

Aus dem Deutsches Diabetes-Zentrum
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institut für Klinische Diabetologie

Direktor: Prof. Dr. Michael Roden

Beeinträchtigung des Insulinsignalweges bei Lipid-
induzierter Insulinresistenz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Brockmann

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Roden

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Guthoff

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Maria Fritsch, Chrysi Koliaki, Roshan Livingstone, Esther Phielix, Alessandra Bierwagen, Markus Meisinger, Tomas Jelenik, Stefanie Zimmermann, **Katharina Brockmann**, Jong-Hee Hwang, Julia Szendroedi und Michael Roden: Time course of postprandial hepatic phosphorus metabolites in lean, obese and type 2 diabetes patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2015. **102**(5):p1051-8.

Julia Szendroedi, Toru Yoshimura, Esther Phielix, Chrysi Koliaki, Mellissa Marcucci, Dongyan Zhang, Tomas Jelenik, Janette Müller, Christian Herder, Peter Nowotny, Gerald I. Shulman und Michael Roden: Role of diacylglycerol activation of p θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:9597-9602 IF: 9.81

I. Zusammenfassung

Insulinresistenz ist der wesentliche Risikofaktor für kardiovaskuläre Mortalität bei Adipositas und Typ-2 Diabetes (T2DM). Die zellulären Mechanismen der Insulinresistenz und insbesondere die Rolle der erhöhten Lipidmetabolite im Skelettmuskel sind noch nicht gänzlich geklärt. Wir testeten die Hypothese, dass (i) Lipidinfusion bei gesunden Probanden durch myozelluläre Diacylglycerole (DAG) vermittelte Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) den Insulinsignalweg hemmen und (ii) dieser Mechanismus auch bei insulinresistenten Adipösen und Patienten mit T2DM aktiviert ist, während (iii) intramyozelluläre Triglyzeride (IMCL) eine untergeordnete Rolle spielen. Untersucht wurden 36 gesunde Probanden (CON) mit akuter Lipid-induzierter Insulinresistenz und 10 adipöse Patienten mit T2DM sowie 10 junge, glukosetolerante Probanden von gleichem Body-Mass-Index (BMI) (OBE). Wir bestimmten myozelluläre Lipidmetabolite (DAG, Ceramide, Acylcarnitine, IMCL), Lipidperoxide als Maß für oxidativen Stress im Plasma sowie die Insulinsensitivität in allen drei Gruppen. In CON untersuchten wir den Effekt einer Lipidinfusion auf den Insulinsignalweg, in OBE und T2DM untersuchten wir die Hemmung des Insulinsignalweges in Skelettmuskelbiopsien vor und während hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamps. In 10 CON, 10 OBE sowie 10 T2DM bestimmten wir IMCL des Wadenmuskels mittels in vivo Protonen-Magnetresonanzspektroskopie. T2DM hatten den höchsten IMCL-Gehalt, verglichen mit CON und OBE, deren IMCL sich nicht unterschieden. Erhöhte Konzentrationen von DAG und Aktivierung der PKC θ -Isoform sind sowohl mit der Hemmung des Insulinsignalweges bei Lipidinfusion in CON als auch mit chronischer Insulinresistenz in OBE und T2DM assoziiert. DAG mit C18:0, C18:1 oder C18:2 und zusätzlich C16:0 und C20:4 Acylresten korrelierten in CON mit der Hemmung des proximalen Insulinsignalweges über PKC θ -vermittelte Serin-Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates (IRS). Auch bei T2DM zeigte sich eine Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS. Während Ceramide, Acylcarnitine und Adipozytokine nicht mit Insulinresistenz assoziiert waren, waren Lipidperoxide bei T2DM erhöht. IMCL sind nur bei manifestem T2DM mit chronischer Insulinresistenz, Adipositas und oxidativem Stress assoziiert, während DAG auch bei OBE und akuter Insulinresistenz in CON assoziiert sind. In Zusammenfassung, scheinen IMCL die chronische Steigerung des intramyozellulären Lipidpools anzuzeigen. Außerdem könnte

DAG-assoziierte PKC θ Aktivierung einen neuen therapeutischen Angriffspunkt zur Therapie der muskulären Insulinresistenz darstellen.

II. Abkürzungen

Abb.	Abbildung		(Fatty acid binding protein)
ADP	Adenosindiphosphat	FATP	Fettsäuretransportprotein (fatty acid transport protein)
ATGL	Adipozyten Triglyzerid Lipase	fATP	ATP-Synthase-flux
Akt	Aktin	FFS	Freie Fettsäuren
ATP	Adenosintriphosphat	G6P	Glukose-6-Phosphat
BMI	Body-Mass-Index	GCMS	Gaschromatographie- Massenspektrometrie
BG	Blutglukose	GINF	Glukose-Infusionsrate
β-Ox	β-Oxidation	GLUT 4	Glukosetransporter 4
CoA	Koenzyme A	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-Ethansulfonsäure
CPT1	Carnitin – palmitoyltransferase1	HOT- GINF	Glukose- Infusion mit deuterierter Glukose
CON	Kontrollgruppe	HSL	Hormonsensitive Lipase
CRP	C-reaktives Protein	IL6	Interleukin 6
DAG	Diacylglyzerol	IMCL	Intramyozelluläre Lipide
DDZ	Deutsches Diabetes Zentrum (German Diabetes Center)	IRS	Insulin Rezeptor Substrat
DGAT	Diacylglyzerol Acyltransferase	LCFA	long chain fatty acids
EDTA	Ethylendiamintetraazetat	NFκB	nuclear factor κ-light-chain- enhancer of activated B-cells
EGP	endogene Glukoseproduktion	OBE	adipöse Probandengruppe
FABP	Fettsäurebindungsprotein		

oGTT	oraler Glukose Toleranz Test	SSW	Schwangerschaftswoche
PI3 K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
PKC	Proteinkinase C	T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor	TCA	Trikarbonsäurezyklus
Px	Phosphorylierung	TAG	Triglyzeride
RBP4	Retinol-bindendes Protein 4	TLR4	Toll-like-Rezeptor-4
ROS	reaktive Sauerstoffspezies	VO₂max	maximale oxidative Kapazität
RQ	respiratorischer Quotient	WHO	World Health Organisation
RR	Riva Rocci		
SCD1	Stearoyl- CoA Desaturase 1		
Ser	Serin		

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Übergewicht und Adipositas	2
1.1.1 Body-Mass-Index	2
1.1.2 Morbidität und Mortalität durch Übergewicht und Adipositas	3
1.2 Diabetes mellitus.....	3
1.2.1 Diabetes mellitus Typ 1	5
1.2.2 Diabetes mellitus Typ 2	5
1.2.3 Diabetes mellitus Typ 3	5
1.2.4 Diabetes mellitus Typ 4	7
1.2.5 Morbidität und Mortalität durch Diabetes mellitus.....	7
1.3 Physiologische Insulineffekte	8
1.4 Mechanismen der Insulinresistenz des Skelettmuskels	9
1.4.1 Hemmung des Insulinsignalweges	10
1.4.2 Anstieg von IMCL.....	11
1.4.3 Subklinische Inflammation	12
1.4.4 Oxidativer Stress.....	12
2. Hypothesen und Ziele	13
3. Methoden.....	14
3.1 Probanden	14
3.1.1 Screening	14
3.2 Studienprotokolle.....	16
3.2.1 Studienprotokoll 1.....	19
3.2.2 Studienprotokoll 2.....	21
3.2.3 Insulinsensitivität.....	21
3.2.4 Baecke Index.....	22
3.2.5 Blutproben.....	22
3.2.6 Analytik.....	22
3.2.7 Analysen der Skelettmuskelbiopsieproben.....	23
3.2.8 In-vivo-Messung des Triglyzeridgehalts im Muskel.....	24
3.3 Berechnungen und Statistik	25

3.4	Arbeitsplatz.....	25
4.	Ergebnisse	26
4.1	Anthropometrische Daten	26
4.2	Glukoseaufnahme, Energieverbrauch und Substrat-Oxidation	27
4.3	Myozelluläre Lipid- Metabolite	27
4.4	Korrelationsanalysen	31
4.5	Die Hemmung des Insulinsignalweges	31
4.6	In-vivo-Messung von IMCL	33
5.	Diskussion.....	35
5.1	DAG und PKC Isoformen in den unterschiedlichen Probandengruppen	35
5.2	Hemmung des Insulin-Signalweges	37
5.3	Alternative Ursachen der Insulinresistenz.....	39
5.4	Die Rolle der IMCL	40
6.	Schlussfolgerung	42
7.	Literatur und Quellenverzeichnis	43
	Danksagung.....	49
	Eidesstattliche Versicherung.....	51

1. Einleitung

Übergewicht und Adipositas sind weltweit ein wachsendes Problem. Im Jahr 2008 galten mehr als 1,5 Milliarden der über 20-jährigen Erwachsenen als übergewichtig [1]. Schätzungen gehen davon aus, dass diese Zahl im Jahr 2015 auf ca. 2-3 Milliarden Erwachsene ansteigen wird [2]. Etwa 65% der Weltpopulation lebt mittlerweile in Ländern, in denen nicht Untergewicht sondern Übergewicht ein führendes Gesundheitsproblem darstellt [3].

Erhöhte Verfügbarkeit von Lipiden kann zu einer Akkumulation von Lipidmetaboliten in der Leber und der Skelettmuskulatur führen [4]. Diese ektope Akkumulation von Lipidmetaboliten verursacht Insulinresistenz und eine Schädigung der Zelle über Prozesse, die als Lipotoxizität zusammengefasst werden [5, 6].

Die Skelettmuskulatur hat den größten Anteil am Energiestoffwechsel und insbesondere an der Glukoseoxidation des Gesamtkörpers. Störungen des Glukosestoffwechsels, welche in verminderter Glukoseaufnahme des Skelettmuskels resultieren, sind daher durch Messung der Gesamtkörperglukoseaufnahme erfassbar.

Werden dem Organismus entweder zu viele Lipid zugeführt, oder versucht die Zelle, bei geschädigter Glukoseaufnahme, ihren Energiebedarf durch erhöhten Lipidmetabolismus zu decken, kann dies zur gesteigerten Produktion von freien Radikalen, welche wiederum die Mitochondrien schädigen, führen [7]. Eine Störung der Plastizität und eine Reduktion der maximal oxidativen Kapazität myozellulärer Mitochondrien ist assoziiert mit Zellalterung, gesteigertem myozellulärem Triglyzeridgehalt (IMCL) und muskulärer Insulinresistenz [8-11]. Darüber hinaus könnte erniedrigte oder unvollständige Lipidoxidation die Akkumulation schädlicher Lipidmetabolite fördern. Eine positive Korrelation zwischen IMCL und (muskulärer) Insulinresistenz gilt als gesichert [12]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt, obwohl die Insulinresistenz der wichtigste Faktor für die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist [13]. Die Klärung der Pathogenese der muskulären Insulinresistenz ist die zentrale Fragestellung dieser Dissertation.

Einleitung

1.1 Übergewicht und Adipositas

1.1.1 Body-Mass-Index

Der Body-Mass-Index (BMI: Körpergewicht (kg)/[Körpergröße (m²)])) oder Quetelet-Index, wie er früher genannt wurde, ist ein Maß, um den Ernährungsstatus erwachsener Menschen einschätzen zu können [14]. Der BMI ist leicht zu berechnen und bietet so eine schnelle Möglichkeit, gesundheitliche Risiken einer Person zu ermitteln. Adolph Quetelet entwickelte den BMI im 19. Jahrhundert [15]. In den 1970er Jahren gewann er zunehmend an Bedeutung, da er den Zusammenhang von gesundheitlichen Problemen und Übergewicht bzw. Adipositas in Zahlenwerten ausdrücken konnte [16].

Übergewicht ist nach der World Health Organisation (WHO) definiert als ein BMI von 25-30 kg/m². Steigt der BMI über 30 kg/m², spricht man bei den betroffenen Personen von Adipositas. Tabelle 1 zeigt die internationale Einteilung von Unter-, Normal- und Übergewicht nach BMI für Erwachsene [14, 17, 18].

Klassifikation	BMI
Untergewicht	<18.5 kg/m ²
Normalgewicht	18.5- 24.9 kg/m ²
Übergewicht	≥25.0 kg/m ² - 29.9 kg/m ²
Adipositas Grad I	30.0-34.9 kg/m ²
Adipositas Grad II	35.0- 39.9 kg/m ²
Adipositas Grad III	≥40.0 kg/m ²

Tabelle 1. Klassifikation von Übergewicht und Adipositas nach Body-Mass-Index (BMI) durch die WHO. Auf der linken Seite findet sich die Einteilung von Untergewicht bis zur Adipositas Grad III, auf der rechten Seite die entsprechenden BMI-Werte, welche sich aus der Formel: Körpergewicht (kg)/ Körperlänge (m²) errechnen. Nach der internationalen Klassifikation von Normal-, Unter- und Übergewicht bei Erwachsenen nach der WHO [14, 17, 18].

Heute sind ca. 30% der Weltbevölkerung von Übergewicht oder Adipositas betroffen. Im Jahr 1980 waren lediglich ca. 857 Millionen Menschen übergewichtig oder adipös; ihre Zahl hat sich seither verdoppelt und wird auch in Zukunft steigen [2, 19]. Bedingt durch die verbesserte Ernährungssituation und die geringere körperliche Aktivität ist auch das vermehrte Auftreten von Insulinresistenz und T2DM festzustellen. Unter allen an Diabetes erkrankten Menschen, welche sich im Jahr 2015 auf ca. 415 Millionen beziffern ließen,

Einleitung

leiden 87%-91% an T2DM. Die Zahlen werden weiter steigen, so dass für das Jahr 2040 ca. 642 Millionen Erkrankte erwartet werden [20].

1.1.2 Morbidität und Mortalität durch Übergewicht und Adipositas

Gesundheitssysteme bekommen weltweit die höheren Kosten durch Übergewicht und Begleiterkrankungen zu spüren. In den USA schätzte man diese auf ca. 147 Billionen USD im Jahr 2008 – im Jahr 2009 sogar auf 190 Billionen USD. In den letzten 12 Jahren blieben die Zahlen der als übergewichtig geltenden Erwachsenen und Kinder relativ konstant. Ein leichter Anstieg ließ sich in den Jahren 2009-2010 verzeichnen. 35,5% der Männer und 35,8% der Frauen waren zu dieser Zeit übergewichtig. Alles in allem ist dieser Anstieg weder bei Frauen, Männern, Kindern noch bei Jugendlichen signifikant erhöht verglichen mit den Jahren 2003-2008 [21, 22]. Trotzdem können rund ein Fünftel aller Todesfälle in den westlichen Ländern mit Übergewicht und Adipositas in Verbindung gebracht werden. Die Mortalitätsrate liegt um das 6-12-Fache höher als bei normalgewichtigen Personen [2, 23]. Andererseits scheinen übergewichtige Menschen, die über gute körperliche Fitness verfügen, weniger häufig unter kardiovaskulären Erkrankungen zu leiden als Normalgewichtige mit geringer körperlicher Fitness. Dies ist zum Teil durch eine Verbesserung der Insulinsensitivität durch körperliche Aktivität zu erklären [24]. Die Morbidität und Mortalität ist also nicht allein vom Gewicht abhängig. Übergewicht und Adipositas sind jedoch häufig sowohl mit Insulinresistenz, Dyslipidämie, T2DM, kardiovaskulären-, Gelenk- und Knochenerkrankungen als auch mit Karzinomen (Brust, Kolon, Endometrium) assoziiert [2].

Im Jahr 2000 veröffentlichte die WHO eine Einschätzung der Gesundheitsrisiken und Krankheiten, deren Auftreten bei Menschen mit Adipositas erhöht sein kann. Nach dieser Auswertung scheint das Risiko für Insulinresistenz, T2DM, Dyslipidämie, Cholezystolithiasis und Schlafapnoe um das Dreifache erhöht zu sein, zwei- bis dreifach erhöht für Herzerkrankungen, Bluthochdruck, Arthrose und Gicht. Das Risiko für Malignome, Polyzystisches-Ovarsyndrom (PCOS), Infertilität, pränatale Schäden und Rückenschmerzen ist etwa verdoppelt. Etabliert ist der Zusammenhang zwischen Adipositas und T2DM, da ca. 90% der Patienten mit T2DM unter Adipositas leiden [25].

1.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung, die auftritt, wenn der Körper nicht genügend Insulin produziert oder vorhandenes Insulin nicht nutzen kann [26]. Insulin ist

Einleitung

ein Hormon, das in den Beta-Zellen des endokrinen Pankreas produziert wird. Es wird benötigt, um Glukose, welche im Blut zirkuliert, in insulinresistente Zellen aufnehmen zu können. Glukose ist das wichtigste Substrat zur Energiegewinnung. Fehlt Insulin oder ist die Insulinwirkung herabgesetzt, führt dies zu erhöhten Blutglukosewerten, der Hyperglykämie [20].

Die Prävalenz von Diabetes mellitus steigt weiter an. 26 Millionen US-Bürger leiden an Diabetes, 79 Millionen Amerikaner, älter als 20 Jahre, leiden an Prä-Diabetes. Es wurde geschätzt, dass im Jahr 2050 nahezu 5 Millionen Amerikaner Diabetes haben werden [24]

Viele Patienten mit Diabetes mellitus werden auch in den Industrieländern nicht als solche erkannt. Die Rate der nicht-diagnostizierten Erkrankten schwankt je nach Herkunft und Diabetestyp. In den Industrieländern liegt sie bei ca. 35,8%. 81,1% aller nicht-erkannten Diabetiker leben in strukturschwachen Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen [20]. Eine frühe Diagnose in Verbindung mit frühzeitiger, effektiver Behandlung schützt den Einzelnen vor Folgeschäden und die Gesellschaft vor hohen, vermeidbaren Kosten [20].

