

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. W. T. Knoefel

**Depotspezifisches Verhalten neuer**  
**Mediatorsubstanzen in Abhängigkeit vom**  
**BMI**

Untersuchungen zur sekretorischen Aktivität des viszeralen  
Fettgewebes im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe des  
Menschen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Vorgelegt von**  
**Miriam Kraus**  
**2018**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. W. T. Knoefel

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med M. Grandoch

Meinem Vater Alfons Nikolaus Willems  
1953-2011

*„Et si omnes, ego non“*

# Publikationen

## Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue

Raphaela Schlich, Miriam Willems, Sabrina Greulich, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, D. Margriet Ouwens, Bujar Maxhera, Artur Lichtenberg, Jürgen Eckel, Henrike Sell in *Mediators of Inflammation, Volume 2013 (2013), Article ID 982458, doi: 10.1155/2013/982458, 2013*

Adipose DPP4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro

Henrike Sell, Matthias Blüher, Nora Klöting, Raphaela Schlich, Miriam Willems, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, Arne Dietrich, Barbara A. Fielding, Peter Arner, Keith N. Frayn, Jürgen Eckel in *Diabetes Care, December 2013 36:12 4083-4090, 2013*

**Depotspezifisches Verhalten neuer**  
**Mediatorsubstanzen in Abhängigkeit vom**  
**BMI**

Untersuchungen zur sekretorischen Aktivität des viszeralen  
Fettgewebes im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe des  
Menschen

## **Zusammenfassung**

Übergewicht ist heutzutage weit verbreitet und geht mit einer Vielfalt von Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) und Koronarer Herzkrankheit (KHK) einher. Dies hängt unter anderem mit der gestörten Energiehomöostase und der Fettgewebsinflammation zusammen, die durch Adipokine mitbeeinflusst wird. Adipokine sind Proteine, die von Fettzellen exprimiert und sezerniert werden. Die meisten Adipokine werden in unterschiedlichem Maße vom viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen Fett sezerniert. Es ist bekannt, dass die unterschiedlichen Fettdepots des Menschen unterschiedlich mit dem Stoffwechsel interferieren. Viszerale Adipozyten gelten in der Entwicklung metabolischer Komplikationen als besonderer Risikofaktor, da sie in erhöhtem Maße bei übergewichtigen Menschen mit bereits aufgetretenen Folgeerkrankungen vorkommen.

In dieser Arbeit wurde die Sekretion und Expression des neuen Adipokins DPP-4 in subkutanen und viszeralen Adipozyten in schlanken und adipösen Probanden untersucht. Zudem wurde der Einfluss der Sekretionsprodukte verschiedener Fettdepots auf glatte Muskelzellen untersucht (*Crosstalk*). Es konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede in der Expression von DPP-4 zwischen den beiden Fettgeweben gibt; ebenso bestanden Verschiedenheiten bei Übergewichtigen, Diabetikern und Nichtdiabetikern. Analog dazu ließ sich die größte Proliferation von *vascular smooth muscle cells* (VSMCs) durch die Zugabe von konditioniertem Medium übergewichtiger Diabetiker demonstrieren. Beispielsweise war die Freisetzung von DPP-4 im viszeralen Fett adipöser Probanden im Vergleich zu subkutanem erhöht; auch war sie signifikant höher bei adipösen Patienten als bei Nichtdiabetikern und Schlanken. Die Expression von DPP-4 zeigte sich bei allen Patienten im viszeralen Fett deutlich erhöht, wobei bei adipösen Probanden die Expression sowohl im viszeralen als auch im subkutanen Fettgewebe höher war als bei schlanken Probanden. Es wurde zudem die Rolle von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welches als Mediator bei inflammatorischen Vorgängen wie der Adipositas gilt, untersucht. Eine Messung von VEGF in den konditionierten Medien der Probanden ergab eine erhöhte Freisetzung im viszeralen Fettgewebe der adipösen Probanden. Die Menge an VEGF korreliert dabei signifikant mit der proliferativen Wirkung der konditionierten Medien.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass die hier aufgeführten Ergebnisse die Hypothese bestärken, dass viszerale Fettdepots insbesondere bei Adipositas eine Quelle von bekannten und neuen Adipokinen darstellen. Durch Einflussnahme auf die Expression und Sekretion dieser Adipokine bzw. die Erweiterung des Indikationsspektrums bereits vorhandener Medikamente (VEGF-Antikörper) könnte die Entwicklung und Progression von Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 und KHK aufgehalten und durch Biomarker frühzeitig diagnostiziert werden.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Aqua dest.</b>	destilliertes Wasser	<b>GLP-1</b>	<i>glucagon-like peptide-1</i>
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	<b>GLUT</b>	Glukose-Transporter
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>GOT</b>	<i>Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>
<b>BAT</b>	<i>brown adipose tissue</i>	<b>GPT</b>	<i>Glutamat-Pyruvat-Transaminase</i>
<b>BMI</b>	<i>Body mass index</i>	<b>HbA1c</b>	glykosyliertes Hämoglobin
<b>BrdU</b>	Bromdesoxyuridin	<b>HDL</b>	<i>high density lipoprotein</i>
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumine</i>	<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>HWR</b>	<i>hip-waist-ratio</i>
<b>CBBG</b>	Coomassie-Brillant-Blau G-250	<b>IFG</b>	<i>impaired fasting glucose</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	<b>IGT</b>	<i>impaired glucose tolerance</i>
<b>CM</b>	<i>conditioned medium</i>	<b>IL</b>	Interleukin
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>iNOS</b>	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein	<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>CVD</b>	<i>cardiovascular disease</i>	<b>kg/m<sup>2</sup></b>	Kilogramm pro Quadratmeter
<b>d</b>	Tag	<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid</i>	<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>DPP-4</b>	Dipeptidyl peptidase 4	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>EDTA</b>	<i>Ethylen - ediaminetetraacetic acid</i>	<b>M</b>	molare Masse in Kilogramm pro Mol
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	<b>mA</b>	Stromstärke in Milli-Ampère
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>	<b>metS</b>	metabolisches Syndrom
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>	<b>mg/dl</b>	Milligramm pro Deziliter
<b>FFA</b>	<i>free fatty acid</i>	<b>min</b>	Minute(n)
<b>flk-1</b>	VEGF-Rezeptor 2		
<b>flt-1</b>	VEGF-Rezeptor 1		
<b>g, gr</b>	Gramm		
<b>GIP</b>	<i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>		

<b>ml</b>	Milliliter	<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>µl</b>	Mikroliter		
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule	<b>VSMC</b>	<i>vascular smooth muscle cells</i>
<b>mm<sup>3</sup></b>	Kubikmillimeter	<b>W</b>	Leistung in Watt
<b>ND</b>	Nichtdiabetiker	<b>WAT</b>	<i>white adipose tissue</i>
<b>NFκB</b>	<i>nuclear factor kappa-B</i>		
<b>ng/l</b>	Nanogramm pro Liter		
<b>nm</b>	Nanometer		
<b>OGTT</b>	oraler Glucose-Toleranz- Test		
<b>pAVK</b>	periphere arterielle Verschlusskrankheit		
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>		
<b>pH</b>	<i>potentia Hydrogenii</i> (Säuregrad)		
<b>pg/ml</b>	Pikogramm pro Milliliter		
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>		
<b>SAT</b>	<i>subcutaneous adipose tissue</i>		
<b>SDS-Page</b>	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>		
<b>sec</b>	Sekunden		
<b>SMC</b>	<i>smooth muscle cells</i>		
<b>T2D</b>	Typ 2 Diabetes mellitus		
<b>TBST</b>	<i>Tris-Buffered Saline and Polysorbate 20 (= Tween 20)</i>		
<b>TLR</b>	<i>toll-like receptor</i>		
<b>TNF-α</b>	Tumornekrose-Faktor α		
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan		
<b>V</b>	Spannung in Volt		

