, Mitchell PJ, Dunbar JD, Kharitononkov A, Ryden M. FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett* 2008; 582(12):1725-1730.
- (52) Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007; 148(2):774-781.
- (53) Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316(2):129-139.
- (54) Neumeier M, Weigert J, Schaffler A et al. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol* 2006; 79(4):803-808.
- (55) Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144(9):3765-3773.
- (56) Landskroner-Eiger S, Qian B, Muise ES et al. Proangiogenic contribution of adiponectin toward mammary tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10):3265-3276.
- (57) Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y et al. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002; 51(7):2325-2328.
- (58) Li FY, Cheng KK, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 203(1):167-180.
- (59) Lu JY, Huang KC, Chang LC et al. Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond. *J Biomed Sci* 2008; 15(5):565-576.
- (60) Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev* 2006; 27(7):710-718.
- (61) Dastani Z, Hivert MF, Timpson N et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet* 2012; 8(3):e1002607.
- (62) Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS et al. Low plasma adiponectin concentrations do not predict weight gain in humans. *Diabetes* 2002; 51(10):2964-2967.
- (63) Yang WS, Lee WJ, Funahashi T et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8):3815-3819.
- (64) Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U et al. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes* 2005; 54(9):2712-2719.
- (65) Engl J, Bobbert T, Ciardi C et al. Effects of pronounced weight loss on adiponectin oligomer composition and metabolic parameters. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15(5):1172-1178.
- (66) Bobbert T, Wegewitz U, Brechtel L et al. Adiponectin oligomers in human serum during acute and chronic exercise: relation to lipid metabolism and insulin sensitivity. *Int J Sports Med* 2007; 28(1):1-8.

- (67) Jurimae J, Purge P, Jurimae T. Adiponectin is altered after maximal exercise in highly trained male rowers. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93(4):502-505.
- (68) Bobbert T, Weicht J, Mai K, Mohlig M, Pfeiffer AF, Spranger J. Acute hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia modify circulating adiponectin and its oligomers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(4):507-511.
- (69) Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 2002; 277(33):29359-29362.
- (70) Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. *FEBS Lett* 2010; 584(20):4280-4286.

## 6) Danksagung

Danken möchte ich zunächst vor allem Herrn Prof. Dr. Spranger für die langjährige wissenschaftliche Begleitung und seine stetige Unterstützung und Motivation. Die Arbeit der letzten Jahre wäre ohne seine Unterstützung nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Pfeiffer, der mir den Einstieg in die Endokrinologie ermöglichte und wissenschaftlich und medizinisch den Weg wies.

Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Möhlig, PD Dr. Diederich und Dr. Rochlitz bedanken, die mich nicht nur wissenschaftlich begleitet haben, sondern mir auch im medizinischen Alltag Vorbilder waren.

Last but not least ein spezieller Dank an Dr. Mai. Die generalstabsmäßige Planung und Durchführung vieler Projekte wäre ohne die gute Zusammenarbeit mit ihm nicht möglich gewesen.

Ich möchte auch allen Mitarbeitern der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin und der Abteilung Klinische Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung danken, die bei den Experimenten mitgearbeitet haben.

Ganz besonders danken möchte ich aber meinen Eltern, meinem Bruder und Grit für die geduldige Nachsicht und die große Unterstützung.

## 7) Erklärung

### Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungen gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

(Datum)

(Unterschrift)