Diabetes mellitus wird diagnostiziert, wenn erhöhte Blutglukosespiegel von ≥ 126 mg/dl unter Nüchternbedingungen bzw. ≥ 200 mg/dl im Tagesverlauf gemessen werden. Als diagnostisches Kriterium gilt auch ein Blutglukosespiegel von > 200 mg/dl zwei Stunden nach der Aufnahme von 75g Glukose im oraler Glukosetoleranztest (oGTT) [27]. Der oGTT gilt als Goldstandard für die Diagnose von Diabetes mellitus.

Eine gestörte Glukosetoleranz bzw. eine gestörte nüchtern gemessene Blutglukose (100mg/dl-125mg/dl nach oGTT) zeigt sich häufig, bevor ein T2DM nachzuweisen ist [2, 27].

Ist der HbA1c Wert auf $> 6,5\%$ angestiegen, gilt dies als Beweis für Diabetes mellitus. Zudem korrelieren die Werte des HbA1c positiv mit den Langzeitschäden der Erkrankung. Ein HbA1c Wert $< 6,5\%$ darf die Diagnose eines Diabetes mellitus jedoch nicht ausschließen. Bei Verdacht auf Störungen des Glukosestoffwechsels bei normalen HbA1c Werten sollte weiterführende Diagnostik, z.B. ein oGTT, durchgeführt werden [23, 28].

Im Wesentlichen können vier Diabetestypen unterschieden werden:

Einleitung

1.2.1 Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) wird durch die Zerstörung der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas verursacht, welche zu absolutem Insulinmangel führt. Erst wenn ca. 80% der insulinproduzierenden Zellen zerstört sind, steigt die Blutglukose an. Die Ursache für die Zerstörung der Beta-Zellen sind autoimmune Prozesse. Die Symptome bei Manifestation eines T1DM sind meist viel stärker ausgeprägt als bei Erstmanifestation eines T2DM und zeigen sich in erhöhter Urinausscheidung, stetigem Durst, Exsikkose, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit. Die Symptome treten nach Beginn der Erkrankung früher als bei T2DM auf und bedürfen zügiger Intervention, da der absolute Insulinmangel durch Ketoazidose unbehandelt zum Tod führen kann [23].

1.2.2 Diabetes mellitus Typ 2

Bedingt durch die verbesserte Ernährungssituation und die geringere körperliche Aktivität, ist auch das vermehrte Auftreten von T2DM festzustellen. T2DM zeichnet sich durch erhöhte Insulinresistenz aus. Insulinresistenz ist definiert als eine reduzierte Empfindlichkeit des Zielgewebes auf den Insulinstimulus [29]. Unter allen an Diabetes mellitus erkrankten Menschen, welche sich im Jahr 2015 auf ca. 415 Millionen beziffern ließen, leiden 87%-91% an T2DM. Die Zahlen werden weiter steigen, so dass für das Jahr 2040 ca. 642 Millionen Erkrankte erwartet werden [20]. Dieser Erkrankung liegen eine verminderte Insulinwirkung und eine inadäquate Adaptation der Beta-Zell-Funktion zugrunde. T2DM bleibt aufgrund des schleichenden Verlaufs oft jahrelang unentdeckt und wird häufig erst durch Diabetes-Spätkomplikationen erkannt [23]. Patienten mit T2DM sind insulinresistent auf Ebene der Leber, des Skelettmuskels und des Fettgewebes [4]. Durch den relativen Mangel an Insulin kann Glukose nicht effektiv in den Skelettmuskel aufgenommen und als Energielieferant genutzt werden. Diese durch Insulinmangel verursachten Funktionsstörungen von Leber und Skelettmuskel sind gleichermaßen an der Entwicklung der Hyperglykämie beteiligt [30, 31]. Zusätzlich sind Insulinsignalwege in Leber und Skelettmuskel durch erhöhte Lipidaufnahme und gesteigerte Lipolyserate im Fettgewebe einerseits aber auch durch die vermehrt zugeführten Lipide aus der Nahrung andererseits gestört [32].

1.2.3 Diabetes mellitus Typ 3

Unter der Bezeichnung Diabetes mellitus Typ 3 werden spezifische Formen des Diabetes mellitus, welche weder Typ 1 noch Typ 2 entsprechen, genannt. Eine weitere Unterteilung

Einleitung

des Typ 3 Diabetes mellitus erfolgt nach der Ursache und wurden bis 2009 in acht Untergruppen (3a bis 3h) eingeteilt. Seit 2011 wird auf den Zusatz a-h verzichtet, obwohl man diesen in vielen Büchern noch finden kann. Diese hier genannte Einteilung findet sich sowohl in den Praxisleitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft als auch in der Klassifikation des Diabetes mellitus der WHO [27, 33].

- Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z.B. Pankreatitis, zystische Fibrose, Hämochromatose)
- Endokrinopathien (z.B. Cushing-Syndrom, Akromegalie, Phäochromozytom)
- medikamentös-chemisch induziert (z.B. Glukokortikoide, Thiazide, Neuroleptika, Alpha-Interferon, Pentamidin)
- genetische Defekte der β -Zell-Funktion (z.B. Maturity-onset Diabetes of the Young MODY-Formen): Hierbei handelt es sich um genetische Defekte welche die Insulinsekretion stören ohne Autoantikörper-Nachweis und ohne Adipositas. Die Manifestation liegt meist vor dem 25. Lebensjahr und betrifft ca. 1% der Diabetiker. Folgende 4 Formen sind die häufigsten und für ca. 90% der MODY-Fälle verantwortlich.
 - Chromosom 20 MODY 1
 - Chromosom 7 MODY 2
 - Chromosom 12 MODY 3
 - Chromosom 17 MODY 5
- genetische Defekte der Insulinwirkung
- andere genetische Syndrome, die mit einem Diabetes assoziiert sein können, wie z.B. Trisomie 21, Klinefelter- oder Turner-Syndrom.
- Infektionen (z.B. kongenitale Röteln oder Cytomegalie)
- seltene Formen eines autoimmun vermittelten Diabetes (z.B. Anti-Insulin-Rezeptor- Antikörper)

Einleitung

1.2.4 Diabetes mellitus Typ 4

Als Diabetes mellitus Typ 4 (Gestationsdiabetes) wird das erste Auftreten eines Diabetes mellitus, nach Beendigung des ersten Trimeons, während der Schwangerschaft bezeichnet. Treten Glukosetoleranzstörungen bereits vor Ende des 1. Trimeons auf, liegt eher ein präkonzeptionell-manifester aber nicht diagnostizierter Diabetes mellitus vor. Ca. 2-12% der Frauen entwickeln, häufig unentdeckt, einen Gestationsdiabetes während der Schwangerschaft. Frauen mit Übergewicht, einem eigenen Geburtsgewicht >4000g und familiärer Prädisposition für T2DM haben ein erhöhtes Risiko, an Gestationsdiabetes zu erkranken [28]. Nach der Schwangerschaft normalisiert sich die Glukosetoleranz der Frau meist wieder, allerdings bleibt ein erhöhtes Risiko, später an T2DM zu erkranken. Um die Risiken für Komplikationen bei Mutter und Kind zu senken und die Krankheit überhaupt zu erkennen, wird spätestens in der 24.-28. Schwangerschaftswoche (SSW) die Durchführung eines oGTT empfohlen [23].

1.2.5 Morbidität und Mortalität durch Diabetes mellitus

Diabetes verursacht Schäden an Herz, Blutgefäßen, Augen und Nerven, die in Mikro- und Makroangiopathien eingeteilt werden. Diabetes erhöht die Gefahr eines Herzinfarkts bzw. Schlaganfalls. 50% der an Diabetes erkrankten Menschen sterben an kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere Apoplex und Myokardinfarkt [34].

Häufig leiden die Betroffenen an Neuropathien der distalen Extremitäten, welche zunächst zu Missempfindungen und Gefühllosigkeit, später zu Ulzerationen und Infektionen, besonders an den Füßen, führen, die eine Amputation nötig machen können.

Eine weitere Langzeitfolge ist die diabetische Retinopathie, die zur Erblindung führen kann. Ca. 1% der Neuerblindungen weltweit haben Diabetes mellitus als Ursache.

Zudem sind viele dialysepflichtige Patienten seit vielen Jahren an Diabetes mellitus erkrankt. Diabetes ist der wichtigste Faktor bei der Entstehung von chronischem Nierenversagen bis hin zur Dialysepflicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Menschen, die an T2DM leiden, ein doppelt so hohes Mortalitätsrisiko haben als Menschen ohne Diabetes [23, 35].

Einleitung

1.3 Physiologische Insulineffekte

Die wichtigste Wirkung von Insulin ist die Regulation des Blutglukosespiegels durch Steigerung der Glukoseaufnahme nach der Nahrungsaufnahme und die Hemmung der Glukoseproduktion während der Fastenperiode, wie es in Abbildung (Abb.) 1 gezeigt wird. Stimulus für die Sekretion von Insulin ist ein erhöhter Blutglukosespiegel aber auch ein Anstieg von freien Fettsäuren (FFS), verzweigt-kettigen Aminosäuren und von Inkretinen. Insulin wirkt als anaboles Hormon und fördert die Synthese und Speicherung von Glykogen, Proteinen und Triglyzeriden (TAG) [36].

Im postabsorptiven Zustand wird die Insulinsekretion gehemmt. In der Folge bewirkt die reduzierte insulinvermittelte Hemmung der Lipolyse und Glykogenolyse die Aufrechterhaltung der Blutglukose im euglykämischen Bereich.

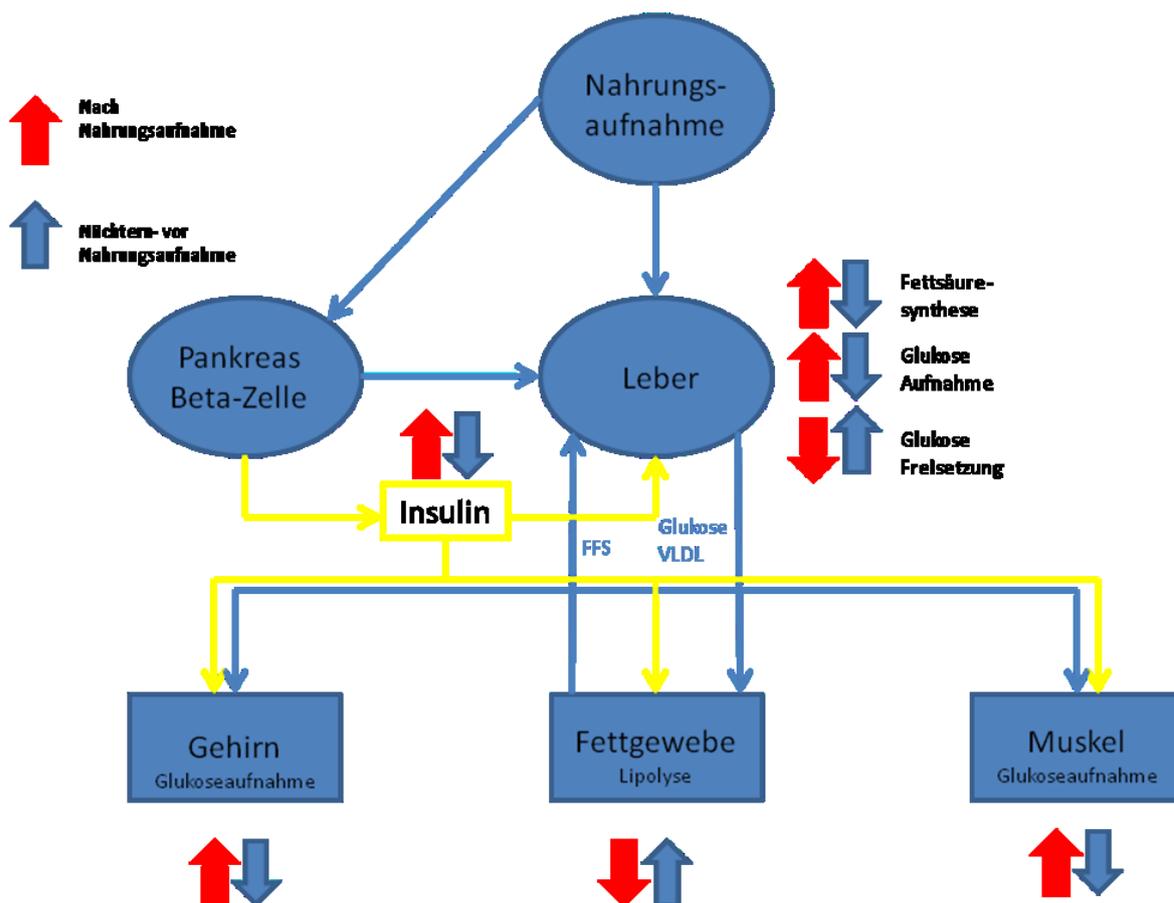


Abb. 1 Physiologische Insulinwirkung. Stoffwechsellager vor (nüchtern) und nach der Nahrungsaufnahme. Die roten Pfeile beschreiben die postprandialen, die blauen Pfeile die postabsorptiven Effekte des Insulinspiegels. FFS: Freie Fettsäuren, VLDL: Very low density lipoprotein.

Einleitung

Abb. 1 beschreibt die Effekte der Regulation des Insulinspiegels unter prä- und postprandialen Bedingungen. Nach der Nahrungsaufnahme über den Magen-Darm-Trakt kommt es durch Anstieg der Blutglukose zur Insulinausschüttung. Insulin erhöht die Glukoseaufnahme und Glykogensynthese in der Leber, während die endogene Glukoseproduktion sinkt. Insulin fördert die TAG-Synthese und hemmt die Lipolyse im Fettgewebe. Im Gehirn fördert Insulin das Sättigungsgefühl. Im Skelettmuskel stimuliert Insulin einerseits die Glukoseaufnahme via Glukose-Transporter 4 (GLUT4) andererseits die Synthese und Speicherung von Glykogen.

Die Insulinsensitivität kann über die Ermittlung der Glukoseaufnahme des gesamten Körpers unter Hyperinsulinämie bestimmt werden. Hierfür wird als Goldstandardmethode der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp eingesetzt.

Die Bestimmung der organspezifischen Insulinsensitivität kann über spezielle Messmethoden erfolgen. Die Insulinsensitivität des Fettgewebes wird aus der Suppression der Lipolyse durch Messung der FFS unter hyperinsulinämischen Bedingungen ermittelt. In der Leber wird die insulinvermittelte Suppression der endogenen Glukoseproduktion (EGP) als Maß der hepatischen Insulinsensitivität gemessen. Bei Kenntnis der EGP lässt sich aus der Glukoseaufnahme des Gesamtkörpers unter hyperinsulinämischen Bedingungen die Glukoseaufnahme des Skelettmuskels und damit dessen Insulinsensitivität berechnen.

1.4 Mechanismen der Insulinresistenz des Skelettmuskels

Die in Abb. 1 gezeigten Effekte des Insulins auf die Zielzelle sind beeinträchtigt, wenn die betroffene Zelle insulinresistent ist. Durch einen Mangel an körperlicher Aktivität, in Verbindung mit hyperkalorischer Ernährung und genetischer Disposition, entwickelt sich schleichend Insulinresistenz. Adipositas und T2DM führen zu erhöhten Konzentrationen von FFS im Plasma und zur Speicherung von Lipidmetaboliten in Muskelzellen und in der Leber [37-39]. Die gesteigerte Freisetzung von FFS aus Adipozyten und die Anreicherung von Lipidmetaboliten in anderen Geweben (ektople Lipidspeicherung) sind verantwortlich für die Entstehung der Lipid-induzierten Insulinresistenz. Außerdem werden Dysregulation der Ausschüttung von Proteinen aus dem Fettgewebe (Adipozytokine) und chronische, subklinische Entzündungen mit Freisetzung von Zytokinen als relevante Mechanismen diskutiert [40].

Einleitung

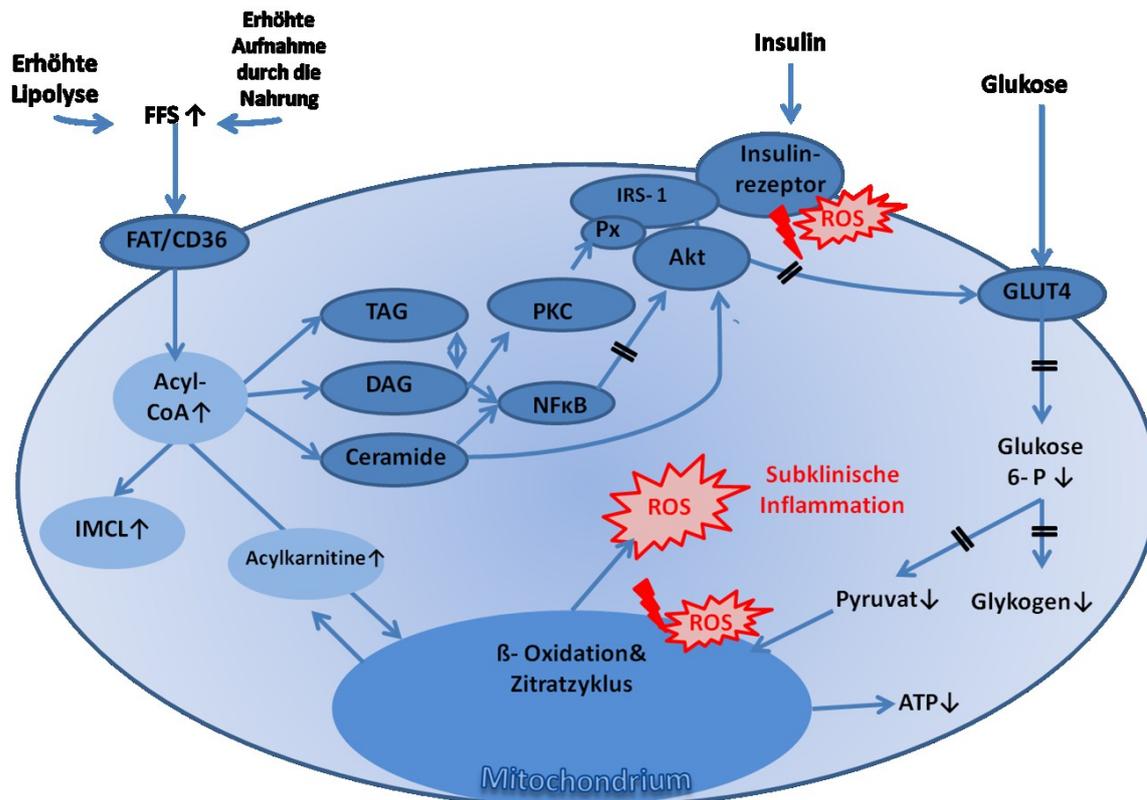


Abb. 2. Zelluläre Mechanismen der Lipid-induzierten Insulinresistenz. Effekte von FFS, Insulin und Glukose auf die Stoffwechselfunktion innerhalb der Zelle. Erhöhte Anreicherung von FFS kann durch eine erhöhte β -Oxidation im Mitochondrium zu gesteigerter ROS-Produktion, welche die Zellorganellen und Zellwände angreifen führen. Die Insulinresistenz nimmt zu, verminderte Aufnahme von Glukose und Umwandlung zu Energie via Zitratzyklus sind die Folgen. FFS: Fettsäuren, FAT/CD36: fatty acid transport protein/CD 36, Acyl-CoA: Acyl-Coenzyme A, DAG: Diacylglycerol, PKC: Proteinkinase C, IRS1: Insulinrezeptorsubstrat 1, GLUT: Glukosetransporter, G6P: Glukose-6- Phosphat, ROS: reaktive Sauerstoffspezies. Modifiziert nach Szendroedi, J., et al., Nat Rev Endocrinol. 2012 [4] und Szendroedi, J., et al., Current Opinion in Lipidology. 2009 [41].