# Inhalt

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Diabetes mellitus .....	1
1.2 Pathogenese des Diabetes mellitus .....	4
1.3 Übergewicht und metabolisches Syndrom .....	6
1.4 Adipokine und ihre Rolle in der Entwicklung von Adipositas-assoziierten Krankheiten.....	9
1.5 Adipokine .....	14
1.5.1 DPP-4 = Dipeptidyl-Peptidase 4.....	14
1.5.2 VEGF (vascular endothelial growth factor).....	16
1.6 Zielsetzung .....	18
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Material .....	20
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Fettgewebsisolation und –kultur, Fettexplantate .....	22
2.2.2 ELISA .....	23
2.2.2.1 DPP4-ELISA .....	23
2.2.2.2. VEGF-ELISA.....	23
2.2.3 Zellkultur der menschlichen glatten Gefäßmuskelzellen und Proliferationsassay .....	25
2.3 Datenpräsentation und statistische Analyse .....	26
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
3.1 Gewinnung von subkutanen und viszeralen humanen Fettgewebeproben und Darstellung des Patientenkollektivs .....	27
3.1.2 Diabetiker, unabhängig vom Gewicht.....	28
3.1.2 Adipöse Diabetiker .....	29
3.1.3. Nichtdiabetiker, unabhängig vom Körpergewicht .....	30
3.1.4 Adipöse Nichtdiabetiker .....	31
3.2. DPP-4 .....	32
3.3 VEGF .....	34
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>38</b>
4.1 Subkutanes / viszerales Fett.....	38
4.2 Adipokine .....	40
4.2.1 DPP-4.....	41
4.2.5 VEGF.....	44
<b>5 Schlussfolgerung</b> .....	<b>46</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>47</b>
Danksagung.....	73
Eidesstattliche Versicherung.....	74

## Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Patientenkollektiv der Diabetiker .....	29
Tabelle 2: Patientenkollektiv der Nichtdiabetiker.....	31
Abb. 1: DPP-4-Freisetzung in subkutanem und viszeralem Fettgewebe normalgewichtiger und übergewichtiger Probanden: .....	32
Abb. 2: DPP-4-Freisetzung im viszeralen Fettgewebe normgewichtiger Probanden vs. übergewichtige Nichtdiabetiker vs. übergewichtige Diabetiker: .....	33
Abb. 3: VEGF-Konzentration in pg/ml bei schlanken(n = 9) und adipösen Nichtdiabetikern (n = 7), sowie adipösen Diabetikern (n = 6) in subkutanem und viszeralem Fettgewebe: .....	34
Abb. 4: Proliferation von VSMC nach Behandlung mit konditionierten Medien von subkutanem und viszeralem Fettgewebe schlanker (n=10) und übergewichtiger Nichtdiabetikern (n=11), sowie übergewichtiger Diabetikern (n=6) im Vergleich zur Kontrollgruppe, gemessen an der BrdU-Inkorporation: .....	35
Abb. 5: Korrelation von VEGF-Gehalt in konditioniertem Medium (CM) der viszeralen Fettgewebsexplantate zur Proliferation, gemessen an der BrdU-Inkorporation .....	36
Abb. 6: Proliferation in VSMC nach Behandlung mit konditionierten Medien von subkutanem und viszeralem Fettgewebe übergewichtiger Diabetiker (n=4, Kontrolle n=6) mit und ohne VEGF-Blockierung im Vergleich zu Kontrollgewebe, gemessen an der BrdU-Inkorporation .....	37

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

Das Krankheitsbild des *Diabetes mellitus* zeichnet sich durch eine gestörte Glukosehomöostase aus, welche sich vorrangig durch den erhöhten Blutzuckerspiegel äußert. Hierbei muss zwischen dem Typ-1- und Typ-2-Diabetiker differenziert werden. Während der Typ-1-Diabetiker von Geburt an oder seit dem Kindesalter aufgrund seiner Pathogenese als Autoimmunkrankheit keine eigenständige Insulinsekretion mehr vorweisen kann (1), ist der erhöhte Blutzucker beim Typ-2-Diabetiker zunächst vor allem auf eine gestörte Insulinsensitivität zurückzuführen und später durch den Untergang der  $\beta$ -Zellen gekennzeichnet.

Der Diabetes Typ 2 unterscheidet sich also hauptsächlich dadurch vom Typ 1, dass er zumindest am Anfang nicht auf exogene Insulinzufuhr angewiesen ist, sondern sich durch erhöhte Blutzuckerspiegel und eine gestörte Insulinsignalweiterleitung im Sinne einer Resistenz und gleichzeitig in einer erhöhten Insulinsekretion äußert (2). Dies bedeutet, dass der Körper zwar angemessene Mengen von Insulin produziert, diese jedoch an ihren Zielorten eine abgeschwächte oder keine Wirkung hervorrufen. Diese unzureichende Insulinwirkung versucht der Körper mit erhöhter Insulinproduktion auszugleichen.

Die Diagnose Diabetes mellitus betrifft in den letzten Jahren immer mehr nicht nur die Bevölkerung der Industrienationen, sondern auch die der Entwicklungsländer (3;4). Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass sich der Lebenswandel der Menschen dahingehend verändert hat, dass früher ein kataboler, Energie verbrauchender Stoffwechsel im Rahmen einer sich bewegenden Tätigkeit die Regel war, während heutzutage die meisten Menschen ihren Beruf in einer sitzenden, eher anabolen Tätigkeit ausführen (2). Durch die fehlende Bewegung sowie nährstoffreiche Nahrung, die auch in Entwicklungsländern günstig zu erwerben ist, wird die Entwicklung von Übergewicht und die damit einhergehenden „Volkskrankheiten“ arterielle Hypertonie, Hypertriglyzeridämie und Diabetes mellitus im Rahmen des metabolischen Syndroms weiter gefördert.

Dabei ist vorwiegend der Diabetes Typ 2 an dieser dramatischen Entwicklung beteiligt, da er über 90 % der aktuellen Erkrankungen an *Diabetes mellitus* weltweit ausmacht. Aktuelle Zahlen belegen, dass bis zum Jahr 2025 300 Millionen Menschen von dieser Diagnose betroffen sein könnten (2).

Zunächst wird näher auf die Entstehung des *T2D* eingegangen, da das Verständnis dieser Erkrankung unverzichtbar für die hier angeführte Abhandlung ist.

Der als normal angestrebte Blutzuckerspiegel beim Erwachsenen bewegt sich im Bereich von 90-110 mg/dl, nüchtern wird ein Spiegel von < 100 mg/dl als normal angesehen (5). Physiologischerweise sollte sich der Gelegenheitsblutzucker, venös gemessen, <100 mg/dl

befinden. Werte zwischen 100 und 200 mg/dl weisen auf eine gestörte Glukosetoleranz (*IGT = impaired glucose tolerance*) hin und erfordern weitere Diagnostik in Form von Nüchternblutglukosemessungen. Erreicht der Plasmaglukosewert Messungen  $> 200$  mg /dl gilt die Diagnose *Diabetes mellitus* als bewiesen. Die erweiterte Diagnostik im Rahmen der venösen Nüchternblutglukose-Messungen erfordert eine Nahrungskarenz von mindestens 8 Stunden, um valide Werte angeben zu können.

Nüchternblutzuckermessungen beweisen - venös - ab einem wiederholtem Wert von  $> 126$  mg/dl den Diabetes; Werte zwischen 100 und 125 mg/dl erfordern weitere Diagnostik im Sinne eines oralen Glukose-Toleranz-Testes (*OGTT*), während physiologischerweise Nüchternblutwerte  $< 100$  mg /dl angestrebt werden.

Sollten die Werte der Nüchternblutzuckermessung zu verdächtigen Ergebnissen geführt haben, wird der orale Glukose-Toleranz-Test durchgeführt. Dazu soll der mindestens 10 Stunden nüchtern belassene Patient nach einer ersten Nüchternblutglukosemessung eine Zuckerlösung trinken. Diese enthält auf 250 bis 300 ml Wasser 75 g Glukose und sollte innerhalb von 5 Minuten getrunken werden. Zwei weitere Messungen des kapillären Blutzuckers erfolgen nun nach 60 und 120 Minuten. Beweisend für einen *Diabetes mellitus* gilt ein 2-Stunden-Wert  $> 200$  mg/dl; rangiert der Wert zwischen 140 und 200 mg/dl, so spricht man von einer gestörten Glukosetoleranz (*IFG = impaired fasting glucose*)<sup>1</sup>.

Die physiologische Regulation des Blutzuckerspiegels wird hauptsächlich durch die zwei Peptidhormone Insulin und Glukagon gesteuert, die sich antagonistisch gegenüberstehen. Während Insulin in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet und sezerniert wird, übernehmen die  $\alpha$ -Zellen des Pankreas diese Aufgabe bei Glukagon.

Als die drei hauptsächlichsten Wirkungsorte der beiden Proteohormone gelten Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe. Insulin senkt den Blutzucker und fördert die Bildung von Energiespeichern in Form von Glykogen und Triglyceriden, wirkt also anabol. Dem gegenüber steht die blutglukosesteigernde Wirkung des Glukagons.

Der wichtigste Reiz für die Insulinausschüttung ist der erhöhte Blutzuckerspiegel, zum Beispiel nach Nahrungsaufnahme. Dann bewirkt Insulin unter anderem über *GLUT-Transporter*, eine Aufnahme von Glukose in die Zellen, u. a. Adipozyten und Skelettmuskelzellen über GLUT-4, sodass der Blutzuckerspiegel nachweislich gesenkt wird. Dabei wird der aufgenommene Zucker in Leber und Muskel in Form von Glykogen gespeichert, das heißt die Glykogensynthese wird stimuliert. Gleichzeitig werden hier die Glykogenolyse und die hepatische Glukoneogenese gehemmt; zudem wird die hepatische  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren gehemmt. Im Skelettmuskel werden außerdem die Proteinsynthese aus Aminosäuren und die Liponeogenese im Fettgewebe aus freien Fettsäuren und Glycerin gefördert.

Fällt der Blutzuckerspiegel nun, etwa durch körperliche Arbeit, auf ein Level von ungefähr unter 80 mg/dl, stimuliert dies die Freisetzung von Glukagon aus den Zellen des Pankreas. Dies bewirkt nun in der Leber einerseits eine Hemmung der Glykolyse und Förderung der Glukoneogenese; im Skelettmuskel andererseits erfolgt die Umsetzung von Proteinen zu Aminosäuren (Proteolyse); im Fettgewebe wird zum Dritten das generierte Fett wieder zu freien Fettsäuren und Glycerin umgesetzt.

## 1.2 Pathogenese des Diabetes mellitus

Im T2D kann die zuvor beschriebene Glukosehomöostase nicht mehr aufrechterhalten werden. Dies lässt sich durch zwei pathogenetische Mechanismen erklären.

Einerseits ist die frühe, postprandiale Sekretion von Insulin gestört, sodass postprandiale Hyperglykämie vorherrscht (6). Zum anderen findet man beim T2D eine verminderte Insulinsensitivität in den Empfängerorganen. Dies lässt sich durch eine ständige Überstimulation erklären, da die Blutglukose durch erhöhte Nahrungszufuhr fast kontinuierlich über die Norm gesteigert ist. So kommt es zu einer verminderten Insulinrezeptordichte (*down-regulation*). Dadurch nimmt die Empfindlichkeit, mit der Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe auf Insulin ansprechen, entsprechend ab, sodass sich langfristig erhöhte Blutzuckerwerte einstellen (7;8). So entsteht ein *Circulus vitiosus*, da der erhöhte Blutzuckerspiegel erhöhte Insulinsekretion fördert, was wiederum zur *down-regulation* respektive zu einer Unempfindlichkeit der Rezeptoren führt (9;10).

Klinisch lässt sich in den meisten Fällen ein erhöhtes Körpergewicht beobachten, was sich vor allen Dingen in erhöhtem Bauchfettanteil äußert. Dabei konnten Colditz et al. (11) zeigen, dass ein erhöhtes Körpergewicht mit erhöhtem Körperfettanteil das Risiko, einen T2D zu entwickeln, erhöht; wurden Gewicht und Fettgehalt hingegen reduziert, konnte man dieses Risiko senken.

Es wurde jedoch auch beobachtet, dass normalgewichtige Patienten mit einem *Hip-waist-ratio* (*HWR*) im Normbereich insulinresistent sein und auch für die anderen Messgrößen des metabolischen Syndroms abnorme Werte aufzeigen können. Hierbei ließ sich zeigen, dass diese Patienten meist mindestens einen erst- oder zweitgradigen Verwandten hatten, die bereits einen T2D aufwiesen (12). Diese Patienten haben laut Perseghin et al. (12) ein etwa 40% höheres Risiko, T2D zu entwickeln. In ihrer Studie stellten sie fest, dass Nachkommen von T2D betroffenen Eltern höhere Spiegel von freien Fettsäuren (*free fatty acids, FFA*) sowie eine Hyperinsulinämie nach Nahrungskarenz (*fasting hyperinsulinemia*) vorwiesen. Außerdem waren die Blutkonzentrationen der Aminosäuren, welche ein Insulin-abhängiges Transporter-System nutzen (Alanin, Glutamin, Serin, Glycin), niedriger als die Normwerte. Dies erklärten Perseghin et al. mit dem Ansatz, dass eben diese Aminosäuren als glukoneogenetisch betrachtet werden, sodass diese Patienten mit erhöhten Raten von Glukoneogenese charakterisiert werden könnten.

Weiterhin unterteilte die Arbeitsgruppe die Studiengruppe der T2D-Nachkommen in drei Untergruppen: sehr niedrige, niedrige und normale Insulinsensitivität (*OFF-VL*, *OFF-L*, *OFF-N*). Innerhalb dieser Subgruppen stellte sich heraus, dass die Probanden mit normaler Insulinsensitivität in der akuten Phase eine normale Insulinantwort hatten, ungefähr vergleichbar mit der Insulinantwort in der Kontrollgruppe. Dagegen wiesen die Probanden der *OFF-L*-Untergruppe eine Hypersekretion von Insulin auf. Die *OFF-VL*-Untergruppe wies

demgegenüber eine niedrigere Insulinsekretion vor, was damit erklärt wird, dass die  $\beta$ -Zell-Funktion in dieser Untergruppe schon beeinträchtigt ist. Die Insulinsekretion entspricht (numerisch) zwar in etwa der der Kontroll- und *OFF-N*-Gruppe, jedoch wird sie hinsichtlich der Insulinresistenz in dieser Untergruppe als unzureichend betrachtet.

Die Verfügbarkeit freier Fettsäuren trägt zur Pathogenese des T2D bei, erstmals beschrieben durch Randle et al. (13). Die freien Fettsäuren inhibieren in solcher Weise den Kohlenhydratstoffwechsel, als dass sie den Glukose-Transport bzw. die Glucose-Phosphorylierung inhibieren. Daraus resultiert, dass sowohl die Glukose-Oxidierung als auch die Glykogen-Synthese im Muskel reduziert ist (14). Dieser Zustand lässt sich sowohl bei schon manifestem T2D als auch bei noch gesunden, normalgewichtigen Nachkommen von Typ-2-Diabetikern beobachten (15-17).

Der Symptomkomplex des T2D umfasst also die gestörte Insulinsensitivität, bzw. die Insulinresistenz, die erhöhte Glukoneogenese in der Leber und die Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas bis hin zum totalen Versiegen der  $\beta$ -Zell-Funktion (18).

### 1.3 Übergewicht und metabolisches Syndrom

Es wird gehäuft beobachtet, dass zum Beispiel das Vorhandensein von Dyslipidämie, arterieller Hypertonus und viszeraler Adipositas Risikofaktoren darstellen, kardiovaskuläre Krankheiten (*cardiovascular diseases, CVD*) und Diabetes Typ 2 zu entwickeln. Diese Risikofaktoren werden unter dem Begriff des ‚metabolischem Syndrom‘ (*MetS*) zusammengefasst.