1.4.1 Hemmung des Insulinsignalweges

Abb. 2 zeigt Stoffwechselforgänge der Zelle mit besonderem Augenmerk auf die hemmende Wirkung von erhöhten FFS auf die Insulinsensitivität der Zelle. Die Konzentration von FFS im Blut wird hauptsächlich durch das Ausmaß der Lipolyse bestimmt [42] und ist bei Adipösen und T2DM Patienten deutlich erhöht. FFS werden über den FAT/CD36- Rezeptor in der Zellmembran in die Zelle geschleust und führen so zum Anstieg des intrazellulären Acyl-CoA- Gehalts. FFS im Plasma korrelieren nicht nur unabhängig von anderen Risikofaktoren mit Insulinresistenz, sondern können diese auch hervorrufen [43].

Die Steigerung von myozellulären Lipiden und ihren Metaboliten, DAG [44] und Ceramiden ist assoziiert mit der Störung der Insulinsignalkaskade des Skelettmuskels [44-48]. Wie der Insulinsignalweg im Skelettmuskel bei Menschen durch Lipidmetabolite gehemmt wird, war bislang unklar [49].

Einleitung

Eine besondere Rolle scheint hier der erhöhte Gehalt von DAG zu spielen. DAG aktiviert atypische Isoformen der PKC. Durch die Aktivierung dieser Proteinkinase kommt es zur Phosphorylierung (Px) an Serinresten des Insulin Rezeptor Substrats-1 (IRS-1), wodurch nach Studien im Mausmodell die Tyrosin-Px von IRS-1 und damit die Weiterleitung des Insulinsignales gehemmt wird [9, 13, 50, 51]. Außerdem aktivieren DAG und Ceramide einen Mediator der intrazellulären Inflammation (NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), welche Insulinresistenz zur Folge hat [52-54]. Die inhibitorische Px von Serin/Threoninresten des IRS-1 resultiert in der verminderten Translokation von GLUT4 in die Zellmembran. Dies wiederum führt zu vermindertem Transport von Glukose in die Zelle sowie zu reduziertem intrazellulären Anstieg von Glukose zu Glukose-6-Phosphat [44].

Insulin stimuliert außerdem über IRS-1 den Phosphatidylinositol 3-Kinase/ Aktin (Pi3-Kinase)/ (Akt) Signalweg über Px am Serinrest des Akt (Akt-Ser473-Px). Resultat der Aktivierung dieses Pathways ist unter anderem die Translokation von GLUT4 in die Plasmamembran zur Glukoseaufnahme aus dem Blut [44].

Andererseits bietet im Tiermodell die Erhöhung der DAG Acyltransferase Schutz vor Lipid-induzierter Insulinresistenz, obwohl gleichzeitig die TAG Synthese in der Muskelzelle zunimmt. Zudem sind Konzentrationen von intramyozellulären Lipiden (IMCL)/TAG trotz normaler Insulinsensitivität bei Sportlern oft erhöht, man spricht hier vom Trainings-Paradox [55].

1.4.2 Anstieg von IMCL

IMCL korrelieren stark mit Insulinresistenz, scheinen jedoch nicht Mediatoren der Insulinresistenz zu sein, sondern als metabolisch inerte Surrogatparameter für gesteigerte Lipidaufnahme in den Skelettmuskel zu fungieren [6, 56-58]. Bei spezifischer genetischer Prädisposition können jedoch sogar normgewichtige Verwandte von T2DM durch reduzierte muskuläre Kapazität der Lipidoxidation und daraus folgender Akkumulation von IMCL und anderen Lipidmetaboliten Insulinresistenz entwickeln [12, 59, 60]. Ob die ektopische Lipidspeicherung bei übergewichtigen Patienten mit T2DM nun eine Konsequenz der reduzierten oxidativen Kapazität ist oder deren Entstehung durch gesteigerten oxidativen Stress begünstigt, ist noch unklar [61, 62].

Einleitung

1.4.3 Subklinische Inflammation

Ein weiterer Mechanismus, der die Insulinsensitivität beeinträchtigen könnte, ist die subklinische Inflammation des Fettgewebes, welche sich häufig bei Adipösen zeigt. So wurde in Versuchen an Ratten und ex vitro an Adipozyten gezeigt, dass tumor necrosis factor- α (TNF- α) Insulinresistenz verursachen kann [29, 63]. Diese chronische, schwache Entzündungsreaktion ist messbar an erhöhten Werten von C-reaktivem Protein (CRP) sowie von TNF- α und anderen inflammatorischen Zytokinen [64]. Die Wirksamkeit einer Blockade dieser Entzündungsreaktion zur Therapie der Insulinresistenz konnte sich bisher nicht etablieren und die Relevanz in der Pathogenese der Insulinresistenz ist noch unklar.

1.4.4 Oxidativer Stress

Acetyl-CoA ist das Produkt der Lipidoxidation und wird als Substrat in den Zitratzyklus eingeschleust, um weiter zu CO_2 und H_2O abgebaut zu werden. Bei erhöhter Lipidverfügbarkeit und/oder reduzierter oxidativer Kapazität für glykolytische Substrate und/oder reduzierter Glukoseaufnahme übersteigt jedoch der intrazelluläre Anstieg von Acetyl-CoA die mitochondriale Abbaukapazität im Zitratzyklus. Wie in Abb. 2 beschrieben, kann eine Fehlfunktion der Mitochondrien zu oxidativem Stress durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen und in der Folge zu einer Entzündungsreaktion der Zellen [65, 66].

Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen greifen die Membranen und die DNA der Mitochondrien an. Als Folge entstehen Funktionsschäden, welche die oxidative Kapazität und/oder Adaptation der Mitochondrien an wechselnde metabolische Bedingungen beeinträchtigen und damit die Progression der Insulinresistenz fördern.

2. Hypothesen und Ziele

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass DAG die Hemmung des muskulären Insulinsignalweges verursachen. Eine untergeordnete Rolle spielen andere Lipidmetabolite, wie Ceramide und IMCL.

Um dies zu bestätigen, ist das Ziel dieser Arbeit, die Konzentration an DAG in sequenziellen Muskelbiopsieproben während der Entwicklung Lipid-induzierter Hemmung des Insulinsignalweges zu messen und mit den im Clamp Test ermittelten M-Werten zu assoziieren. Wir vermuten, dass erhöhte Konzentrationen von DAG in den Zellen zu verringerten M-Werten unter Lipidinfusion führen. Außerdem unterscheiden wir DAG Gehalt in der Membran zu DAG im Cytosol. Wir schlüsseln DAG nach Acylresten auf, da wir vermuten, dass Insulinresistenz besonders mit bestimmten DAG Untereinheiten assoziiert ist. Eine weitere Hypothese ist, dass Ceramide nur eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz spielen. Darum haben wir diese ebenfalls im Skelettmuskel unserer Probanden gemessen und erwarten, im Gegensatz zu den Ergebnissen der DAG- Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Probandengruppen. Um die untergeordnete Rolle von IMCL zu bestätigen, haben wir IMCL in insulin sensitiven Gesunden und in insulinresistenten Glukosetoleranten und Patienten mit T2DM in vivo bestimmt.

3. Methoden

3.1 Probanden

In der Studie nahmen junge, gesunde, insulinsensitive Erwachsene (CON), glukosetolerante aber insulinresistente, adipöse Probanden (OBE) und Patienten mit T2DM teil. CON und OBE wiesen vergleichbare Geschlechts- und Altersverteilung auf. T2DM wiederum waren zu OBE in Geschlecht und Körperfettmasse vergleichbar. Alle Probanden wurden durch Pressemitteilungen und Aushänge rekrutiert. Sie erhielten eine vollständige medizinische Anamnese, Untersuchung und Labortests. Die Studienprotokolle der Gruppen und ihre Charakteristika werden in Tabelle 3 und Abb. 3 und 4 gezeigt.

3.1.1 Screening

Alle Studienprotokolle wurden nach der Deklaration von Helsinki 1975 entwickelt und durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (EKNr 3157) genehmigt. Jeder der Probanden hat schriftlich der Studienteilnahme zugestimmt und wurde im Vorfeld über die geplanten Untersuchungen und deren Nutzen für die Forschung informiert. Außerdem wurden die Teilnehmer über mögliche Komplikationen aufgeklärt und konnten zu jedem Zeitpunkt ihre Teilnahme an der Studie beenden. Die Studie ist registriert unter ClinicalTrials.gov identifier number: NCT01229059.

Die Probanden durchliefen ein ausführliches Screening mit Anamnese, körperlichen und laborchemischen Untersuchungen an dessen Ende die Inklusion bzw. Exklusion zur Studie stand. Während des Screenings wurden der Taillen- und Hüftumfang sowie die Körperfettmasse ermittelt. Drei Tage vor dem Versuchstag sollten die Probanden eine isokalorische Diät einhalten, keinen Alkohol trinken und keine anstrengenden körperlichen Aktivitäten ausführen. Nur T2DM Patienten, welche noch nie mit Insulin therapiert wurden oder Thiazolidindione (Glitazone) eingenommen hatten, konnten an der Studie teilnehmen. Ihre glukose- und lipidsenkende Medikation wurde drei Tage vor der Untersuchung abgesetzt.

Die Patienten mit T2DM durften außer Diabetes keine weiteren Erkrankungen und keine Folgeschäden aufgrund ihres T2DM aufweisen. Insulinspritzen und das Einnehmen von Glitazone galten, ebenso wie der Nachweis von Inselzellantikörpern im Blut, als Ausschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie.

Methoden

Alle Probanden mussten über 18 Jahre alt sein und selbstbestimmt der Teilnahme an der Studie zustimmen können. Frauen durften nicht schwanger sein. Bei allen Probanden wurde besonders sorgfältig das wöchentliche Maß an Sport und Bewegung erhoben, damit vergleichbare, sportlich inaktive, Gruppen getestet werden konnten.

Litten die Bewerber für die Studienteilnahme an Kardiovaskulären-, Leber-, Schilddrüsen- oder Nierenerkrankungen, so konnten sie nicht an der Studie teilnehmen. Die gesunden Probanden der Kontrollgruppe durften weder eine positive Familienanamnese bezüglich T2DM aufweisen noch regelmäßig den Stoffwechsel beeinflussende Medikamente einnehmen. Exklusionskriterien waren neben der fehlenden Einverständnis mit dem Studienprotokoll auch Verhaltensweisen bzw. Erkrankungen, die den Metabolismus des Körpers verändern können, wie zum Beispiel: Rauchen, Sport (> 3 Einheiten/Woche), Anämie, HIV/AIDS, Karzinome oder chronische, autoimmune, allergische, und psychiatrische Erkrankungen.

Nach einem telefonischen Interview wurden geeignete Teilnehmer zu einer Screening Untersuchung in das Deutsche Diabetes Zentrum eingeladen. Um 8.00 Uhr am Morgen, nach 12-stündiger Nüchternperiode, erhielten die Probanden zunächst einen Venenkatheter (Vasofix; Braun, Melsungen, Deutschland) in eine Vene des Unterarms, um ein Routinelabor abnehmen zu können. Teilnehmern, die der Kontroll- bzw. der Gruppe der Adipösen zugeordnet werden sollten, wurden über diesen Katheter auch Blutproben während des anschließenden oGTTs (Accu chek®, Roche, Mannheim) abgenommen.

Am Screening Tag wurde auch die Größe und das Gewicht der Teilnehmer bestimmt, alle erhielten ein EKG (Elektrokardiogramm, GE medical system, Software Version 1.0, Freiburg, Germany) und eine Body-Impedanzmessung, um den Fett- und Wasseranteil im Körper bestimmen zu können. Diese Untersuchungen wurden während der halbstündigen Pausen zwischen den Blutuntersuchungen innerhalb des oGTTs durchgeführt (bei CON und OBE) bzw. direkt an die Blutuntersuchung angeschlossen.

Der Blutdruck wurde am Screening Tag zweimal bestimmt (Omron 705 IT, Healthcare Europe B.V., Hoofddorp, Niederlande). Nachdem alle Messdaten und Blutwerte ausgewertet wurden und sich die Teilnehmer als passend für die Studie erwiesen haben, erhielten sie telefonisch einen Termin für die Studienteilnahme.

Methoden

Der oGTT wurde zur Sicherung der normalen Glukosetoleranz bei CON und OBE eingesetzt und nicht durchgeführt, wenn der erste Blutglukosewert des Probanden über 126mg/dl lag, da ab diesem Wert definitionsgemäß ein Diabetes vorliegt. Der verwendete oGTT (Accu chek®, Roche, Mannheim) beinhaltet 75 g Glukose gelöst in 300 ml Wasser. Die Teilnehmer mussten diese Glukoselösung innerhalb von 5 Minuten trinken. Für den Test stand im Untersuchungszimmer eine Liege bereit, auf der die Probanden Platz nehmen sollten, um einen verstärkten Energieverbrauch zu verhindern [67]. Die venösen Blutproben wurden nun aus dem zuvor gelegten Zugang zu spezifischen Zeiten mit 2 ml Spritzen entnommen, um die Werte für Blutglukose (BG), C- Peptid und Insulin erheben zu können: -15 und -1 Minuten bevor der oGTT getrunken wurde; 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten nach der oralen Aufnahme. Die Evaluation der oGTT Werte erfolgte wie in Tabelle 2 ersichtlich.

	Nüchtern- Wert	2- Stunden Wert
Gestörte Glukose-Toleranz	<126	140- 200
Diabetes mellitus	> 126	> 200
Gestörter Nüchtern-Wert	>100 and < 126	----

Tabelle 2. WHO-Richtwerte für den oralen Glukose Toleranztest (oGTT). Nüchtern bedeutet nach einer mind. 10 stündigen Fastenperiode, 2 Stunden-Wert, 2 Stunden nach oraler Aufnahme des oGTT, alle Werte werden in mg/dl angegeben[28].

3.2 Studienprotokolle

Alle Charakteristika, Laborwerte und Glukosestoffwechselfdaten der Gesunden, der Adipösen und T2DM Probanden werden in den Resultaten berichtet. Die Adipösen und T2DM Patienten wurden mittels Clamp Test und Muskelbiopsie untersucht. Im weiteren Verlauf wird dieser Tag mit Studienprotokoll 1 bezeichnet, während die gesunden, jungen Probanden einem anderen Protokoll, im weiteren Verlauf Studienprotokoll 2 genannt, unterzogen wurden.