Das Risiko in den nächsten fünf bis zehn Jahren eine *CVD* zu entwickeln, ist bei Patienten mit metabolischem Syndrom doppelt so hoch wie bei Patienten ohne metabolisches Syndrom; für die Entstehung eines T2D sogar fünffach erhöht (19). Daher ist es von Bedeutung, zuverlässig Parameter zu definieren, die Patienten mit einem Risikoprofil für diese Krankheiten herausstellen, um frühzeitig präventiv intervenieren zu können.

Das auch als „tödliches Quartett“ (20) oder „Syndrom X“ (21) beschriebene Krankheitsbild wurde in den letzten Jahren von mehreren Institutionen, wie des *National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel (NCEP ATP III)*<sup>1</sup>, der *European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*<sup>2</sup>, und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (22-24), anhand von bestimmten Faktoren unterschiedlich definiert. Um die Diagnose zu stellen und zu gewährleisten, dass diese auch weltweit gilt, haben sich diese Institutionen darum bemüht, eine weltweit gültige Definition des Krankheitsbildes zu erstellen. Das Syndrom ist laut der *International Diabetes Federation (IDF)* 2006 wie folgt beschrieben (5) und 2009 in seiner Definition überarbeitet (19) worden:

ein erhöhtes Taillen-Hüft-Verhältnis (*waist-hip-ratio, HWR*) im Sinne einer viszeralen Adipositas (> 94 cm männlich, > 80 cm weiblich bei Europäern; es herrschen verschiedene Werte bei verschiedenen ethnischen Gruppen) plus zwei der folgenden Faktoren:

- Erhöhte Triglyzeride  $\geq 150$  mg/dl
- Verminderte HDL-Werte  $\leq 40$  mg/dl bei Männern bzw.  $\leq 50$  mg/dl bei Frauen
- Arterieller Hypertonus systolisch  $\geq 130$  mmHg bzw. diastolisch  $\geq 85$  mmHg
- Erhöhte Nüchternblutglukosewerte  $\geq 100$  mg/dl, einschließlich der schon gestellten Diagnose des Diabetes mellitus Typ 2 (T2D).

Falls der *Body Mass Index, BMI*, sich über  $30 \text{ kg/m}^2$  beläuft, kann von zentraler Adipositas ausgegangen werden und der Taillenumfang muss nicht zwangsläufig vermessen werden.

Dabei betrifft der Hauptunterschied zwischen den unterschiedlichen Definitionen die Grenzwerte der zentralen Adipositas bzw. ob dies eine fest integrierte Größe in der Diagnosestellung des metabolischen Syndroms sein sollte. Abhishek et al. beschreiben, dass vor allem Fett in der oberen Körperhälfte mit Insulinresistenz assoziiert ist; weniger Fett in der unteren Körperhälfte (25). Diese auch als „androide“ oder „zentrale“ Adipositas bezeichnete

Form der Fettleibigkeit wird stärker in Verbindung gebracht mit Erkrankungen, bei denen eine inflammatorische Pathogenese bekannt ist, während die „gynoid“ Fettleibigkeit mit nichts dergleichen assoziiert wird (26;27).

Außerdem wird je nach ethnischer Zugehörigkeit der Grenzwert unterschiedlich festgelegt; aktuell belaufen sich die höchsten Grenzwerte für die USA (28), Kanada (29;30) und Europa (31) ( $\geq 94$  bzw.  $\geq 102$  cm für Männer sowie  $\geq 80$  bzw.  $\geq 88$  cm für Frauen) sowie die niedrigsten Grenzwerten für China (32) und Japan (33) ( $\geq 94$  cm für Männer sowie  $\geq 80$  cm für Frauen).

Weltweit steigt die Prävalenz des MetS stetig; schätzungsweise ein Viertel der adulten Population ist davon betroffen; vor allem im sub-saharischen Afrika und Mittleren Osten sind hohe Prävalenzen verzeichnet worden (Südafrika: 33,5%; Iran 33,7%) (25). Auch in Venezuela und den städtischen Regionen von Brasilien sind die Prävalenzen ausgesprochen hoch (31,2% bzw. 25,4 %) (34;35); ähnliches gilt in Südasien (25).

Dieses weltumspannende Problem erfordert also eine möglichst einheitliche Intervention, angefangen von der Diagnosestellung bis zur primären beziehungsweise sekundären und tertiären Prävention des MetS, um Folgekomplikationen wie *CVD* und T2D zu vermeiden bzw. einzudämmen.

Am ehesten als metabolische Risikokonstanten anerkannt sind Dyslipidämie, arterieller Hypertonus und erhöhte Plasmaglukose. Patienten, die diese Symptome auf sich vereinen, weisen meist auch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen, bzw. -thrombogenen Faktoren auf, dass in die proinflammatorische und prothrombotische Richtung überwiegt (36). Im Folgenden wird auf die einzelnen Risikofaktoren eingegangen.

Verständlicherweise korreliert das Risiko für MetS mit dem *BMI*. So gilt als allgemein anerkannt, dass ab einem *BMI*  $> 25$  das Risiko für *CVD* stetig steigt. Dabei ist vor allem der Anteil an abdominellem Fett schädlich; also die androide Adipositas eher als die gynoid, bei der das Fett vor allen Dingen an den Hüften vermehrt vorkommt (25). Außerdem scheint die ethnische Herkunft entscheidend zu sein; Gupta et al. konnten zeigen, dass mexikanische Amerikaner die höchste Rate an MetS vorweisen, gefolgt von Kaukasiern und Afroamerikanern (25). Allgemein erhöht sich das Risiko, das MetS zu entwickeln, mit dem Alter. So sind weniger als 10% der Menschen in ihren Zwanzigern davon betroffen, was sich bis zu den 60ern auf bis zu 40% steigert (25). Weiterhin zeigt sich, wie vorher schon beschrieben, dass erstgradige Verwandte von bereits erkrankten T2D eher dazu neigen, ebenfalls einen T2D sowie das MetS zu entwickeln (37).

Um dem Krankheitsbild des T2D und des gesamten MetS entgegenzuwirken, wird im Sinne der primären Prävention zunächst auf Ebene des Lebensstils interveniert. Im Vordergrund stehen die Gewichtsreduktion sowie die Aufnahme von körperlicher Aktivität. Auch die

Ernährungsberatung nimmt einen wichtigen Platz ein, da sie durch die Reduzierung von tierischen, gesättigten Fettsäuren und Kohlenhydraten zur Gewichtsabnahme beiträgt. Wenn diese Maßnahmen in einem Zeitraum von sechs Monaten nicht zum Erfolg führen, wird zusätzlich die sekundäre Prävention im Sinne einer medikamentösen Therapie erforderlich. Dabei wird versucht, die einzelnen Komponenten des metabolischen Syndroms auf physiologische Werte zu senken, z. B. die Hypertriglyzeridämie durch Statine, den arteriellen Hypertonus durch *Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer* sowie den Diabetes durch Biguanide (Metformin) oder Sulfonylharnstoffe (Glimepirid, Glibenclamid).

## 1.4 Adipokine und ihre Rolle in der Entwicklung von Adipositas-assoziierten Krankheiten

Es gilt hinreichend als bewiesen, dass Adipositas als ein Status angesehen werden kann, in dem eine systemische Entzündung im Körper abläuft. Diese ist nicht wie bei akuten Infekten, bei denen auch eine Reduzierung des Allgemeinzustands sowie Fieber, Schüttelfrost u. ä. vorliegt, anzusehen, sondern als eine abgeschwächte, milde Form der Entzündung, die sich im klinischen Bild nicht unmittelbar bemerkbar macht, jedoch dennoch im Blutbild nachgewiesen werden kann. Diese niedriggradige Inflammation (oder *low-grade systemic inflammation*) wird von verschiedenen Mediatoren wie Interleukinen und anderen Zytokinen induziert (38). Dabei handelt es sich unter anderem um hormonähnliche Substanzen, welche als „Adipokine“ bezeichnet werden (39-41). Dieser Name trägt der Eigenschaft Rechnung, dass die sezernierten Substanzen zwar nicht ausschließlich, aber wenn in diesem Zusammenhang betrachtet, von den verschiedenen Fettgeweben des Körpers sezerniert werden. Dabei versteht man unter dem Begriff der Adipokine eine große, heterogene Gruppe von verschiedenen Peptiden bzw. Proteinen (42). Einige der bekanntesten Adipokine, etwa Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  oder Plasminogen-Activator Protein etwa spielen nicht ausschließlich in der chronisch niedriggradigen Inflammation eine Rolle, sondern auch in anderen physiologischen Vorgängen des Körpers, etwa der Hämostaseologie bzw. der Apoptose (TNF- $\alpha$ ) (39-41). Andere Adipokine, wie etwa Adiponektin oder Leptin, wurden primär im Zusammenhang mit Untersuchungen an Adipozyten entdeckt. Ähnlich wie bei den „klassischen“ Zytokinen kann auch bei Adipokinen in pro- und antinflammatorische Vertreter differenziert werden, wobei es als erwiesen gilt, dass diese Substanzen nicht nur eine wesentliche Rolle in Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus einnehmen. Im Status der Adipositas scheinen proinflammatorische Adipokine auch maßgeblichen Einfluss zu nehmen auf die Entwicklung von kardiovaskulärer Funktion und der Entwicklung der entsprechenden Pathologika, z. B. Atherosklerose, Insulinresistenz, metabolisches Syndrom, etc. (43).

Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre pathophysiologischen Folgeerkrankungen eine der Haupttodesursachen weltweit sind. Während man früher der Ansicht war, dass Atherosklerose hauptsächlich durch eine Ansammlung von Cholesterin in den Gefäßwänden zustande kommt, geben neuere Untersuchungen Hinweise darauf, dass dies nicht nur ein rein passiver Vorgang ist, sondern dies unter anderem auch durch chronisch-niedriggradige Inflammation mit Beteiligung proinflammatorischer Adipokine bedingt ist (44;45).

Auch Fettgewebe, insbesondere das weiße Fettgewebe des Erwachsenen (*WAT, white adipose tissue*), wurde inzwischen als Organ mit Sekretion von Proteinhormonen, den sogenannten Adipokinen, anerkannt. In dieser Funktion spielt es als Gewebe, welches aktiv in

inflammatorische Prozesse eingreift, eine wichtige Rolle. Hierbei setzt es vor allem proinflammatorische Substanzen frei und beeinflusst entsprechende Signalwege (41;46). Außerdem wird dem *WAT* zugesprochen, dass es durch eine Regulation der Energiehomöostase und der Insulinsensitivität in wesentliche Stoffwechselforgänge eingreifen kann (47). In diesem Zusammenhang wird aktuell unter anderem erforscht, welche mannigfaltigen Verbindungen zwischen dem *WAT* und der Entwicklung von Adipositas und damit assoziierten Erkrankungen sowie inflammatorischen Komplikationen bestehen (41). Vor allem die Fähigkeit, in inflammatorische Signalwege einzugreifen, wird auf die Fettzellen und Immunzellen, die im *WAT* vorkommen, zurückgeführt, die inflammatorische Substanzen sezernieren und produzieren können. Dadurch wird die *low-grade systemic inflammation* begründet (26;41;48-52).

Pauschal kann man sagen, dass das *WAT* sich in zwei Hauptlokalisationen befindet, nämlich erstens subkutan, z. B. im Bereich des Gesäßes, der Oberschenkeln und des Bauches; sowie intraabdominell in Form des *Omentum majus*, der *Appendices epiploicae* sowie perirenal (27). Diese beiden Hauptdepots des *WAT* beeinflussen auf verschieden starke Art und Weise sowohl Inflammation als auch Stoffwechselforgänge. Es existieren derzeit zwei Haupthypothesen, die diese Unterschiede zu erklären versuchen. Die erste Hypothese beruft sich auf die zellbiologischen Unterschiede der *WATs* und dass damit auch unterschiedlich hohe Risiken für inflammatorische Erkrankungen einhergehen (53). Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression für verschiedene *WAT*-Depots differiert (54-56).

Die zweite Hypothese vertritt die Meinung, dass durch die anatomische Nähe zur Leber, die bei der zentralen Fettleibigkeit herrscht, und die Fähigkeit der Leber, die freien Fettsäuren, die im *WAT* gespeichert sind, aufzunehmen, die Risikofaktoren für die Entwicklung von *CVD*, *T2D*, etc. bei androider Fettleibigkeit als höher anzurechnen sind als bei anders gearteter Fettleibigkeit (27). Bewiesen ist, dass Adipositas langfristig die Energiehomöostase beeinträchtigt, in dem Sinne, dass sie den oben schon beschriebenen systemischen unterschwellig inflammatorischen Status im Körper provoziert. Dies konnte vor allem für viszerale Adipositas bewiesen werden (57). Dabei spielen sich diese inflammatorischen Prozesse durchaus im *WAT* selber, aber auch in Leber und Immunzellen ab, sodass diese ihrerseits entsprechend inflammatorische Zytokine sezernieren, was zu hohen Blutspiegeln dieser Substanzen führt (26;39;48;49;58). Physiologischerweise würde die hypophysäre-hypothalamische Achse dem entgegensteuern, um wieder ein Gleichgewicht herzustellen. Da sie jedoch durch den erhöhten Spiegel proinflammatorischer Moleküle auch verlängert aktiviert wird, wird in der Folge auch mehr von den gegenregulatorischen Substanzen ausgeschüttet. Von Bedeutung ist hier vor allen Dingen die Sekretion von Glukokortikoiden, da diese auf die Differenzierung von Präadipozyten wirken, was wiederum dazu führt, dass die Menge an *WAT* ansteigt (59). Auch unter physiologischen Bedingungen beherbergt das *WAT* Makrophagen,

wobei normalerweise die M2-Makrophagen vorherrschen. Dieser Typ von Makrophagen ist dadurch gekennzeichnet, dass er eher antiinflammatorische Substanzen wie IL-10, IL-1Ra und Arginase, welche an der Inhibition von iNOS beteiligt sind, freisetzt (51;51;60;61) . Im Gegensatz dazu sind M1-Makrophagen eher dadurch gekennzeichnet, dass sie iNos freisetzen und proinflammatorische Zytokine sezernieren (51;60;61).

Im Zustand der viszeralen Adipositas wandelt sich diese Homöostase nun in mehreren Punkten. Die Fettzellen hypertrophieren aufgrund der positiven Energiebalance. Doch nicht nur die Zellen an sich vergrößern sich, sondern auch die Zusammensetzung des Fettgewebes aus unterschiedlichen Zelltypen verändert sich: es wandern vermehrt Makrophagen ein, die nun vielmehr vom M1-Typ sind als, wie physiologischerweise vom M2-Typ. Hierbei lassen sich auch die sogenannten „*crown-like-structures*“ beobachten, die avitale, von überwiegend M1-Makrophagen umgebene Adipozyten darstellen (51;60-68). Außerdem kommt es zu einer Fibrosierung des Gewebes (62;69-74). Dabei konnte man feststellen, dass vor allem viszerales Fettgewebe im Gegensatz zu subkutanem Fettgewebe stark inflammatorisch reagiert (27;53), wobei anscheinend auch Endothel-Zellen des *WAT* maßgeblich zur Regulation des M1/M2-Gleichgewichts beitragen (65). Darüber hinaus haben mehrere Arbeitsgruppen zeigen können, dass die Hypoxie, die vor Ort im *WAT* durch die Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen herrscht, erschwerend zum inflammatorischen Status des Gewebes beiträgt (75-77).