**Studienprotokoll 1
Chronisch-Insulinresistente**

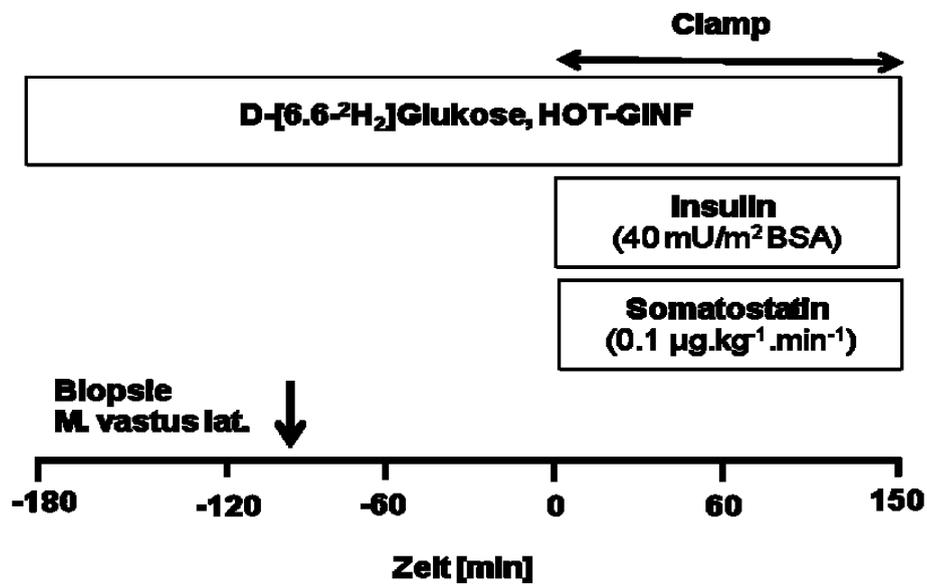


Abb. 3. Studienprotokoll 1. Ablauf des Clamps bei Adipösen und T2DM, also Probanden mit chronischer Insulinresistenz. Die Muskelbiopsie wurde im Zeitraum von 1-2 Stunden nach Versuchsbeginn, ohne Insulinstimulation entnommen. Danach begann der Clamp zur Bestimmung der Insulinsensitivität mit Insulin- und Somatostatinfusion unter konstanten Blutglukosewerten (steady-state-Phase). Body surface area (BSA)

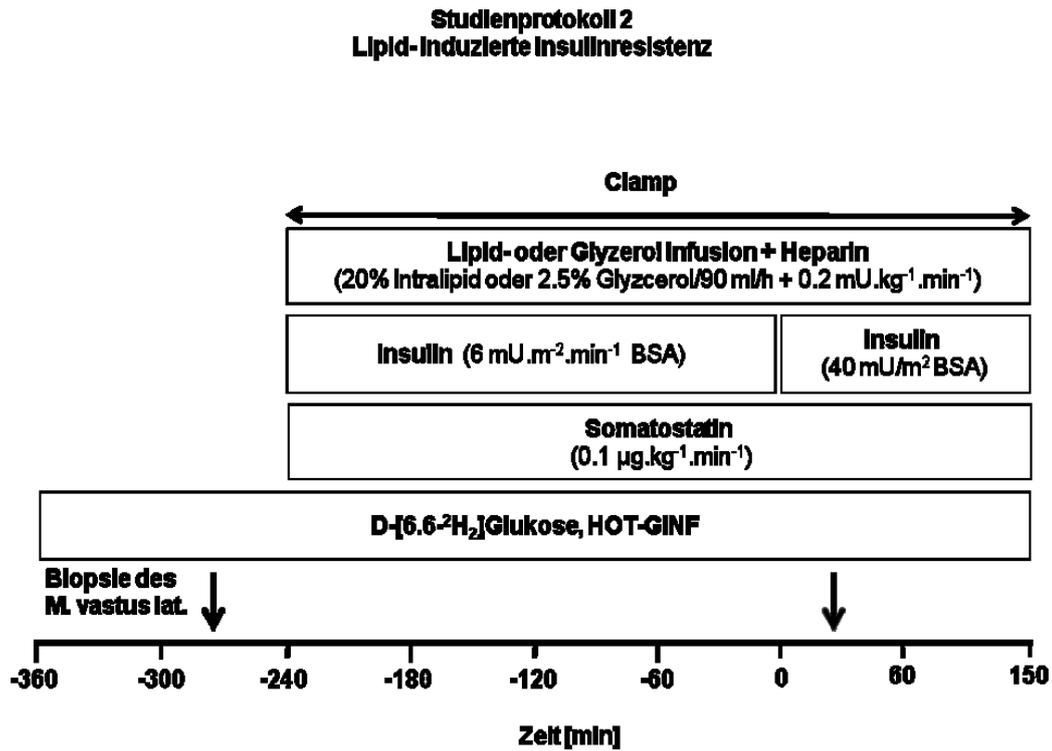


Abb. 4. Studienprotokoll 2. Die Probanden der Kontrollgruppe durchliefen an den Versuchstagen dieses Protokoll. Auch hier werden durch die schwarzen Pfeile die Zeitpunkte der Muskelbiopsie gekennzeichnet. Die erste fand 1-2 Stunden nach Versuchsbeginn in einer Phase statt, in der noch kein Insulin verabreicht wird. Muskelbiopsie 2 fand in der Phase der Insulinstimulation statt. Während dieser 2. Muskelbiopsie erhielten die Probanden zusätzlich eine Glycerol- oder Lipidinfusion. So konnten die Effekte auf den Glukosestoffwechsel des Muskels untersucht werden. Body surface area (BSA)

	Studienprotokoll 1	Studienprotokoll 2
Probanden	10 Adipöse 10 T2DM	36 junge, gesunde Probanden
Clamp Test	basale Phase ohne Insulininfusion dann hyperinsulinämischer- euglykämischer Clamp zur Bestimmung der Insulinsensitivität	basale Phase ohne Insulininfusion dann 2 Phasen Clamp: 1. Phase: pankreatischer Clamp mit niedriger Insulinrate um Nüchternperioden der Probanden während Lipidinfusion vergleichbar zu machen

Methoden

		2. Phase: hyperinsulinämischer- euglykämischer Clamp zur Bestimmung der Insulinsensitivität
Muskelbiopsie	1 Muskelbiopsie unter Nüchternbedingungen	2 Muskelbiopsien erste unter Nüchternbedingungen, zweite in der hyperinsulinämischen Phase des Clamp Tests, entweder unter Lipid- oder Glyzerolinfusion.
Dauer	Gesamtdauer 330 Minuten	Gesamtdauer 510 Minuten

Tabelle 3. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Studienprotokolle. Gezeigt werden die wesentlichen Unterschiede der beiden Studienprotokolle, Studienprotokoll 1 für Adipöse (OBE) und Patienten mit Diabetes Typ 2 (T2DM); Studienprotokoll 2 für junge, gesunde Kontrollgruppe (CON).

3.2.1 Studienprotokoll 1

Wie beim Screening galten die gleichen Voraussetzungen für Diät, Nüchternperiode und Sportverzicht auch am Studientag, der regulär um 7.00 Uhr morgens startete. Zunächst wurden die Probanden klinisch untersucht und Größe und Gewicht wurden erneut erhoben. Zur Sicherheit erfragten wir abermals die aktuelle Medikation. Auch Patienten mit T2DM wurden gebeten, ihre medikamentöse Therapie drei Tage vor der geplanten Untersuchung unter regelmäßigen BG-Messungen zu unterbrechen. Nun wurden zwei Venenverweilkatheter in den rechten und linken Unterarm gelegt, um während der Untersuchung regelmäßig Blutproben gewinnen und gleichzeitig Infusionen verabreichen zu können. Dabei wurde aus einem der Zugänge eine Blutprobe entnommen, um routinemäßig Laborwerte (Elektrolyte, Entzündungswerte, Nierenwerte, Glukose) der Probanden messen zu können.

Als kontinuierlich verabreichte Infusion wurde markierte Glukose ([6.6-²H₂]Glukose) 98% angereichert; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) verabreicht. Während der gesamten Testzeit fanden regelmäßige BG-Messungen statt. Gestartet wurde mit einer Rate von 3.6 mg·kg Körpergewicht¹·Nüchtern-Plasmaglukose [FPG; mg/dl]/90 [mg/dl] für 5 Minuten, danach schloss sich die kontinuierliche Infusion mit einer Rate von 0.036

Methoden

mg·min⁻¹·kg Körpergewicht⁻¹ an. Bei Studienprotokoll 1 begann die Infusion bei -180 min, bei Studienprotokoll 2 bei -360 vor Zeitpunkt 0 (dem Beginn des Clamp Tests). Die angereicherte Glukose wurde über die gesamte Testzeit bis zum Ende des Clamps infundiert [68]. Alle Probanden, die nach Studienprotokoll 2 untersucht wurden, (siehe Abb. 4) erhielten vor der hyperinsulinämischen Phase noch eine Insulininfusion mit geringerer Rate von 6 mU/m²·Körperoberfläche·min⁻¹ über einen Zeitraum von 240 Minuten (-240 bis Zeitpunkt 0), den sogenannten pankreatischen Clamp. Bei den Probanden, welche als chronisch insulinresistent galten, entfiel diese Phase. Nach dieser ersten Phase schloss sich die hyperinsulinämische Periode des Tests an. Durch die kontinuierliche, intravenöse Verabreichung von Somatostatin (0.1 µg·kg⁻¹·min⁻¹; UCB Pharma, Wien, Österreich) wurde die endogene Insulinsekretion gehemmt. Danach wurde die kontinuierliche Insulingabe (Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) zum Zeitpunkt 0 Minuten mit einer hohen Rate von 40 mU/m²·Körperoberfläche·min⁻¹ begonnen. Während dieser Phase erfolgte die standardisierte BG Messung alle 5-10 Minuten via IKF Gerät.

Um Bedingungen der Normoglykämie (~90 mg/dl) und gleichzeitiger Hyperinsulinämie (~500 pmol/l) herstellen zu können, wurde (Studienprotokoll 1 und 2, Zeitpunkt 0) kontinuierlich eine Insulin-Infusion (Actrapid; Novo, Bagsvaerd, Dänemark) - [40 mU·(m Körperoberfläche)⁻²·min⁻¹] über einen Perfusor zugeführt. In dieser hyperinsulinämischen Phase hatten die Probanden Ziel-Blutglukosewerte von 90 mg/dl. Falls notwendig, wurde, adaptiert an die jeweiligen Messergebnisse, 20% Glukose (Glucosteril®, Company: Fresenius Kabi) infundiert. Diese Glukose war zu 2% mit d-[6,6-²H²]Glukose angereichert (Hot- GINF), um die EGP messen zu können [69].

Vor der hyperinsulinämischen Phase erfolgte unter stabilen BG Werten eine Muskelbiopsie. Der Clamp Untersuchungstag endete für die Probanden mit Studienprotokoll 1 gegen 13.30 Uhr. Alle Infusionen außer der 20% Glukose wurden nun gestoppt. Die Probanden erhielten eine kohlenhydratreiche Mahlzeit und die Blutglukose wurde weiterhin bestimmt, um eine Hypoglykämie zu verhindern. Wenn die Blutglukosewerte sich stabil verhielten, wurden die Venenverweilkatheter entfernt, die Wunden der Biopsien an den Oberschenkeln versorgt und die Probanden durften das DDZ verlassen.

Methoden

3.2.2 Studienprotokoll 2

Der Versuch in der Kontrollgruppe nach Studienprotokoll 2 begann für die Probanden nach 12-stündiger Fastenperiode morgens um 7.00 Uhr im DDZ. Zunächst wurde auch hier deuterierte Glukose infundiert, um die EGP messen zu können [70, 71]. Die Probanden erhielten an diesem Versuchstag eine Lipidinfusion, um Insulinresistenz induzieren zu können, (Intralipid®; Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) zu folgenden Zeiten: -240 bis -230 min: 10ml/h anschließend eine erhöhte Dosis -229 bis +150 min: 90 ml/h. An einem anderen Tag erhielten die Teilnehmer den Kontrollversuch, in dem 2.5% Glycerol gelöst in NaCl 0.9% (Fresenius Kabi GmbH) zu folgenden Zeiten infundiert wurde: -240 min bis -230 min: 10ml/h; und anschließend -229 bis +150 min: 90 ml/h. Die angereicherte Glukose wurde über die gesamte Testzeit bis zum Ende des Clamps infundiert [68]. Zur Standardisierung der Stoffwechsellage wurde ein pankreatischer Clamp Test mit Somatostatin und 6 mU/m^2 Körperoberfläche pro Minute Insulin durchgeführt (s.o.). Nach 6 Stunden wurde mittels hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp Tests (0 bis +150min) die Insulinsensitivität von Leber und Muskel gemessen.

Um den Insulinsignalweg im Muskel analysieren zu können wurde bei den gesunden Probanden in der basalen Phase und zusätzlich 30 Minuten nach dem Start des hyperinsulinämischen- euglykämischen Clamp Tests eine Biopsie aus dem M. vastus lateralis entnommen.

Beide Untersuchungstage endeten für die Teilnehmer gegen 16.00 Uhr. Auch bei diesen Probanden schloss sich eine Erholungsphase an, in welcher nur noch Glukose verabreicht wurde, die Patienten eine kohlenhydratreiche Mahlzeit erhielten und schließlich bei Blutzuckerwerten $>100\text{mg/dl}$ über mindestens 30 Minuten das DDZ verlassen konnten.

3.2.3 Insulinsensitivität

Die Insulinsensitivität der Probanden wurde aus der steady-state Phase der angepassten Glukose Infusionsrate, vermindert um die Korrektur für den glucose space (M-Wert) und der kontinuierlich verabreichten Insulinrate, die sich in den letzten 30 Minuten der Untersuchung einstellte, ermittelt. Der M-Wert ($\text{mg/kg}\cdot\text{min}$) ist demzufolge ein errechneter Mittelwert der Glukose-Infusionsraten, vermindert um die Korrektur für den glucose space und zeigt die Insulinsensitivität des gesamten Körpers an. Hohe M-Werte entsprechen einer hohen Insulinsensitivität[30].

Methoden

3.2.4 Baecke Index

Der Baecke Index Fragebogen befasst sich mit der Einschätzung des täglichen Bewegungs- und Sportverhaltens der Probanden [72]. Er beinhaltet 14 Fragen und wurde mit den Studienteilnehmern während des Untersuchungstags durchgearbeitet. Durch diesen Test ist es möglich, drei Qualitäten der körperlichen Leistung zu unterscheiden: körperliche Aktivität während der Arbeit (PW), Sport in der Freizeit (PS) und körperliche Aktivität während der Freizeit, außer Sport (PL). Über die Mittelwerte der einzelnen Punkte wurde ein Durchschnittswert der körperlichen Aktivität ermittelt [71].

3.2.5 Blutproben

Um alle nötigen Blutwerte, Parameter der klinischen Chemie (kleines Blutbild, Insulin, C-Peptid, TAG, FFS, Glycerol, Glukagon) und der Serologie (Immunmarker, Cytokine, Chemokine, Adipokine), bestimmen zu können, wurde den Probanden ca. 135ml Blut entnommen. Alle Untersuchungen wurden im Labor im DDZ durch geschultes Personal durchgeführt.

3.2.6 Analytik

Alle nun folgenden Blutuntersuchungen wurden durch Mitarbeiter des Labors im DDZ durchgeführt und evaluiert. Die BG Konzentration wurde durch die Glukose-Oxidationsmethode bestimmt (Glucose analyzer II, Beckman Instr., Inc., Fullerton, CA). Plasma FFS konnten durch die Mikrofluorimetrie Methode (Wako Chem USA Inc., Richmond, VA) quantifiziert werden. Um die in-vitro-Lipolyse zu verhindern, wurde das Blut für die Bestimmung von TAG und FFS in Röhrchen, welche Orlistat enthielten, gesammelt. TAG im Plasma wurden durch eine Peroxidase gekoppelte kalorimetrische Untersuchung (Roche, Wien, Österreich) bestimmt [13]. Ebenfalls enzymatisch wurde der Plasma- Laktatgehalt ermittelt (Sigma Chem. MO) [73]. Die Plasmakonzentration von Insulin, C- Peptid und Glukagon wurde durch ein Doppelantikörper Radioimmunverfahren erhoben [74]. Adipokine und Myokine wurden durch Bioplex Analyse bestimmt.

3.2.6.1 Erhebung der Blutglukosespiegel

Für die oben beschriebenen Versuchstage wurde venöses Blut aus den Verweilkanülen entnommen. Diese wurden zwischen den Messungen mit NaCl 0,9% gespült, um ein Verstopfen durch Blutreste zu vermeiden. Nachfolgende Blutentnahmen erfolgten erst nachdem 2ml aus dem Zugang aspiriert und verworfen wurden, um ein Verdünnen des Blutes durch NaCl Lösung zu verhindern.

Methoden

Der BG-Spiegel konnte so schnell und direkt im Untersuchungsraum ermittelt werden. Aus einer 2ml Spritze wurden die Blutproben direkt nach der Entnahme in eine an den Enden offene Kapillare eingefüllt. Diese Kapillare wurde dann in das durch die Firma Biosen gelieferte Reaktionsröhrchen eingebracht. Um die Hämolyse und eine Verdünnung auf 1:51 herbeizuführen, wurde das Röhrchen mit der enthaltenden Kapillare geschüttelt. Pro Abnahmezeitpunkt erfolgten immer zwei Probeentnahmen, deren Mittelwert als Ergebnis für den jeweiligen Zeitpunkt ins Studienprotokoll eingetragen wurde. Alle Untersuchungen wurden mit dem EKF-Gerät C-line der Firma Biosen, Barleben Deutschland, durchgeführt.

3.2.6.2 Bestimmung des Substratverbrauchs

Der Substratverbrauch der Probanden wurde während des Clamps durch Ermittlung des Respiratorischen Quotients (RQ) in der indirekten Kolorimetrie bestimmt. Die Untersuchung erfolgte einmal unter Fastenbedingungen und ein weiteres Mal in der hyperinsulinämischen steady-state-Phase des Clamps. Die Probanden lagen für 30 Minuten unter einer durchsichtigen Haube, in welche Raumluft eingeleitet wurde. Die verbrauchte Luft wurde unter Verwendung individueller Kalibrierung analysiert, um die Datenvariabilität möglichst gering zu halten [75].

3.2.7 Analysen der Skelettmuskelbiopsieproben

Durch IRS-1 Immunopräzipitationsmessung, welche an Rattenmuskeln etabliert wurde [76], war es möglich, die Aktivität der PI3-Kinase zu bestimmen. Ausschlaggebend für die Aktivität der Kinase war der Phosphorylierungsstatus an wichtigen Serinresten (z.B. Ser312, 636 oder 639). Dieser Status konnte durch die Verwendung bestimmter Antikörper ermittelt werden. Die totale IRS-1 Expression wurde im Gewebeextrakt gemessen [76, 77]. In einer weiteren Gewebeprobe wurde nach Zentrifugation die Akt-Phosphorylierung der membranösen Zellfraktion (Akt- Ser473-Px) gemessen. DAG und Ceramidgehalt der Muskelbiopsie-Probe wurde nach dem Einlegen der Gewebeprobe in Chloroform und Einlegen des Gewebeextrakts in die Methanol + PBS + 0,2% SDS (1:2:0,8) Lösung bestimmt [78]. Nun konnte DAG Kinase [γ - 32 P] und ATP (15 μ Ci/ μ mol kaltes ATP) zugefügt werden und eine spezifische Reaktion folgte. Diese wiederum ließ sich durch das Hinzufügen eines Gemischs aus Chloroform und Methanol, im Verhältnis 2:1, stoppen. Die Proben wurden nun auf Dünnschnitt-Chromatographieplatten aufgebracht, welche mit einer Chloroform, Aceton, Methanol, Essigsäure und Wasser Lösung im Verhältnis 100:40:20:20:10 getränkt waren. Durch dieses Lösungsmittel, welches die Platten

Methoden

befeuchtete, konnten die Proben den Chromatographen durchlaufen und ein spezifisches Bandenmuster bilden [78].