Die Adipokine werden zwar hauptsächlich vom *WAT* sezerniert, jedoch durchaus auch von anderen Geweben (39;40). Vorangegangene Studien lassen vermuten, dass Adipokine Stoffwechsel- und Kreislaufvorgänge beeinflussen. Dabei nehmen sie unter anderem Einfluss auf Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, Entzündungs- und Blutdruckregulation (39-41). Diese Regulation ist im Stadium der Adipositas in dem Sinne verändert, als dass sie sich in die proinflammatorische Richtung verschiebt. Mehrere verschiedene extra- sowie intrazelluläre Signalwege tragen zur Adipokinproduktion bei. Einige der wichtigsten extrazellulären Mediatoren sind die *FFA*, die im Status der Adipositas chronisch erhöht sind (78). Dies kommt daher, dass die Ernährung meist fettreich ist und Insulin die Lipolyse nicht (mehr) suffizient genug hemmen kann (79). Weiterhin sind unter anderem die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR)-4 und -2 in übergewichtigen Patienten verstärkt exprimiert und ihre Level erhöht (79;80). Beide haben Einfluss auf die immunmodulatorisch wirksamen Adipokine. Diese Rezeptoren, vorrangig *TLR-4*, werden unter anderem durch *FFA* angesprochen (79;80). Interessanterweise spricht auch Lipopolysaccharid (LPS) den *TLR-4*-Rezeptor an (47). Dies könnte insofern von Relevanz sein, als dass LPS vor allen von der physiologischen Bakterienkultur im Darm produziert wird und die Produktion von LPS bei Mäusen erhöht ist, wenn man sie mit einer Hoch-Fett-Diät füttert (81;82). Daher könnte der Schluss gezogen werden, dass Darmbakterien an der inflammatorischen Situation in der Adipositas beteiligt sind (81).

Durch die Veränderung des Körpergewichts in BMI-Kategorien  $\geq 25$  findet eine Veränderung in der Homöostase dieser Adipokine statt, was konsekutiv auch ihren Einfluss auf Stoffwechselfvorgänge und kardiovaskuläre Funktion verändert. Es gibt Hinweise dafür, dass unter anderem auch VSMC dadurch dahingehend in ihrer Proliferation und Migration beeinflusst werden (83). Dies scheint die Entwicklung und Progression von *CVD* und Diabetes mellitus zu fördern (83;84). So scheinen hohe Spiegel an Adiponektin, wie in schlanken Patienten gemessen, einen protektiven Einfluss auf VSMC auszuüben, indem sie die Proliferation und Migration von VSMC reduzieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass hohe Adiponektinspiegel ein erniedrigtes Risiko für Myokardinfarkte zu bieten scheinen (85). Wie zuvor schon beschrieben, geht Adipositas mit einer niedriggradigen chronischen Inflammation einher. Diese permanente, wenn auch subakut, herrschende Inflammation bietet unter anderem die Voraussetzung für die Entstehung von Atherosklerose von Koronarien und Zerebralgefäßen, vermittelt durch proinflammatorische Substanzen, wie etwa die Adipokine.

Vorangegangene Studien konnten dahingehend veränderte Sekretion und/oder Expression im Fettgewebe bzw. Konzentrationsmengen im Serum von beispielsweise DPP-4 (86;87) messen. Das Augenmerk fällt auf dieses ausgewählte Adipokin, da es in bereits erfolgten Experimenten erste richtungsweisende Ergebnisse lieferte.

Zudem häufen sich die Hinweise, dass Adipokine wie DPP-4 wesentlich zur Entwicklung von Insulinresistenz und damit der Diabetesentwicklung beitragen könnten (86). Im Diabetes mellitus Typ 2 kommen deshalb schon seit längerem DPP-4-Inhibitoren zum Einsatz, da gezeigt werden konnte, dass sie die Halbwertszeit von GLP-1, einem Inkretin, zumindest im Tierversuch, verlängern konnten (88). Beim Menschen zeigten sich ähnliche Effekte durch GLP-Agonisten, bzw. DPP-4-Inhibitoren, wie Verspohl EJ et al. zeigen. Die Blutglucose wird durch Stimulation der Insulinsekretion gesenkt, die Glucagonsekretion unterdrückt. Die Magenentleerung wird gehemmt (89). Horie et al. zeigten in ihrer 2011 veröffentlichten Studie, dass in japanischen Patienten mit T2D der DPP-4-Inhibitor Linagliptin den HbA1c-Wert als Surrogatparameter signifikant schon nach vier Wochen senken konnte (90). Die Substanz hatte dabei lange Halbwertszeiten bis 260 Stunden, bei jedoch maximaler Akkumulationshalbwertszeit von 38,5 Stunden.

Dies könnte bedeuten, dass eine einmalige Einnahme am Tag in kurzer Zeit zu deutlicher Senkung des Langzeitblutzuckerwertes und respektive auch zur Senkung der mit T2D verbundenen Komplikationen führen könnte. Von Vorteil ist ohne Zweifel die hierbei nur einmalige Einnahme des Medikamentes, welches eine hohe Compliance bei den entsprechenden Patienten versprechen könnte. Boland et al. fassen in ihrem Review mehrere Studien zusammen, welche die Effektivität diverser oraler Antidiabetika (u. a. Sulfonylharnstoffe, Glitazone) unter Berücksichtigung verschiedener Gesichtspunkte untersuchen. Hierbei werden GLP-1-Agonisten

und DPP-4-Inhibitoren als effektivste Wirkstoffklassen beschrieben. Dabei wurden unter anderem die unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Hypoglykämie, aber auch der Einfluss auf kardiovaskuläre Komorbidität und der Einfluss auf den Erhalt der  $\beta$ -Zellfunktion und Gewichtsverlust untersucht. GLP-1-Agonisten und DPP-4-Antagonisten hatten ein vergleichsweise niedriges Risiko für die Entstehung einer Hypoglykämie und positive Effekte auf die Gewichtsabnahme. Inkretine nahmen einen positiven Einfluss auf kardiovaskuläre Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Artherosklerose) und die  $\beta$ -Zellfunktion des Pankreas bei Typ2-Diabetes (91). Daher scheint die Second-Line-Therapie mit GLP-1-Agonisten bzw. DPP-4-Inhibitoren trotz höherer Kosten im Gegensatz zu anderen oralen Antidiabetika die erstrebenswertere Alternative in der Therapie des Diabetes mellitus und der damit einhergehenden Komorbiditäten wie kardiovaskulären Erkrankungen zu sein.

## **1.5 Adipokine**

### **1.5.1 DPP-4 = Dipeptidyl-Peptidase 4**

Dipeptidyl-Peptidase 4, kurz DPP-4, ist ein Enzym, welches zur Familie der S9b-Serinprotease-Familie gehört. Zu dieser gehören ebenfalls DPP 8 und 9, sowie *Fibroblast activation protein* (92), da sie in ihrer Struktur homolog zueinander sind (93). DPP-4, ein 110 kDA großes Glykoprotein, zählt als Hauptvertreter der DPP-Familie, welches in die Membran integriert, ubiquitär vertreten ist. Vor allem wurde es in epithelialen Zellen vieler Organe, wie Leber, Niere, Milz usw. beschrieben (92), aber auch in aktivierten Lymphozyten und Monozyten (94). In diesem Zusammenhang ist es auch als Oberflächenmolekül CD 26 bekannt, dass mit CD 45, einem Molekül, dass vor allem von Lymphozyten exprimiert wird, Bindungen eingehen kann und in der Immunantwort eine co-stimulatorische Funktion hat (94). DPP-4 wird als CD 26 vor allem von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen als Oberflächenmolekül präsentiert, welches nach Kontakt mit Antigenen vermehrt exprimiert wird (95).

Strukturell betrachtet ist DPP-4 ein Homodimer mit zwei Funktionsdomänen. Es kann seine katalytische Aktivität nur als Dimer ausüben und spaltet als Enzym hydrolytisch zum Beispiel *Glucagon-like peptide-1* und *-2*, Neuropeptid Y, *growth-hormone-releasing factor*, aber auch Chemokine wie IP 10 oder *stromal-cell-derived factor* (92). Diese hydrolytische Spaltung ist sehr spezifisch auf solche Dipeptide ausgerichtet, welche Prolin oder Alanin in der vorletzten Position ihres N-Terminus enthalten (96). In der Entwicklung des T2D spielt es insofern eine Rolle, als dass es bis zu 80% des zirkulierenden *GLP-1* spaltet (97;98). GLP-1 zählt zusammen mit *glucose-dependent-insulinotropic polypeptide* (GIP) zu den sogenannten Inkretinen. Diese Substanzgruppe fasst Hormone des Gastrointestinaltraktes zusammen (99). GLP-1 bewirkt zusammen mit GIP die Insulinsekretion nach Glucoseaufnahme (100); hierbei sind sie für bis zu 70% der Insulinantwort auf Glucose verantwortlich (101). Ist nun im T2D die Insulinsekretion gestört, so ist das auch auf Störungen im System dieser Inkretine zurückzuführen. Hierbei ist die Sekretion von GLP-1 vermindert, während die Funktion aber nicht eingeschränkt ist, wohingegen die GIP-Sekretion zwar normal ist, aber keine effektive Wirkung entfalten kann (102;103). Aus diesem Grund ist es für die Forschung interessant geworden, Wirkstoffe zu entwickeln, die unter anderem DPP-4 inhibieren, um eine längere Wirkzeit von GLP-1 zu erzielen (100).

Pathologisch veränderte DPP-4-Aktivität wurde bisher bei neurologischen Erkrankungen wie Anorexie (104) und Bulimie, Angststörungen oder Depressionen beobachtet (92). Aber auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wurde beschrieben, dass die Expression von DPP-4 sowie seine Aktivität von der physiologischen Norm abweicht. Dies ist zum Beispiel bei

Arthritis, Multipler Sklerose oder Atherosklerose der Fall (92). Hier spielt sicherlich auch die Tatsache eine Rolle, dass Neuropeptide, aber auch Zytokine Substrate von DPP-4 sind (100). Dabei fungiert DPP-4 vermutlich als direkter Regulator für T-Lymphozyten in der Pathogenese dieser Krankheitsbilder, wobei durchaus auch die anderen Mitglieder der S9b-Serinproteasen, nämlich DPP-8 und DPP-9, beteiligt sein können (92;105).

### **1.5.2 VEGF (vascular endothelial growth factor)**

*Vascular endothelial growth factor*, VEGF, dient im Körper physiologischerweise als Mitogen. Allgemein werden die vier Isoformen VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF201 beschrieben, wobei VEGF165, ein Heparin-bindendes Glycoprotein, die vorherrschende Form ist. Es wird sezerniert, jedoch auch auf Zelloberflächen und in der Extrazellulärmatrix präsentiert (106). Man unterscheidet die prä- und postnatalen Funktionen von VEGF, die es als Mediator übernimmt (106). Wie in mehreren Studien gezeigt wurde, ist VEGF sowie seine zwei Rezeptoren VEGFR-1, auch *flt-1*, und VEGFR-2, auch *flk-1*, essenziell für die Entwicklung von Blutgefäßen bei Mäusen. Dabei stimuliert das vom Endoderm sezernierte VEGF die Ausbildung von VEGFR-2 am anliegenden Mesoderm (107;108). Wird einer der Rezeptoren ausgeschaltet, so verläuft die Embryogenese aufgrund der behinderten Entwicklung der endothelialen Progenitorzellen gestört. Konsekutiv wird auch die reguläre Vaskulo- und Angiogenese verhindert, sodass dies schlussendlich letal wirkt (109;110). Dabei bezeichnet die Vaskulogenese die Entstehung neuer Blutgefäße aus Angioblasten, während bei der Angiogenese die neuen Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen hervorgehen. Bereits die Ausschaltung einer der vier Isoformen von VEGF bewirkte in *in vivo*-Versuchen bei Mäusen Ischämien des Myokards (111). Postnatal dient VEGF physiologischerweise unter anderem zur Neovaskularisation in der Gravidität, jedoch wurden auch bei Pathophysiologien Zusammenhänge mit VEGF gefunden. Das trifft zum Beispiel auf die diabetische Retinopathie oder die *periphere arterielle Verschlusskrankheit*, die pAVK, zu (106;112;113). Bekräftigt werden konnte das durch Studien, die bei exogener Zugabe von VEGF bei Ischämie, sowohl peripher als auch myokardial, die Ausbildung von Kollateralen im Tiermodell verzeichnen konnten (114;115).

Außerdem gilt VEGF als Mediator bei inflammatorischen und pathologisch proliferierenden Vorgängen, wie etwa bei der Atherosklerose. Da auch das metabolische Syndrom durch eine niedriggradige chronische Inflammation gekennzeichnet ist, liegt es nahe, VEGF in diesem Zusammenhang genauer zu untersuchen. Zwar soll VEGF physiologischerweise die Regeneration und Angiogenese fördern, wenn pathologische Vorgänge wie Artherosklerose bzw. konsekutiv Stenosen vorliegen. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass VEGF auch weniger protektive Vorgänge initiiert. Wurde etwa bei Mäusen, die eine Hypercholesterinämie hatten, VEGF exogen zugeführt, konnte durch Monozytenrekrutierung über *Flt-1* eine atherogene Wirkung beobachtet werden. Ähnliches konnte bei den glatten Muskelzellen beschrieben werden, die die Gefäßwand umgeben (*vascular smooth muscle cells*, *VSMC*), die durch VEGF zur Proliferation angeregt werden sollen (116-118). Das perivaskuläre Fett ist bei Übergewichtigen vermehrt, was konsekutiv auch den Crosstalk zu den glatten Muskelzellen verstärkt, unter anderem über VEGF als Mediator. In diesem Szenario entsteht so ein gegenüber

schlanken Personen erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, da auch die Gewebsinflammation im Sinne der chronisch niedriggradigen Entzündung vermehrt ausgeprägt ist (119;120).

Lamers et al. haben daher in einer Studie zur VEGF-induzierten Proliferation glatter Muskelzellen Zusammenhänge mit Übergewicht und Diabetes darlegen können, die in dieser Arbeit noch vertieft werden sollen. Das in dieser Arbeit etablierte Modell sieht vor, sogenanntes konditioniertes Medium (*CM*) mit glatten Muskelzellen in Kontakt zu bringen und die darauffolgende Sekretion von Stoffen sowie die Proliferation der glatten Muskelzellen in Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankheiten zu bringen.

So soll im Folgenden der Frage nachgegangen werden, ob und wie sich subkutanen und viszerales Fettgewebe schlanker und übergewichtiger, sowie von Diabetiker und Nichtdiabetikern in der Freisetzung von Faktoren wie VEGF unterscheiden. Da bereits Antikörper gegen VEGF auf dem Markt sind, könnte das Therapiespektrum für diese Stoffe bei entsprechenden Ergebnissen und weiteren Studien so etwa auf die Gruppe der kardiovaskulären Krankheiten erweitert werden.