PKC Isoformen sind eine Gruppe strukturell und funktionell verwandter Proteine, welche auf verschiedenen Genen codiert werden und durch alternatives splicing entstehen [43]. Steigt der DAG Gehalt der Zelle, werden PKC Isoformen aktiviert. Zurzeit sind 12 Isoenzyme der PKC bekannt. Diese werden in drei Gruppen unterteilt: klassische (cPKC α , β I, β II, γ), neue (nPKC δ , ϵ , θ , η) und atypische Isoformen (aPKC ζ , ι/λ) [43]. Die PKC Isoformen regulieren diverse intrazelluläre Prozesse durch Phosphorylierung abhängiger Kinasen und Substratproteine. Die PKC wird durch die Aktivierung aus dem Cytosol an die Zellmembran verlagert. Die Menge der durch diese Translokation an die Zellmembran gebrachten PKC Isoformen gilt als ein Maß für deren Aktivierung.

Durch Chemolumineszens konnten membranöse und cytosolische Proteine mittels verschiedener Dichte in der gleichen Beleuchtungszeit sichtbar gemacht werden. Die PKC Translokation wurde durch die Ratio von membranösen Banden zu cytosolischen Banden berechnet. Die Dichte der membranösen Banden wurde zu der Dichte der Na⁺/K⁺-ATPase korrigiert, die der cytosolischen Bande zu der Dichte der Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase [79].

3.2.8 In-vivo-Messung des Triglyzeridgehalts im Muskel

In einer Subgruppe wurde die in-vivo-Messungen des Muskeltriglyzeridgehalts am 3 Tesla Ganzkörper Magnet-Resonanz-Tomographen (3T Philips X-series Achieva MRT, Best, The Netherlands) durchgeführt. Zunächst wurden eine Serie sogenannter Scout-Bilder angefertigt, um die für die Untersuchung interessanten Bereiche (VOI: Voxels of Interest) festzulegen. Der Fettgehalt wurde durch die ¹H Magnet-Resonanz-Spektroskopie (MRS) bestimmt. Hierzu legten sich die Probanden in Rückenlage auf den MRT-Untersuchungstisch. An die linke Wade der Probanden wurde eine FLEX-S Spule (Philips Healthcare, Best, The Netherlands) angebracht. Eine single-voxel-PRESS Sequenz (TR/TE=2,000/32 ms) wurde mit einer Voxel Größe von ca. 2cm am M. soleus platziert. Für die Prozessierung der MR Spektren wurde jMRUI genutzt. Um alle Spitzenausschläge zu registrieren, ging man nach einem Routineverfahren vor. Um die Lipid-Quantifikation durchzuführen, wurden alle Signale von mittelkettigen Methylgruppen (-CH₂, bei 1,3ppm) im Verhältnis zum Signal, welches Wasser im gleichen Voxel aussendet, evaluiert [80].

Methoden

Diese Untersuchung wurde durch die Arbeitsgruppe "Metabolic Imaging" des DDZ durchgeführt.

3.3 Berechnungen und Statistik

Die basalen Raten des Glukosevorkommens (R_a) wurden durch die non-steady state Gleichung nach Steele erhoben [81]. Die Tracer d-[6,6- $^2\text{H}_2$]Glukose Infusionsrate wurde durch die prozentuale Traceranreicherung im Plasma dividiert. Von diesem Ergebnis wurde dann die Tracer Infusionsrate abgezogen [81]. Die EGP konnte durch die Differenz zwischen R_a und dem Mittelwert der Glukose-Infusionsrate berechnet werden.

Alle statistischen Analysen wurden durch das Programm SPSS 6.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Alle Daten in dieser Arbeit werden als Mittelwerte der Probanden und der als solche gekennzeichneten Standardabweichung angegeben (\pm SD). Um signifikante Unterschiede zwischen den Probandengruppen feststellen zu können, nutzten wir ANOVA und post hoc Tukey. Alle errechneten Korrelationen sind Pearson Korrelationen (R).

3.4 Arbeitsplatz

Alle Studien wurden am Institut für klinische Diabetologie am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ, Direktor: Prof. Roden) in Düsseldorf durchgeführt. Alle Kosten für Betriebsmittel und Labormaterialien wurden durch das DDZ gedeckt.

4. Ergebnisse

4.1 Anthropometrische Daten

Tabelle 4 zeigt anthropometrische Daten und Labor-Parameter der Studienteilnehmer, welche Studienprotokoll 1 und 2 durchliefen (Abb.3 und 4).

	OBE	T2DM	CON
Anzahl (männlich/ weiblich)	10 (5/5)	10 (5/5)	36 (24/12)
Alter (Jahre)	29 ±2	59 ±3*	28 ±1
Body Mass Index (BMI) (kg/m ²)	41.4 ±1.9	35.6 ±1.2	22.4 ±0.4**
Nüchternwert Glukose (mg/dl)	77 ±3	131 ±17*	86 ±3
Freie Fettsäuren (mmol/l)	0.50 ±0.18	0.76 ±0.15	0.52 ±0.13
Triglyzeride (mg/dl)	137 ±24	188 ±20*	106 ±13
HbA1c (mmol/mol)	34 ±1	54 ±5*	33 ±0

Tabelle 4. Anthropometrische Daten und Laborparameter der Teilnehmer an Studienprotokoll 1 und 2. 10 adipöse Glukosetolerante(OBE), 10 Teilnehmer mit Diabetes Typ 2(T2DM) sowie 36 Probanden der Kontrollgruppe(CON). Alle Werte werden als Mittelwert± SEM angegeben. *P<0.05 vs. gesunde Kontrollgruppe und Adipöse. **P<0.05 vs. Adipöse und T2DM-Gruppe

Die Probanden mit T2DM sind älter als die Teilnehmer der anderen beiden Gruppen (P<0.05). Zudem zeigen sie höhere Nüchternwerte für Blutglukose, TAG und HbA1c im Vergleich zu den Probanden der adipösen Gruppe und der Kontrollgruppe (P<0.05). Die Teilnehmer der adipösen Gruppe zeigen einen höheren BMI als die Teilnehmer der Kontrollgruppe (P<0.05). Die mittlere körperliche Aktivität, gemessen durch den Baecke-Index, ist zwischen CON, OBE und T2DM vergleichbar (2.4±0.5; 2.6±0.6; 2.5±0.7).

Ergebnisse

4.2 Glukoseaufnahme, Energieverbrauch und Substrat-Oxidation

Abbildung 5 veranschaulicht die Ergebnisse der insulinstimulierten Glukoseaufnahme des Gesamtkörpers. Diese ist in CON am höchsten. OBE (P=0.005) zeigen 78% und T2DM (P=0.001) um 88% geringere Werte.

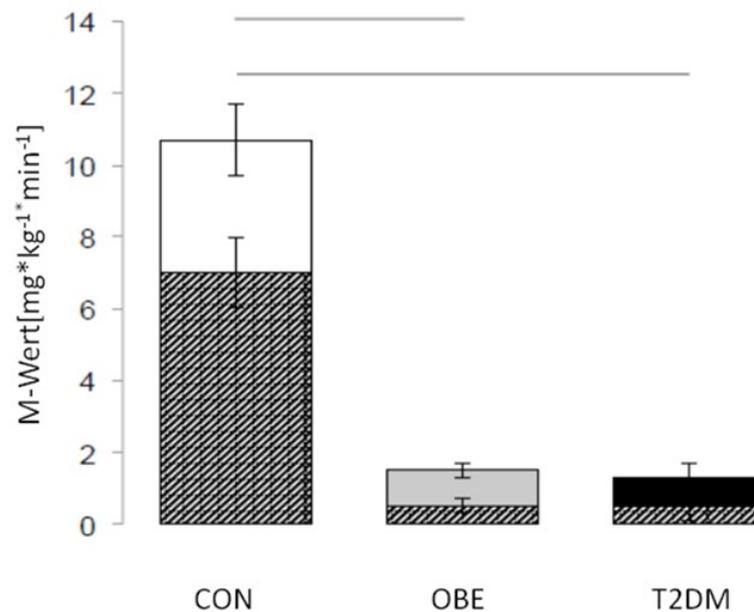


Abb. 5. Insulinsensitivität des Gesamtkörpers. Werte in gesunder Kontrollgruppe (M-Wert[mg*kg⁻¹*min⁻¹]) (CON, weiße Säule, n= 36), von adipösen Probanden (OBE, graue Säule, n= 10) und in Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM, schwarze Säule, n= 10). Die Glukoseoxidation wird schraffiert dargestellt, die Lipidoxidation ohne Schraffierung. Im Vergleich zu CON zeigt sich der Glukosestoffwechsel um 78% reduziert bei OBE (p<0.005) und um 88% bei T2DM (p<0.001). Alle Daten als Mittelwert±SEM.

Die Glukoseoxidation ist deutlich höher in CON als in OBE und T2DM (P<0.05).

4.3 Myozelluläre Lipid- Metabolite

Die gesamte DAG Konzentration ist um 1,5 bzw. 2 mal höher bei OBE und T2DM im Vergleich zu CON (P< 0.01 vs. CON.) Der DAG Gehalt in den Membranen ist in OBE im Vergleich zu CON nicht erhöht, zeigt sich aber bei den T2DM um 30 % höher als bei CON und OBE (P<0.001, Abb. 6). Die Werte der cytosolischen DAG Konzentration sind bei den adipösen Probanden um 85% höher als bei CON (P<0.001). Der Vergleich zwischen T2DM und CON erbringt einen Unterschied von sogar 120% (P<0.005 vs. CON). Der myozelluläre Gehalt der Ceramide und Ceramid-Spezies ist in allen Gruppen vergleichbar.

Ergebnisse

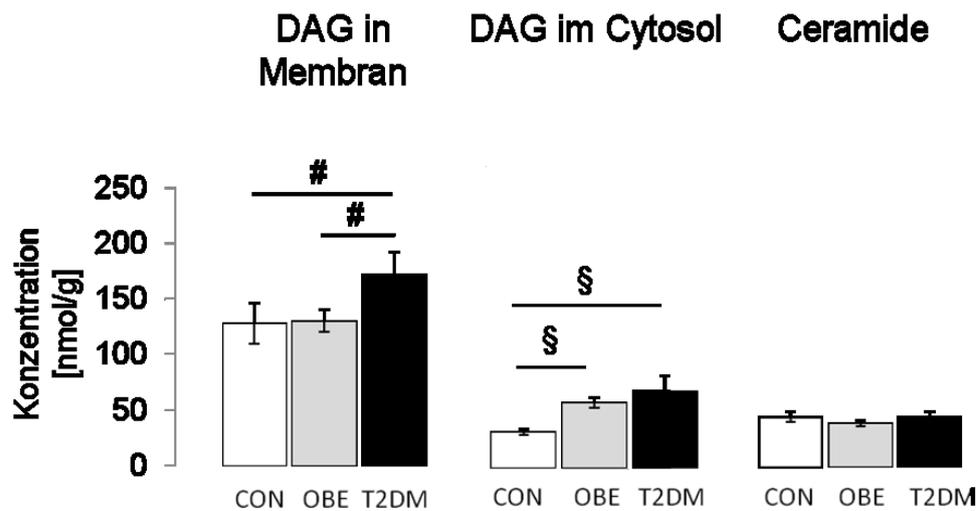


Abb. 6. Diacylglycerol in Membranen und Cytosol, sowie Ceramide im Skelettmuskel. Chronische Insulinresistenz ist assoziiert mit erhöhter myozellulärer DAG Konzentration in Membran und Cytosol und niedriger in Probanden der Kontrollgruppe (CON) (erste, weiße Säulen n=16) im Vergleich zu Adipösen (OBE, zweite, weiße Säule n=10) und Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM, schwarze Säule, n=10). Alle Daten als Mittelwert±SEM; #p<0.01; \$p<0.001

Muskuläre Acylcarnitine waren zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich (CON: 203±25, OBE:176±22, T2DM: 175±22nmol/g).

Ergebnisse

Die Aktivierung von PKC θ (siehe Abb.7) ist bei T2DM um 64% größer ($P<0.05$) als bei CON. Auch OBE zeigen hier erhöhte Werte (35% erhöht, $P<0.05$ vs. CON). Im Vergleich zu OBE zeigt sich bei T2DM eine um 22% höhere Aktivierung der PKC θ ($P<0.05$).

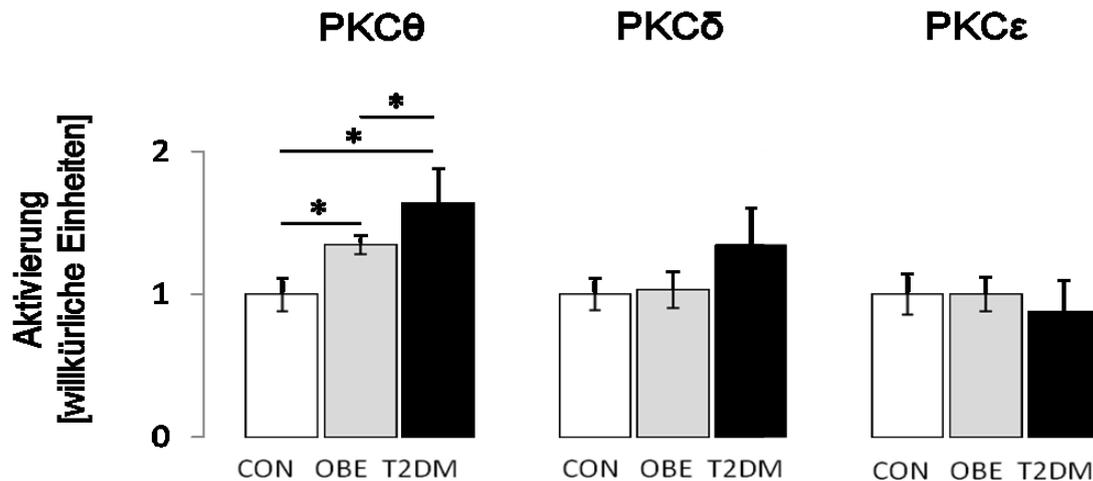


Abb. 7 Aktivierung der Proteinkinase-C Isoformen. Aktivierung von Proteinkinase-C PKC θ , δ und ϵ in Probanden der Kontrollgruppe (CON, erste, weiße Säulen $n=16$), in Adipösen (OBE, zweite, weiße Säule $n=10$) und Patienten mit Typ 2 Diabetes (T2DM, schwarze Säule, $n=10$). Chronische Insulinresistenz ist assoziiert mit Aktivierung der PKC θ . Alle Daten als Mittelwert \pm SEM; * $p<0.05$.

Die Translokation von Cytosol zu Membran als Maß der Aktivierung der PKC δ und PKC ϵ unterscheidet sich nicht zwischen den einzelnen Gruppen. Die PKC θ Aktivierung korreliert negativ mit der Insulinsensitivität ($r = -0.575$, $P<0.005$) aber positiv mit der Konzentration von FFS im Plasma ($r = 0.428$, $P<0.05$), BMI ($r = 0.436$, $P<0.05$) cytosolischen DAG ($r = 0.441$, $P<0.05$), DAG in der Membran ($r = 0.410$, $P<0.05$) und auch mit spezifischen cytosolischen und membranösen DAG Spezies. PKC θ Aktivierung hat weder eine Assoziation mit dem totalen Gehalt der Ceramide noch mit dem Gehalt von Ceramid-Spezies.

Die speziellen DAG Fraktionen der Membran und des Cytosols sind in Abbildung 8 angegeben. Die Ergebnisse zeigen erhöhte Werte bei OBE und T2DM für bestimmte DAG Untergruppen.

Ergebnisse

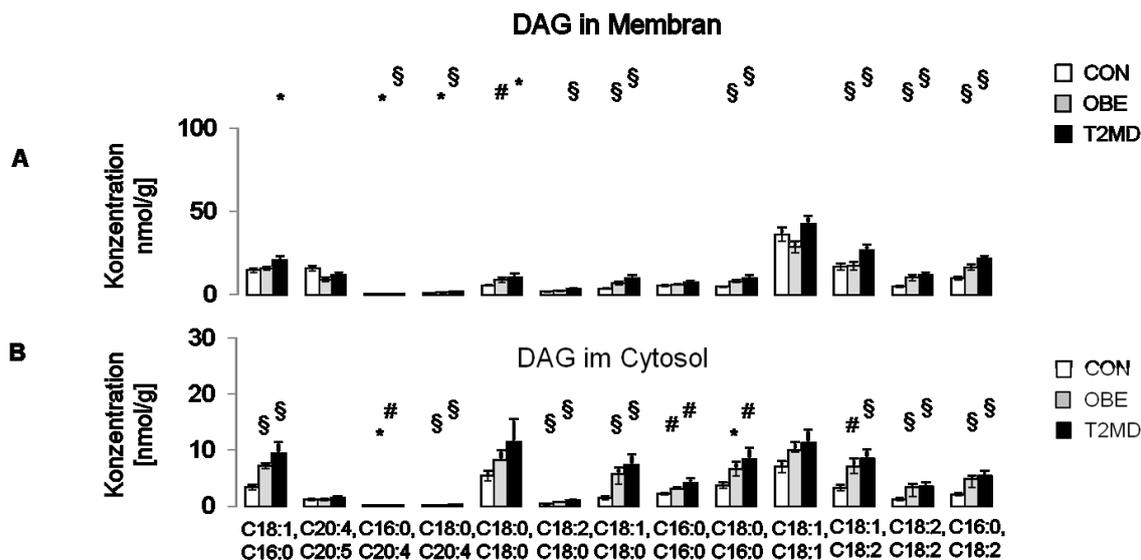


Abb. 8. Muskulärer Diacylglycerol Gehalt in der Membran und im Cytosol. Diacylglycerol (DAG) Gehalt in den Membranen (A) und im Cytosol (B) der drei Probandengruppen: gesunde Kontrollgruppe (CON), weiße Säulen n=16), Adipöse (OBE), graue Säulen n=10) und Probanden mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM schwarze Säulen n=10) im Vergleich. Alle Angaben als Mittelwert±SEM. *, p<0.05; #, p<0.01; \$, p<0.001 OBE und T2D vs. CON.

Die speziellen DAG Spezies der Membran (Abb. 8A) und des Cytosol (Abb. 8B) sind bei chronisch Insulinresistenten (T2DM und OBE) erhöht.

Erhöhte DAG in der membranösen Fraktion von Probanden mit chronischer Insulinresistenz finden sich bei Acylresten mit C18:1, C16:0 (P<0.05 T2D vs. CON), C16:0, C20:4 (P<0.05 OBE vs. CON, P<0.0005 T2D vs. CON), C18:0, C20:4 (P<0.05 OBE vs. CON, P<0.0005 T2D vs. CON), C18:0, C18:0 (P<0.005 OBE vs. CON, P<0.01 T2D vs. CON), C18:2, C18:0 (P<0.0005 T2D vs. CON), C18:1, C18:0 (P<5.10⁻⁴ OBE vs. CON, P<0.0005 T2D vs. CON), C16:0, C16:0 (P<0.05 T2D vs. CON), C18:0, C16:0 (P<10⁻⁵ OBE vs. CON, P<0.001 T2D vs. CON), C18:1, C18:2 (P<0.05 T2D vs. CON), C18:2, C18:2 (P<0.001 OBE vs. CON, P<10⁻⁵ T2D vs. CON) and C16:0, C18:2 (P<0.001 OBE vs. CON, P<10⁻⁵ T2D vs. CON).

Erhöhte DAG in der cytosolischen Fraktion von Probanden mit chronischer Insulinresistenz finden sich bei Acylresten mit C18:1, C16:0 (P<10⁻⁵ OBE vs. CON, P<0.005 T2DM vs. CON), C16:0, C20:4 (P<0.05 OBE vs. CON, P<0.005 T2DM vs. CON), C18:0, C20:4 (P<10⁻⁴ OBE vs. CON, P<10⁻⁴ T2DM vs. CON), C18:2, C18:0 (P<0.005 OBE vs. CON, P<0.0005 T2DM vs. CON), C18:1, C18:0 (P<0.0005 OBE and T2D vs. CON), C16:0, C16:0 (P<0.01 OBE and T2DM vs. CON), C18:0, C16:0 (P<0.05

Ergebnisse

OBE vs. CON, $P < 0.01$ T2DM vs. CON), C18:1, C18:2 ($P < 0.005$ OBE vs. CON, $P < 0.001$ T2DM vs. CON), C18:2, C18:2 ($P < 0.0005$ OBE vs. CON, $P < 0.001$ T2D vs. CON) and C16:0, C18:2 ($P < 10^{-5}$ OBE vs. CON, $P < 0.0005$ T2D vs. CON). Vor allem C16:0; C18:0, C18:1; C18:2 und 20:4 zeigen eine starke Assoziation mit PKC θ . Diese DAG Spezies waren auch in der kurzzeitig durch Lipid-Infusion induzierten Insulinresistenz angestiegen. In der gesamten Studien-Population lässt sich eine Assoziation dieser DAGs mit chronischer Insulinresistenz zeigen.

4.4 Korrelationsanalysen

Korrelations-Analysen über die gesamte Probandengruppe zeigten, dass der DAG Gehalt im Cytosol negativ mit dem M-Wert korreliert ($R = -0.566$, $P < 0.001$) und eine positive Korrelation mit dem BMI hat ($R = 0.509$, $P = 0.005$). Der DAG Gehalt der Membranen korreliert weder mit der Insulinsensitivität noch mit dem BMI. Allerdings konnte für eine Reihe von bestimmten membranösen und cytosolischen DAG Spezies eine negative Korrelation zur Insulinsensitivität und eine positive Korrelation mit dem BMI bewiesen werden.

Korrelationen von C18:0 und C18:2 ($R = -0.441$, $P < 0.05$), C16:0 und C18:2 ($R = -0.479$, $P < 0.05$) der cytosolischen DAG mit Insulinsensitivität blieben trotz Adjustierung für den BMI bestehen. Unter den membranösen DAG zeigen sich bei C18:0 und C20:4 ($R = -0.416$, $P < 0,05$), C18:0 und C18:2 ($R = -0.492$, $P < 0.05$), C18:1 und C18:2 ($R = -0.403$, $P < 0.05$), C18:2 und C18:2 ($R = -0.410$, $P < 0.05$) und auch C16:0 und C18:2 ($R = -0.619$, $P < 0.005$) negative Korrelationen zu Insulinsensitivität. Auch diese blieben nach Adjustierung für den BMI bestehen.

Protektiv könnten membranöse DAG mit den Acylresten C20:4 und C20:5 wirken, da beide negativ mit dem BMI und positiv mit dem M-Wert korrelierten.

Nach Adjustierung für Insulinsensitivität hob sich der Zusammenhang zwischen cytosolischen oder membranösen DAG Spezies mit dem BMI auf.

4.5 Die Hemmung des Insulinsignalweges

Um die Auswirkungen einer kurzzeitig erhöhten Lipidzufuhr auf die Insulinsensitivität des Muskels von gesunden Probanden zu testen, wurde eine Lipidinfusion verabreicht. Zum Vergleich wiederholten wir den Versuchsaufbau an einem anderen Tag mit einer Glycerolinfusion und untersuchten den Insulinsignalweg unter beiden Bedingungen.

Ergebnisse

Die Phosphorylierung am inhibitorischen Serinrest 1101 des Insulinrezeptor-Substrats 1 (IRS1-Ser1101-Px) zeigt sich nach der Lipidinfusion 2-fach erhöht ($P < 0.005$). Im Gegensatz dazu bleibt die Phosphorylierung bei Glycerolinfusion unverändert (Abb. 9A).

Bei Glycerolinfusion zeigt sich in der hyperinsulinämischen Phase eine um 184% stärkere ($P < 0.05$) Phosphorylierung von PI3K als bei Lipidinfusion (Abb. 9B).

Hyperinsulinämie erhöht auch die Membran/Cytosol Ratio der Akt-Phosphorylierung am Serin473 (Akt-Ser473-Px) um das Dreifache während Glycerol verabreicht wird ($P < 0.001$ basal vs. insulinstimuliert). Im Lipid-Versuch lässt sich keine Änderungen der Akt-Phosphorylierung am Ser473 feststellen (Abb. 9C). Daraus lässt sich ableiten, dass die Aktivierung des Insulinsignalweges durch Lipidinfusion gehemmt wird, nicht aber durch Glycerolinfusion (Abb. 9.).

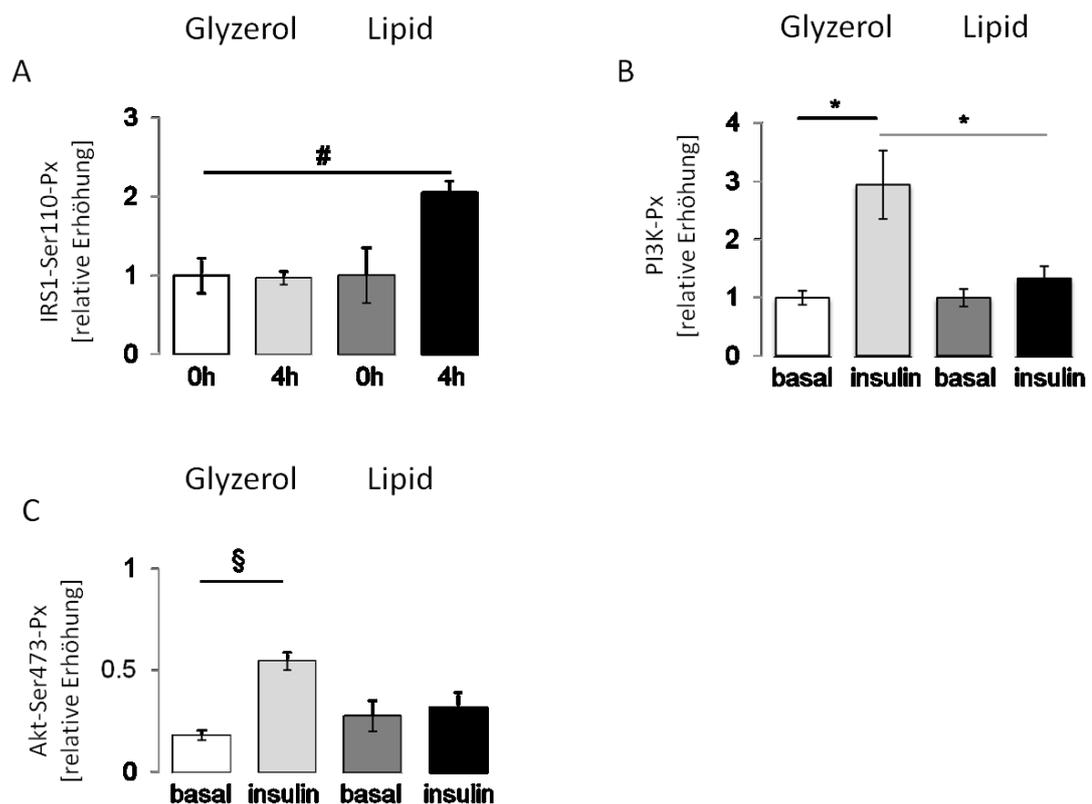


Abb. 9. Lipid Infusion hemmt das Insulinsignal im Skelettmuskel. Phosphorylierung des Serin Rests 1101 am Insulinrezeptor Substrat 1 (IRS1-Ser1101-Px) (A) basal und die relative Erhöhung nach 4 Stunden Glycerolinfusion (weiße und hellgraue Säulen) bzw. Lipidinfusion (dunkelgraue und schwarze Säulen) in gesunden Probanden (CON (n=7)). Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K-Px) (B) und Membran/Cytosol Ratio von Aktin-Serin473 Phosphorylierung (Akt-Ser473-Px) (C). Jeweils aus Biopsiematerial welches in der basalen Phase des Clamp Tests und nach 4,5 Stunden Glycerol (hellgraue Säulen) bzw. Lipid (schwarze Säulen) nach 30 minütiger Insulinstimulation in CON (n=7) entnommen wurde. Alle Daten als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$; #, $p < 0.01$, §, $p < 0.001$

Ergebnisse

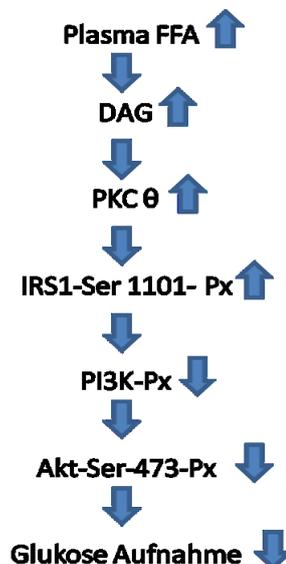


Abbildung 10. Lipid-induzierte akute Insulinresistenz. Das Schema zeigt die einzelnen Schritte der Lipid-induzierten, akuten Insulinresistenz auf zellulärer Ebene. Erhöhte freie Fettsäuren (FFS) führen zu erhöhten myozellulären Diacylglycerolen (DAG), als Konsequenz steigt die Phosphorylierung (Px) von IRS1-Ser1101-Px, dadurch vermindert sich die Phosphorylierung von Phosphotydylinositol 3 Kinase (PI3K-Px), was zu verminderter Phosphorylierung von Aktin-Serin 473 Phosphorylierung (Akt- Ser473-Px) und schließlich zu einer insgesamt verminderten Glukoseaufnahme führt. Modifiziert nach Szendroedi, J. et al., Proc Natl Acad Sci, 2014 [82]

Abbildung 10 verdeutlicht diese Ergebnisse und zeigt den negativen Einfluss erhöhter FFS auf den Insulin-Signalweg via DAG assoziierter Aktivierung der PKC θ .

4.6 In-vivo-Messung von IMCL

An diesem Protokoll nahmen 30 Probanden teil. Ihre Merkmale zeigt Tabelle 5. Die Kontrollgruppe bestand aus 10 jungen, gesunden, schlanken Probanden (CON) sowie 10 jungen, glukosetoleranten aber insulinresistenten Adipösen (OBE) und 10 älteren Patienten mit T2DM.

	OBE	T2DM	CON
Anzahl (männlich/weiblich)	10 (6/4)	10 (6/4)	10 (6/4)
Alter (Jahren)	31.0 \pm 2.0*	61.3 \pm 2.2	28.0 \pm 0.8*
Body Mass Index (BMI) (kg/m ²)	34.3 \pm 0.5*	32.0 \pm 0.8	23.2 \pm 0.5*,**
Nüchternwert Glukose (mg/dl)	79 \pm 3*	138 \pm 14	75 \pm 2*

Ergebnisse

Freie Fettsäuren (mmol/l)	0.50±0.029	0.571±0.061	0.35±0.054
Triglyzeride (mg/dl)	144±29	131±16	75±13
HbA1c (mmol/mol)	5.3±0.1	7.2±0.4	5.1±0.1

Tabelle 5. Probanden mit in vivo Messung der muskulären Triglyzeride. 10 adipöse glukosetolerante aber insulinresistente (OBE), 10 Teilnehmer mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) und 10 junge, insulinsensitive Probanden der Kontrollgruppe (CON). In allen Gruppen jeweils 6 Männer und 4 Frauen. Das Alter ist in Gruppe OBE zu CON vergleichbar. OBE und T2DM haben einen höheren Body Mass Index (BMI) als CON. Alle Werte werden als Mittelwert± SEM angegeben. ANOVA mit Bonferroni post hoc Test* $P<0.05$ vs. T2DM, ** $P<0.05$ vs. OBE

OBE und T2DM hatten einen höheren BMI im Vergleich zu CON ($P<0.05$) T2DM waren älter als CON und OBE ($P<0.05$). T2DM zeigten eine um 45% höhere Nüchtern glukose als OBE und CON. FFS im nüchternen Zustand schienen bei CON am niedrigsten, jedoch konnte nach dem Multiple-comparison-Test keine Signifikanz festgestellt werden ($P=0.12$ und $P=0.10$). Die Werte für TAG unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant nach Multiple-comparison-Test (T2DM: 131±16 mg/dl und OBE: 144±29 mg/dl vs. CON: 75±13 mg/dl; $P=0.25$ and $P=0.17$). Der IMCL Gehalt des Skelettmuskels (M. soleus) wurde in vivo mittels ^1H MRS bestimmt. Wie in Abb. 11 gezeigt wird, waren IMCL bei T2DM dreifach höher als bei CON ($P<0.05$). Zwischen OBE und CON ließ sich kein Unterschied feststellen ($P=0.57$).

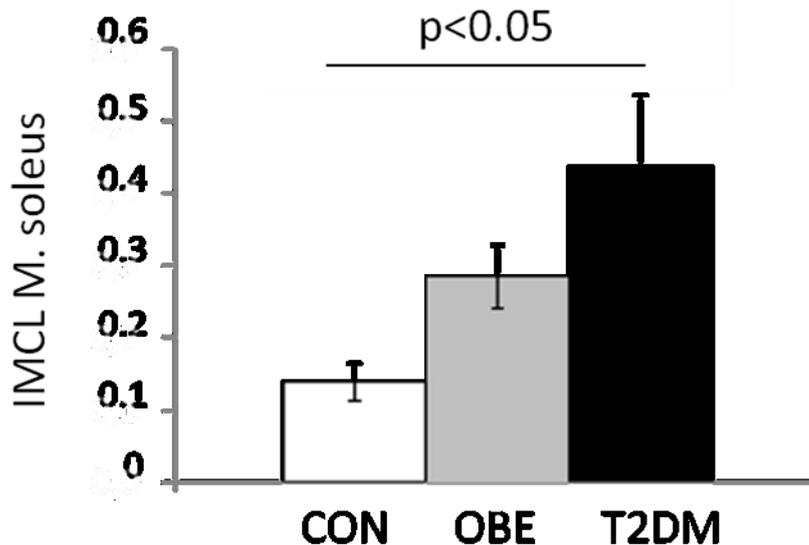


Abb. 11. Intramyocelluläre Triglyzeride. Messung des intramyocelluläre-Lipid (IMCL) Gehalts [%] in gesunden, jungen, insulinsensitiven Probanden (CON, weiße Säule, n=8), in jungen, adipösen, insulinresistenten aber glukosetoleranten Probanden (OBE, graue Säule, n=8) und in Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM, schwarze Säule, n=9). Alle Daten als Mittelwert±SEM.

5. Diskussion

Diese Studie zeigt die Mechanismen der Lipid-induzierten Insulinresistenz im Skelettmuskel von gesunden Probanden im Vergleich zu Probanden mit chronischer Insulinresistenz.

5.1 DAG und PKC Isoformen in den unterschiedlichen Probandengruppen

Die DAG Spezies mit den Acylresten C16:0, C18:0, C18:1 und C18: 2 sowie C20:4, welche sich bei T2DM und OBE vermehrt in der Muskelmembran und im Cytosol finden, scheinen einen starken Einfluss auf die PKC θ zu haben. Diese geänderte Zusammensetzung führt zu einer verstärkten Aktivierung der PKC θ , welches von gesteigerter, inhibitorischer IRS-Ser1101-Px, gestörter PI3K Aktivierung und Akt-Ser473-Px gefolgt wird. Im Gegensatz dazu finden wir keinen Anhalte dafür, dass erhöhte muskuläre Ceramide oder Acylcarnitine im Zusammenhang mit muskulärer Insulinresistenz stehen. Der totale cytosolische DAG Gehalt in T2DM und OBE ist zwar erhöht, der Ceramidgehalt im Skelettmuskel jedoch nicht. Zudem zeigt sich, dass in den insulinresistenten T2DM und Adipösen DAG Spezies, welche C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 oder C20:4 FFS enthalten, die stärkste Beziehung zur PKC θ - Aktivierung haben. Aus diesen genannten FFS führt am häufigsten C18:2 zur chronischen und auch akuten Insulinresistenz sowie zur PKC θ -Aktivierung. Besonders DAG Untereinheiten, welche C18:2 beinhalten, korrelieren positiv mit Insulinresistenz, unabhängig von Körpergewicht. Dies lässt vermuten, dass cytosolische DAG als eine Art Lipid-Pool fungiert.

Kurzzeitige Erhöhung der plasmatischen FFS Konzentration reduziert die insulinstimulierte Glukoseaufnahme. Dies geht einher mit reduziertem Glukosetransport, Px und Speicherung der Glukose als Glykogen im Muskel [30, 83, 84]. Das frühe Abflachen der anfänglich erhöhten Glukose-6-Phosphat Spiegel während kombinierter Lipid- und Insulin-Infusion [13] argumentiert gegen einen konzentrationsabhängigen Defekt der Glukose-Oxidierung (Randle Zyklus) [85] unter diesen Bedingungen im Menschen.

Des Weiteren begünstigen gestörte Lipid-Oxidation [86], Beeinträchtigung der insulinstimulierten ATP Synthese durch Lipide [87] und relativer Mangel glykolytischer

Diskussion

Vorläufer des Zitratzyklus die Akkumulation von Acylkarnitinen [61]. Letzteres kann ein Grund für die niedrigere Glukoseaufnahme sein. In dieser Studie kann der Anstieg der myozellulären und plasmatischen Acylcarnitine nicht gezeigt werden.

In einigen früheren, an Nagern durchgeführten Studien zeigte sich Lipid- induzierte Insulinresistenz besonders in einem Anstieg an myozellulären Lipidmetaboliten wie Ceramide und DAG [88] , welche zu einer Inhibition des Insulinsignalwegs führten. Im Gegensatz dazu waren Studien an Menschen [78, 89] weniger eindeutig, da die Ergebnisse nicht einheitlich sind. Dies liegt vor allem an unterschiedlichen Studienprotokollen sowie Konzentration und Zusammensetzung der FFS. Interessanterweise zeigte sich kein Anstieg der totalen DAG- oder Ceramidkonzentration aufgrund einer Lipid-Infusion in adipösen, glukosetoleranten [90] oder schlanken, moderat trainierenden Probanden [91]. Dies kann wahrscheinlich durch eine höhere Rate der Lipid-Oxidation in gesunden, adipösen und sportlich aktiven Personen erklärt werden [92]. Sportliche Aktivität ist somit in der Lage den Lipid- induzierten Anstieg von DAG zu verhindern. Dies geschieht am ehesten durch die effektive Umwandlung von FFS zu TAG über die Aktivierung der Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) [93].

Das Zusammenspiel aus körperlicher Aktivität und Lipid-Oxidation kann die Substratverwertung im gesamten Körper während der Lipidinfusion beeinflussen. Daher ist der gesamte Gehalt an muskulärem DAG oder Ceramiden allein eventuell nicht in der Lage, die physiologische Rolle der einzelnen DAG Untereinheiten in zellulären Kompartimenten zu erklären. Zu erwähnen ist unter diesem Gesichtspunkt, dass wir für die vorliegende Studie Probanden ausgewählt haben, die alle in ähnlichem Maß körperlich aktiv waren, um die oben beschriebenen Effekte zu vermeiden.

Die Zusammensetzung der DAGs repräsentieren die Fettsäuren, welche im Organismus als Pool zirkulieren. Wir stellen fest, dass C16:0, C18:1, C18:2 und C20:4 beinhaltene DAGs in Adipösen und Probanden mit T2DM erhöht sind. C18:2 ist hierbei besonders hervorzuheben. Diese Fettsäure zeigte sich auch besonders erhöht bei Gesunden, welche eine Lipidinfusion zur kurzzeitigen Induktion von Insulinresistenz erhielten. C18:2 kann somit eine wichtige Rolle sowohl bei akuter als auch bei chronischer Insulinresistenz zugeschrieben werden.

5.2 Hemmung des Insulin-Signalweges

Diese Studie zeigt, dass bei jungen, gesunden Probanden, welche eine vierstündige Lipidinfusion erhalten, die myozelluläre IRS1-Ser1101-Px erhöht ist. Diese hemmende Phosphorylierung geht einher mit verminderter insulinstimulierter PI3K Aktivierung und Akt-Ser473-Px sowohl in der Membran als auch im Cytosol.

Die Aktivierung von PKC θ konnte bereits mit der IRS1-Ser1101-Px und der muskulären Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden [94]. Aber nur eine an Nagetieren durchgeführte Studie konnte eine Verbindung zwischen erhöhtem Palmitat im Organismus und einer Störung in der insulinstimulierten Akt Translokation zeigen [95].

Studien der vergangenen Zeit, die an Menschen den Effekt einer Lipidinfusion testeten, erbrachten den Nachweis der gestörten IRS1-Tyr-Px und PI3K-Px kombiniert mit reduzierter [96] oder gleichbleibender Akt-Px. Diese Studien ließen aber Lipid-Metaboliten oder PKC Aktivierung außer Acht [97]. Andere Studien wiederum konnten den Zusammenhang zwischen gestörter IRS1-Tyr-Px, PI3K-Px, IRS1 und AktSer473-Px trotz geminderter, insulinstimulierter Glukoseaufnahme nicht bestätigen [84, 91]. Diese Inkonsistenz kann durch Unterschiede in den Studienprotokollen, wie z.B. die Kombination der Lipid- und Insulininfusion, Dauer und Dosierung der Lipidinfusion, Zeitpunkt der Muskelbiopsie und natürlich durch individuelle Unterschiede der Probanden in z.B. Alter, sportlicher Aktivität und Glukosetoleranz, zustande kommen.

Da eine Lipid-Infusion die Konzentration der zirkulierenden Zytokine im Organismus erhöhen kann, spricht dies für einen proinflammatorischen Status in insulinresistenten Menschen [98]. In der vorliegenden Studie beobachteten wir diesen Effekt nicht. Vor allem die gesättigten Fettsäuren scheinen in der Lage zu sein, das angeborene Immunsystem und Inflammation vermittelnde Kaskaden via Bindung an den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) zu aktivieren. TLR4 ist ein mustererkennender Rezeptor, der Lipopeptide und Lipopolysaccharide auf bakteriellen Zellwänden auf Makrophagen und Adipozyten erkennt.

Die Erhöhung von Ceramiden in Muskelzellen vermittelt durch die direkte Aktin Inhibierung eine Insulinresistenz. Die myozelluläre Konzentration von Ceramiden, sowohl des totalen Gehaltes als auch einzelner Unterspezies, ist aber in allen Probandengruppen

Diskussion

vergleichbar. Diese Ergebnisse wurden in einigen Studien mit Menschen bestätigt [78, 91], andere konnten den Nachweis nicht erbringen [99].

Der niedrige Gehalt an gesättigten Fettsäuren in der Lipidinfusion könnte dafür verantwortlich sein, dass die Ceramide im Verlauf des Versuchs nicht ansteigen. Demgegenüber gibt es Daten dazu, dass Insulinresistenz, welche durch gesättigte Fettsäuren herbeigeführt wurde, auch unabhängig von der Aktivierung des TLR4 und Ceramiden in der Leber von Nagetieren beobachtet werden konnte [100].

Es wurde auch gezeigt, dass Inflammationsmarker, wie Interleukin 6 (IL6), Adiponektin, RBP4 und sICAM-1, welche mit Insulinresistenz bei adipösen Probanden bzw. T2DM in Verbindung gebracht werden, während der Lipid- Infusion nicht anstiegen [101].

Diese Studie zeigt, dass gewöhnliche Insulinresistenz, welche bei Adipösen und T2DM beobachtet wird, häufig mit einem Anstieg des totalen DAG Gehalts im Skelettmuskel vergesellschaftet ist. Enzyme, die in die DAG Synthese involviert sind, z.B. Adipozyten-Triglyzerid-Lipase (ATGL), korrelieren negativ zur Insulinsensibilität [6]. Dem gegenüber steht, dass DAG Hydrolyse, Hormonsensitive Lipase (HSL) oder DAG Acyltransferase (DGAT), welche die Umwandlung zu Triglyceriden aus DAG und Acyl CoA katalysieren, vermindert in fettgefütterten Ratten [102] oder adipösen Menschen, finden ließen [6].

Andererseits zeigte sich, dass Adipöse mit normalem DAG Gehalt aber erhöhten Triglyzeriden über höhere muskuläre DGAT-Expression verfügten [103]. Die individuelle Kontrolle der Lipolyse im Skelettmuskel kann somit die Lipotoxizität und Insulinresistenz beeinflussen. Über diese individuellen Einflüsse kann wahrscheinlich am besten erklärt werden, warum einige Studien über unveränderten [103, 104] bzw. erhöhten, muskulären DAG Gehalt in adipösen Probanden [49, 105] berichteten.

Einige spezielle cytosolische und membranöse DAG Untereinheiten, welche C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 und C20:4 Verbindungen enthalten, können mit dem BMI als auch dem M-Wert in Verbindung gebracht werden. Nach Korrektur für den jeweiligen BMI zeigen sich die Korrelationen sehr ausgeprägt für die Membranfraktion, insbesondere für die ungesättigten Fettsäuren (C18:1, C18:2 und C20:4) an einer oder zwei Bindungsseiten. Sind DAG Spezies, welche C18:1, C18:2 und C20:4 enthalten, erhöht, kann ihnen eine Beziehung zur kurzzeitig entstehenden Insulinresistenz während einer Lipidinfusion unterstellt werden. Wir zeigen, dass DAG Spezies der Membran, die C20:4 und C20:5

Diskussion

enthalten, positiv mit der Insulinsensitivität korrelieren. Dieser Effekt kann wahrscheinlich der C20:5 Verbindung zugeschrieben werden, die auch in Versuchen mit Tieren, welche sehr fetthaltig ernährt wurden, in der Lage zu sein schien, die Entwicklung einer Insulinresistenz zu verhindern [106].

Zuvor durchgeführte Studien zeigten, dass das Maß der DAG Sättigung positiv [104], negativ [57] oder nicht [107, 108] in Verbindung mit Insulinresistenz stand. Während diese zuvor genannten Studien die DAG Spezies im Allgemeinen untersuchten, gibt es auch eine neuere Studie, die sich mit den Untereinheiten der DAG Spezies beschäftigt [49]. In der gesamten Studiengruppe konnte gezeigt werden, dass membranöses DAG, welches C18:0 an beiden Bindungsseiten besaß, ein Marker der Insulinresistenz war. Membranöse DAG Spezies, welche gesättigte Fettsäuren C16:0 und C18:0 sowie C20:0 besaßen, werden bei Probanden, die an T2DM litten, häufiger beobachtet als bei glukosetoleranten, athletischen Probanden. Allerdings wurde auch von paradoxer Anreicherung einiger DAG Spezies in sehr sportlichen, stark trainierten Individuen berichtet [57]. Um diese Schwierigkeiten zu übergehen, schlossen wir nur untrainierte Probanden, welche einen hyperinsulinämischen Clamp Tests zur genauen Bestimmung der Insulinsensitivität durchliefen, in unserer Studie ein. Die plasmatische Fettsäuren C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 und C18:3 [109] zeigten sich bei chronischer Insulinresistenz erhöht. Ein Schlüsselenzym, welches gesättigte Fettsäuren zu Einzel-ungesättigten-Fettsäuren umwandelt, Stearoyl-CoA Desaturase1 (SCD1), war in Adipösen erhöht [110]. Die große Menge an DAG Spezies, welche C18:1, C18:2 und C20:4 enthalten, resultiert wahrscheinlich aus der Verfügbarkeit von plasmatischen Fettsäuren und muskulärem Lipidmetabolismus.

5.3 Alternative Ursachen der Insulinresistenz

In dieser Studie wurden auch alternative Ursachen, die für eine Entstehung der gemeinen Insulinresistenz verantwortlich sein könnten, untersucht.

Muskuläre Ceramide scheinen in keiner direkten Verbindung zu Markern der Insulinresistenz zu stehen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einiger [78, 91] aber nicht allen Studien [103]. Plasmatische Acylcarnitine können bei insulinresistenten Probanden besonders während Hyperglykämie erhöht sein. Dies wiederum zeigt den zellulären Mangel glykolytischer Vorläufer, welche für die vollständige Lipidoxidation nötig wären [111, 112]. Die Probanden der vorliegenden Studie sind entweder glukosetolerant oder metabolisch gut eingestellte T2DM, was erklären könnte, dass die Acylcarnitine nicht

Diskussion

ansteigen. Dies spricht auch gegen eine relevante Rolle der Acylcarnitine bei der Entstehung von Insulinresistenz. Adipöse und T2DM Patienten zeigen unveränderte plasmatische Konzentrationen von IL-6, retinol- bindendes Protein 4 (RBP-4) und soluble intracellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), welches einigen Studien entspricht [79] anderen jedoch nicht [113, 114].

Allerdings zeigt sich eine leichte Verminderung der plasmatischen Adiponektin Konzentration bei OBE und T2DM, was auch das Ergebnis anderer Kohortenstudien war.

5.4 Die Rolle der IMCL

Einige Studien beschäftigten sich in den vergangenen Jahren mit der durch falsche Ernährung und Lebensstil verursachten Anreicherung von Fett. Man beleuchtete nicht nur Fettgewebe sondern auch die ektope Speicherung von Lipiden in anderen Zellen des Körpers. Diese vorliegende Studie befasst sich nun mit der ektopen Lipidspeicherung im Skelettmuskel und der hiermit verbundenen Stoffwechselstörung in diesem Gewebe.

Es zeigt sich, dass T2DM den höchsten Gehalt an ektopen Lipiden in Form von IMCL aufweisen, während OBE verglichen zu CON relativ normale Werte präsentieren.

Insbesondere in Probanden, welche eine verminderte Insulinsensitivität aufweisen, scheinen diese ektopen Lipide von Bedeutung zu sein. In zuvor durchgeführten Studien wurden verschiedene Gründe des erhöhten IMCL Gehalts in den oben genannten Probandengruppen genannt. So gehen einige Autoren von einem erhöhten Angebot durch die Nahrungsaufnahme und einer daraus resultierenden erhöhten intrazellulären Lipidspeicherung aus [13]. Weiter vermuten diese Autoren eine durch IMCL verursachte Aktivierung inflammatorischer Pathways in den betroffenen Zellen, an deren Ende eine Störung des Insulinsignalwegs steht. Andere nennen die gestörte Lipidoxidation in den betroffenen Zellen für ursächlich [115].

Seit Längerem ist auch bekannt, dass insulinresistente Verwandte von T2DM Patienten erhöhte Werte für IMCL bei gleichzeitig erniedrigter Glukoseaufnahme verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe zeigten [59]. Auch Petersen et. al. [60] fanden einen um ca. 80-100% erhöhten IMCL Gehalt in Zellen von insulinresistenten Verwandten, was wiederum mit einer 30%-80% niedrigeren Flussrate der ATP Synthase (fATP) sowohl unter Nüchtern als auch insulinstimulierten Bedingungen einherging. Die fATP bestimmt die Netto ATP Produktion, welche aus der Substratoxidation resultiert, die schlussendlich

Diskussion

zur ATP Produktion führt (oxidative Phosphorylierung). Vererbte Abnormitäten der mitochondrialen Funktion könnten in diesen insulinresistenten Verwandten eine erhöhte Anreicherung von IMCL verursachen, welche im Verlauf zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines T2DM führen könnte.

In diesem Zusammenhang ist auch eine Studie interessant, welche die Bedeutung von Sport bei der Fettoxidation genauer beleuchtete [116]. So konnte gezeigt werden, dass die Fettoxidation sowie die Insulinsensitivität anstiegen, während der IMCL-Gehalt in adipösen, älteren Probanden sank. Es liegt nahe, dass ein Trainingsprogramm den Lipidverbrauch im Skelettmuskel erhöht und hierdurch auch die Insulinresistenz verringert werden kann.

Körperliche Fitness, gemessen an der maximalen aerobe Kapazität ($VO_2\text{max}$), erhöht sowohl IMCL als auch die Insulinsensitivität. Dies wird, wie bereits erwähnt, als Trainings Paradox beschrieben. Bei Ausdauersportlern fanden sich erhöhte IMCL Konzentrationen trotz einer sehr guten Insulinsensitivität. Als Ursächlich dafür wird bei diesen Autoren die oxidative Kapazität für die positive Beziehung zwischen IMCL und Insulinsensitivität gesehen [117, 118]. IMCL dienen als Energiereserve während intensivem aeroben Training in athletischen Sportlern [119]. In unспортlichen Menschen spiegelt der IMCL Gehalt des Muskels eher das Missverhältnis zwischen Energieangebot und -bedarf wieder. Die Analyse großer Populationen offenbarte einen Schwellenwert von $VO_2\text{max}$, ab welchem sich die negative Beziehung zwischen IMCL und Insulinsensitivität in eine positive umkehrte [118].

Unsere Daten zeigen, dass langjährige Insulinresistenz und Adipositas bei T2DM mit erhöhten IMCL assoziiert ist. Bei glukosetoleranten, jungen Adipösen ist jedoch DAG eindeutig mit Insulinresistenz assoziiert, während IMCL nicht erhöht sind. Eine primäre Rolle der IMCL bei der Entstehung der Insulinresistenz ist daher unwahrscheinlich. IMCL scheinen vielmehr, ein Marker für ektope Lipide im Sinn des gesamten intramyozellulären Lipidpools zu sein.

6. Schlussfolgerung

Diese Studie zeigt den Effekt einer kurzzeitig durch eine Lipidinfusion verursachten Insulinresistenz auf den Insulinsignalweg bei gesunden, jungen Probanden. Zudem werden Mechanismen und mögliche Ursachen der chronischen Insulinresistenz bei Adipösen und T2DM beleuchtet.

Erhöhter Gehalt der Muskelzelle an cytosolischem und membranösem DAG Spezies, welche C18:0, C18:1 oder C18:2 und zusätzlich auch C16:0 und C20:4 enthielten, sind verantwortlich für die Störung des proximalen Insulinsignalwegs via Stimulation der PKC θ induzierten Ser1101-Phosphorylierung des IRS1-1. Zudem führten diese DAG Subspezies zur PKC θ Aktivierung und chronischer Insulinresistenz, wie sie bei OBE und T2DM beobachtet werden kann.

Vorwiegend C18:2 beinhaltende DAG Spezies stehen im Zusammenhang mit der chronischen Insulinresistenz. Der totale Gehalt bzw. einzelne Untereinheiten von Ceramiden, Acylcarnitinen oder zirkulierenden Adipocytokinen waren nicht erhöht bei akut induzierter oder bereits bestehender, chronischer Insulinresistenz.

Eine wichtiges Ergebnis dieser Studie ist sicherlich, dass DAG, welches C18:2 enthält, die PKC θ aktiviert. Diese Erkenntnis eröffnet neue Strategien sowohl für die Prävention der Manifestation als auch für die Therapie von Insulinresistenz im Menschen.

Bei der primären Entstehung der Insulinresistenz scheinen IMCL eher unbedeutend zu sein. Zwar zeigen T2DM den höchsten IMCL Gehalt verglichen mit CON und OBE, aber es lässt sich keine Signifikanz zwischen OBE und CON zeigen. Unsere Daten zeigen, dass Probanden mit langjähriger Insulinresistenz und Adipositas erhöhtes IMCL zeigen. Insulinresistenz bei glukosetoleranten, jungen Adipösen ist aber eindeutig mit DAG und nicht IMCL assoziiert.

7. Literatur und Quellenverzeichnis

1. WHO, *Fact sheet N°312*. 2015, WHO
2. WHO. *Obesity and Overweight, Fact sheet No. 311*. 2012 01.2015; Available from: <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs311/en/>.
3. WHO, 2011. **Fact sheet 311**
4. Szendroedi, J., E. Phielix, and M. Roden, *The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus*. *Nat Rev Endocrinol*, 2012. **8**(2): p. 92-103.
5. Unger, R.H., *Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome*. *Endocrinology*, 2003. **144**(12): p. 5159-65.
6. Badin, P.M., et al., *Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans*. *Diabetes*, 2011. **60**(6): p. 1734-42.
7. Muoio, D.M. and P.D. Neufer, *Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle*. *Cell Metab*, 2012. **15**(5): p. 595-605.
8. Phielix, E., J. Szendroedi, and M. Roden, *Mitochondrial function and insulin resistance during aging: a mini-review*. *Gerontology*, 2011. **57**(5): p. 387-96.
9. Lowell, B.B. and G.I. Shulman, *Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes*. *Science*, 2005. **307**(5708): p. 384-7.
10. Schrauwen-Hinderling, V.B., et al., *Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects*. *Diabetologia*, 2007. **50**(1): p. 113-20.
11. Phielix, E., et al., *Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2008. **57**(11): p. 2943-9.
12. Krssak, M. and M. Roden, *The role of lipid accumulation in liver and muscle for insulin resistance and type 2 diabetes mellitus in humans*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2004. **5**(2): p. 127-34.
13. Roden, M., et al., *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2859-65.
14. WHO, *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. WHO, in *Technical Report*. 2000: Genf.
15. Quetelet, A., *Recherches sur le poids de l'homme aux differens ages*. *Nouv M`em Acad Roy Sci*, 1832. **7**: p. 1-43.
16. Bergman, R.N., et al., *A better index of body adiposity*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(5): p. 1083-9.
17. *Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies*. *Lancet*, 2004. **363**(9403): p. 157-63.
18. WHO. *BMI Classification*. Available from: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro3.html>.
19. The Lancet, E.O.P., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 – 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. 2014.
20. IDF, *International Diabetes Federation Atlas*. 2015, IDF.
21. Ogden, C.L., et al., *Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010*. *JAMA*, 2012. **307**(5): p. 483-90.
22. Flegal, K.M., et al., *Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010*. *JAMA*, 2012. **307**(5): p. 491-7.
23. WHO. *Diabetes Fact sheet No 312*. 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs312/en/>.

Literatur und Quellenverzeichnis

24. Florez, H. and S. Castillo-Florez, *Beyond the obesity paradox in diabetes: fitness, fatness, and mortality*. JAMA, 2012. **308**(6): p. 619-20.
25. Leonetti, F., et al., *Obesity, type 2 diabetes mellitus, and other comorbidities: a prospective cohort study of laparoscopic sleeve gastrectomy vs medical treatment*. Arch Surg, 2012. **147**(8): p. 694-700.
26. Alberti KGMM, D.R., Zimmet P, *International textbook of diabetes mellitus*.1997: New York.
27. WHO. *definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia*. 2006; Available from: <http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes.new.pdf>.
28. WHO, *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. 1999: Geneva.
29. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review*. Gerontology, 2009. **55**(4): p. 379-86.
30. Roden, M., et al., *Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans*. Diabetes, 1999. **48**(2): p. 358-64.
31. Roden, M. and G.I., *Applications of NMR spectroscopy to study muscle glycogen metabolism in man*. Annu Rev Med, 1999. **50**: p. 277-90.
32. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(3): p. 177-81.
33. Kerner, W.B., J., *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. Diabetologie 2015, 2015. **10**: p. 98- 101.
34. Morrish NJ, W.S., Stevens LK, Fuller JH, Keen H. , *Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes*. Diabetologia, 2001. **44Suppl 2**: p. 14-21.
35. Roglic, G., et al., *The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000*. Diabetes Care, 2005. **28**(9): p. 2130-5.
36. Julia Szendoedi, E.P.a.M.R., *Assessment of insulin sensitivity in the metabolic syndrome*, ed. C.D.Ba.S.H. 2011, Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell: .
37. Schrauwen-Hinderling, V.B., et al., *Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to a 1-week high-fat diet*. Obes Res, 2005. **13**(12): p. 2088-94.
38. Bachmann, O.P., et al., *Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2579-84.
39. Stannard, S.R., et al., *Fasting for 72 h increases intramyocellular lipid content in nondiabetic, physically fit men*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(6): p. E1185-91.
40. Lettner, A. and M. Roden, *Ectopic fat and insulin resistance*. Curr Diab Rep, 2008. **8**(3): p. 185-91.
41. Szendoedi, J. and M. Roden, *Ectopic lipids and organ function*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(1): p. 50-6.
42. Delarue, J. and C. Magnan, *Free fatty acids and insulin resistance*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(2): p. 142-8.
43. Timmers, S., P. Schrauwen, and J. de Vogel, *Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance*. Physiol Behav, 2008. **94**(2): p. 242-51.
44. Hoy, A.J., et al., *Glucose infusion causes insulin resistance in skeletal muscle of rats without changes in Akt and AS160 phosphorylation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(5): p. E1358-64.
45. Hager, S.R., A.L. Jochen, and R.K. Kalkhoff, *Insulin resistance in normal rats infused with glucose for 72 h*. Am J Physiol, 1991. **260**(3 Pt 1): p. E353-62.

Literatur und Quellenverzeichnis

46. Houdali, B., et al., *Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signalling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle*. *Diabetologia*, 2002. **45**(3): p. 356-68.
47. Kawanaka, K., et al., *Development of glucose-induced insulin resistance in muscle requires protein synthesis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 20101-7.
48. Laybutt, D.R., D.J. Chisholm, and E.W. Kraegen, *Specific adaptations in muscle and adipose tissue in response to chronic systemic glucose oversupply in rats*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(1 Pt 1): p. E1-9.
49. Bergman, B., et al., *Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans*. *Diabetologia*, 2012. **55**(4): p. 1140-1150.
50. Holland, W.L., et al., *Lipid mediators of insulin resistance*. *Nutr Rev*, 2007. **65**(6 Pt 2): p. S39-46.
51. Samuel, V.T., et al., *Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(31): p. 32345-53.
52. Koves, T.R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(39): p. 33588-98.
53. Roden, M., *How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle*. *News Physiol Sci*, 2004. **19**: p. 92-6.
54. Kraegen, E.W. and G.J. Cooney, *Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance*. *Curr Opin Lipidol*, 2008. **19**(3): p. 235-41.
55. Liu, L., et al., *Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p. 1679-89.
56. Befroy, D.E., et al., *Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2007. **56**(5): p. 1376-81.
57. Amati, F., et al., *Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes?* *Diabetes*, 2011. **60**(10): p. 2588-97.
58. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(2): p. 507-20.
59. Morino, K., et al., *Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3587-93.
60. Petersen, K.F., et al., *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(7): p. 664-71.
61. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance*. *Cell Metab*, 2008. **7**(1): p. 45-56.
62. Petersen, K.F., S. Dufour, and G.I. Shulman, *Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents*. *PLoS Med*, 2005. **2**(9): p. e233.
63. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. *Science*, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
64. Shoelson, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine, *Inflammation and insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1793-801.
65. Szendroedi, J. and M. Roden, *Mitochondrial fitness and insulin sensitivity in humans*. *Diabetologia*, 2008. **51**(12): p. 2155-67.
66. Maassen, J.A., J.A. Romijn, and R.J. Heine, *Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a*

- new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus.* Diabetologia, 2007. **50**(10): p. 2036-41.
67. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care, 2000. **23 Suppl 1**: p. S4-19.
68. Szendroedi, J., et al., *Abnormal hepatic energy homeostasis in type 2 diabetes.* Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1079-86.
69. Stingl, H., et al., *Lipid-dependent control of hepatic glycogen stores in healthy humans.* Diabetologia, 2001. **44**(1): p. 48-54.
70. Szendroedi, J., et al., *Effects of high-dose simvastatin therapy on glucose metabolism and ectopic lipid deposition in nonobese type 2 diabetic patients.* Diabetes Care, 2009. **32**(2): p. 209-14.
71. Szendroedi, J., et al., *Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in type 2 diabetes.* PLoS Med, 2007. **4**(5): p. e154.
72. Baecke, J.A., J. Burema, and J.E. Frijters, *A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies.* Am J Clin Nutr, 1982. **36**(5): p. 936-42.
73. Krebs, M., et al., *Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2153-60.
74. Krebs, M., et al., *Prevention of in vitro lipolysis by tetrahydrolipstatin.* Clin Chem, 2000. **46**(7): p. 950-4.
75. Schadowaldt, P., et al., *Indirect calorimetry in humans: a postcalorimetric evaluation procedure for correction of metabolic monitor variability.* Am J Clin Nutr, 2013. **97**(4): p. 763-73.
76. Krebs, M., et al., *The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man.* Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1600-7.
77. Tremblay, F., et al., *Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability.* Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2674-84.
78. Itani, S.I., et al., *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α .* Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2005-11.
79. Kumashiro, N., et al., *Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16381-5.
80. Hwang, J.H., et al., *Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(6): p. E1663-9.
81. Hother-Nielsen, O., et al., *Effect of hyperglycemia per se on glucose turnover rates in patients with insulin-dependent diabetes.* Metabolism, 1993. **42**(1): p. 86-93.
82. Szendroedi, J., et al., *Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(26): p. 9597-602.
83. Boden, G., et al., *Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake.* J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2438-46.
84. Storgaard, H., et al., *Dissociation between fat-induced in vivo insulin resistance and proximal insulin signaling in skeletal muscle in men at risk for type 2 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1301-11.
85. Bevilacqua, S., et al., *Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM.* Diabetes, 1990. **39**(3): p. 383-9.
86. Lanza, I.R., et al., *Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis.* Cell Metab, 2012. **16**(6): p. 777-88.
87. Brehm, A., et al., *Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle.* Diabetes, 2006. **55**(1): p. 136-40.

Literatur und Quellenverzeichnis

88. Holland, W.L., et al., *Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance*. Cell Metab, 2007. **5**(3): p. 167-79.
89. Novotny, B.e.a., *Mechanisms underlying the onset of oral lipid- induced skeletal muscle insulin resistance in humans*. Diabetes 2013.
90. Probandengruppe Vistisen, B., et al., *Effect of gender on lipid-induced insulin resistance in obese subjects*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(1): p. 61-8.
91. Hoeg, L.D., et al., *Lipid-induced insulin resistance affects women less than men and is not accompanied by inflammation or impaired proximal insulin signaling*. Diabetes, 2011. **60**(1): p. 64-73.
92. Perseghin, G., et al., *Normal insulin sensitivity and IMCL content in overweight humans are associated with higher fasting lipid oxidation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(3): p. E556-64.
93. Schenk, S. and J.F. Horowitz, *Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1690-8.
94. Kewalramani, G., et al., *Palmitate-activated macrophages confer insulin resistance to muscle cells by a mechanism involving protein kinase C theta and epsilon*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26947.
95. Alkhateeb, H., et al., *Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(3): p. E783-93.
96. Belfort, R., et al., *Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1640-8.
97. Kruszynska, Y.T., et al., *Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(1): p. 226-34.
98. Krogh-Madsen, R., et al., *Effect of short-term intralipid infusion on the immune response during low-dose endotoxemia in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(2): p. E371-9.
99. Straczkowski, M., et al., *Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1215-21.
100. Galbo, T., et al., *Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR-4 signaling and ceramide synthesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(31): p. 12780-5.
101. Nowotny, *Mechanisms underlying the onset of oral lipid- induced skeletal muscle insulin resistance in humans*. Diabetes, 2013.
102. Zhou, A.L., et al., *Dietary fat composition influences tissue lipid profile and gene expression in Fischer-344 rats*. Lipids, 2012. **47**(12): p. 1119-30.
103. Coen, P.M., et al., *Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(11): p. 2362-71.
104. van Hees, A.M., et al., *Skeletal muscle fatty acid handling in insulin resistant men*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(7): p. 1350-9.
105. Moro, C., et al., *Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3440-7.
106. Figueras, M., et al., *Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: improvement of the inflammatory status*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(2): p. 362-9.
107. Coen, P.M., et al., *Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 80-8.

108. Perreault, L., et al., *Altered intramuscular lipid metabolism relates to diminished insulin action in men, but not women, in progression to diabetes*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(11): p. 2093-100.
109. Suhr, S.T., et al., *Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14095.
110. Hulver, M.W., et al., *Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans*. Cell Metab, 2005. **2**(4): p. 251-61.
111. Huffman, K.M., et al., *Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women*. Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1678-83.
112. Mihalik, S.J., et al., *Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(9): p. 1695-700.
113. Yang, Q., et al., *Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes*. Nature, 2005. **436**(7049): p. 356-62.
114. Kado, S. and N. Nagata, *Circulating intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin in patients with type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 1999. **46**(2): p. 143-8.
115. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1130-41.
116. Solomon, T.P., et al., *Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults*. J Appl Physiol (1985), 2008. **104**(5): p. 1313-9.
117. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5755-61.
118. Thamer, C., et al., *Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(4): p. 1785-91.
119. Machann, J., et al., *Intramyocellular lipids and insulin resistance*. Diabetes Obes Metab, 2004. **6**(4): p. 239-48.

Danksagung

Zum Ende dieser Arbeit gilt vielen Menschen mein Dank.

Besonders hervorheben möchte ich zuallererst Prof. Dr. med. univ.DDr. h.c. Michael Roden. Als mein Doktorvater überließ er mir das Thema dieser Arbeit und begleitete die Versuche, die zur Entstehung dieser Dissertation nötig waren. Er gab mir die Möglichkeit, am Institut für klinische Diabetologie am DDZ Düsseldorf Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten zu erlangen. Zudem hat er mir während meiner Famulaturen auf der Station der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie der Universitätsklinik Düsseldorf die Möglichkeit gegeben, Wissenschaft und Praxis zu verbinden. Ohne seine Unterstützung, Kritik und Anregung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Szendrödi PhD, welche mir als meine direkte Ansprechpartnerin immer zur Seite stand. Sie hat mich an wissenschaftliche Arbeiten in Theorie und Praxis herangeführt und mir stets geholfen, wenn ich Fragen hatte. Viele Versuchstage haben wir gemeinsam erlebt. Ich habe viel von ihr, im Institut, bei der Arbeit mit Probanden und in der Stoffwechselambulanz der Uniklinik Düsseldorf, lernen dürfen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Energiestoffwechsel gilt mein Dank. Auch sie haben stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme während des Entstehungsprozesses der Arbeit gehabt. Zudem konnte ich viele praktische Fähigkeiten erlernen und üben. Dafür bedanke ich mich herzlichst insbesondere bei: Dr. Maria Fritsch, Dr. Esther Phielix, Dr. Chrysi Koliaki, Dr. Tomas Jelenik, Mirko Eßer, Kai Tinnes und Christel Führer.

Bei Dr. Jong-Hee Hwang, Dr. Roshan Livingstone und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Metabolic Imaging" im DDZ bedanke ich mich für die Erhebung der MRT Daten.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern von Herrn Nowotny im technischen Labor des DDZ. Insbesondere Herrn Nowotny selbst und Frau Irena Latta möchte ich für ihre Unterstützung bei der korrekten Aufarbeitung, Messung und Archivierung der Proben danken.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders, bei den Probanden, die an dieser Studie teilgenommen und ihre Zeit investiert haben. Die Versuchstage waren häufig sehr lang und nicht immer angenehm für sie. Trotzdem waren sie stets bereit, uns zu helfen und der Wissenschaft zu dienen. Dies verdient sehr großen Respekt, den ich ihnen auch mit der Fertigstellung dieser Dissertation zollen möchte.

Großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Thomas. Sie standen mir in der gesamten Zeit stets zur Seite und unterstützten mich, wo sie nur konnten. Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit als besonderen Dank für ihre Bemühungen sowohl während der Promotion als auch während des Studiums widmen.

Am Ende dieser Danksagung sollen zwei, für mich sehr wichtige, Menschen stehen. Herzlichst bedanke ich mich bei Stefanie Zimmermann. Als meine Freundin und Mitdotorandin am DDZ haben wir manche Hürde zusammen genommen. Ich bedanke mich außerordentlich für ihre Hilfen, Korrekturen und Anregungen während der gesamten Zeit. Sie war und ist sehr wichtig für mich.

Frank Dirkschnieder danke ich für alles, was er ist und für mich getan hat, nicht nur während der Entstehung dieser Dissertation.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eidesstatt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Bielefeld, 22. 02. 2018

Katharina Brockmann