## **1.6 Zielsetzung**

Wie aus der Einleitung hervorgeht, fungiert Fettgewebe nicht nur als Speicherort, sondern auch ganz wesentlich als endokrines Organ. Als solches sezerniert es Adipokine (121). Es gibt Hinweise darauf, dass vor allem im viszeralen Fettgewebe die Sekretion einzelner, proinflammatorisch wirkender Adipokine signifikant höher ist als beispielsweise in subkutanen Depots. Auch konnten in vorangegangenen Studien Anzeichen dafür festgestellt werden, dass es einen *Crosstalk* mit Muskelzellen gibt, der über das physiologische Maß hinausgeht (120). Dies wiederum könnte für die Entwicklung und das Voranschreiten von Mikro- und Makroangiopathien wie CVD, pAVK und das Entstehen von Insulinresistenz und Diabetes mellitus von wesentlicher Bedeutung sein. Daher war eines der Ziele dieser Arbeit, den Unterschied der sekretorischen Aktivität und der Expression, exemplarisch am neuen Adipokin DPP-4, von subkutanem im Vergleich zu viszeralem Fettgewebe zu erarbeiten. Für die Untersuchung wurden schlanke und adipöse Patienten rekrutiert, die jeweils in eine Gruppe mit Typ 2 Diabetes und eine Gruppe ohne Typ 2 Diabetes unterteilt wurden. Für die Untersuchungen haben wir das neue Adipokin Dipeptidyl-Peptidase 4 ausgesucht, welches 2011 mittels Proteomics im Überstand menschlicher Adipozyten erstmals beschrieben wurde (86) . Darüber hinaus ist DPP-4 ein ubiquitär exprimiertes Peptid, welches als Bindungspartner für verschiedene andere Substanzen zählt. Mit Adenosin-Deaminasen nimmt DPP-4 so physiologischerweise im *tissue remodelling*, der T-Zell-Aktivierung und der Potenzierung der inflammatorischen Situation bei übergewichtigen Probanden teil (122-125).

Da bei Übergewichtigen der Anteil des Fettgewebes erhöht ist, könnte damit auch eine erheblich gesteigerte Synthese und Sekretion von Adipokinen einhergehen, was den *Crosstalk* zwischen den Geweben verändern würde. Ebenso könnte die chronisch niedriggradige Inflammation auf diese Weise vermehrt zum Tragen kommen. Dies wird im Zusammenhang mit der Entwicklung und Progression von Folgeerkrankungen des metabolischen Syndroms gesehen, wie CVD, Diabetes mellitus, etc. (126-131). Es wurde gerade dieses Adipokin ausgewählt, da es über seine Rolle in den Adipozyten hinaus als Mediatoren in verschiedenen Signalwegen bekannt ist, z. B in der Inflammation. Außerdem ist DPP-4 im Status des Übergewichts nicht mehr physiologisch reguliert, sodass sich daraus die Überlegung ergibt, dass DPP-4 in der Entwicklung metabolischer Folgeerkrankungen eine tragende Rolle spielen könnte(132).

Zudem soll im Rahmen dieses Projektes auf den *Crosstalk* zwischen dem Fettgewebe und VSMC eingegangen werden und die depotspezifischen Unterschiede herausgestellt werden, da dies für die Entstehung der Insulinresistenz und der Komplikationen des metabolischen Syndroms von

fundamentaler Bedeutung sein könnte. Zu diesem Zweck soll untersucht werden, welche Effekte das konditionierte Medium (CM) von subkutanem und viszeralem Fett u. a. hinsichtlich des VEGF-Gehaltes auf glatte Muskelzellen (SMCs) hatte.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **Antikörper**

DPP-4-Antikörper	abnova (Heidelberg, Deutschland)
<i>VEGF-neutralization antibody</i>	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
VEGF	Millipore (Schwalbach, Deutschland)

#### **ELISAs**

VEGF-ELISA: BioVendor (Heidelberg, Deutschland)  
DPP-4-ELISA: R&D Systems and Streegen Biotechnologies (Lörrach, Deutschland)  
Zell-Proliferation-ELISA (BrdU, chemiluminescent) Roche (Mannheim, Deutschland)

#### **Puffer & Lösungen**

FCS	Gibco (Kalifornien, USA)
Gentamycin	Gibco (Kalifornien, USA)
Fungizone	Invitrogen (Kalifornien, USA)
Cornin 96-well	Corning (New York, USA)

SMC Nährmedium  
25ml FCS  
25ml *supplement mix*  
2,5ml Gentamycin  
100µl Fungizone

SMC Hungermedium  
2,5 ml Gentamycin  
100µl Fungizone

Kulturmedium SMC basal medium (Promo Cell, Heidelberg)

50 ng/ml Amphotericin B

50 µg/ml Gentamycin

## **Zellen**

*Primary human coronary artery smooth muscle cells*      PromoCell (Heidelberg, Deutschland)

## **Geräte**

Brutschrank 6000	Heraeus, Hanau
Dispergierwerkzeug	Ultra-Turrax, IKA (Staufen, Deutschland)
Flüssigstickstofftank GT 140	Air Liquide, Bussy St. Georges (F)
GraphPad	LaJolla, CA
Kippschüttler Duomax 1000	Heidolph, Schwabach
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim, Deutschland
Mikrozentrifuge	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
VersaDocwork 4000 MP Station	Bio-Rad Laboratories München, Deutschland
Zentrifuge Typ 5415 C	Eppendorf (Deutschland)

Aktenzeichen der Patientenstudie, die durch Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zugeteilt wurde: Erweiterung zur Studie 2858

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Fettgewebsisolation und –kultur, Fettexplantate**

Für unsere Versuche gewannen wir Fettgewebeproben sowohl aus subkutanem als auch viszeralem Fettgewebe von erwachsenen Probanden, die sich einer Operation der Bauchhöhle unterzogen, zum Beispiel im Rahmen einer Sigmaresektion nach Sigmadivertikulitis, Leisten-, Nabel- oder Narbenhernien, Adhäsio lysen, Wiederanschluss-Operationen nach Hartmann-Situation u.a. Die Probanden hatten in ihrer aktuellen Krankengeschichte, das heißt bis fünf Jahre zuvor, keine Neoplasie in der Vorgeschichte. Außerdem wurden solche Patienten ausgeschlossen, die aktuell ein erhöhtes CRP im Sinne einer akuten Infektion in ihren Laborparametern vorwiesen.

Diabetiker wie Nicht-Diabetiker wurden in die Versuchsgruppe aufgenommen und später in verschiedene Gruppen unterteilt. Präoperativ wurden Routinelabormarker wie HbA1c, LDH, Leukozyten, CRP bestimmt. Intraoperativ wurden den Probanden erneut ein Serum- und ein EDTA-Röhrchen an Blut entnommen. Diese wurden bei 15.000 *rpm*, 4°C 5 min zentrifugiert, um das Serum zu gewinnen, welches dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde. Die Fettgewebeproben wurden intraoperativ im Zuge der Operation entnommen und steril in 15 ml FCS bei 4°C gelagert. Ein Teil der Proben wurde für anschließende Lysate eingefroren. Anschließend wurde das verbleibende Fettgewebe unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur ggf. von anderem Gewebe getrennt, mit Skalpellen definiert auf eine Größe von circa 10 mg zerkleinert und in je 3 Waschvorgängen bei 1200 rpm 1 min aufgereinigt und zentrifugiert. Danach wurden die Proben in Petrischalen mit Kulturmedium (siehe Angabe Kulturmedium) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die 3 Waschvorgänge wie am Tag zuvor wiederholt; außerdem erfolgte das Wiegen der Fettproben um das daraus resultierende konditionierte Medium (CM), das am dritten Tag abpipettiert wurde, zu errechnen (Einsatz von 1 ml Medium auf 100 mg Fettgewebsexplantate). Wiederum folgte Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 h. Am dritten Tag wurde das konditionierte Medium (CM) in 500 µl / 1 ml Eppendorf-Gefäße, je nach Menge der Fettproben, pipettiert und bei -20°C eingefroren bis zum weiteren Gebrauch.

## **2.2.2 ELISA**

Die Abkürzung ELISA steht für *enzyme-linked immunosorbent assay* und ist eine Nachweismethode, die auf einer chemischen Farbreaktion basiert. Mittels ELISA kann man unter anderem Proteine und Antikörper, aber auch Viren, Hormone u. ä. nachweisen. Um einen Vergleich ziehen zu können, wird stets eine Standardreihe in Doppelbestimmung angesetzt, sowie bei Bedarf auch eine Negativkontrolle in Form von Medium. Außerdem kann die Standardreihe durch eine *high control* und eine *low control*, also eine hohe und eine niedrige Konzentration einer Indikatorsubstanz ergänzt werden. In dieser Arbeit wurden sogenannte *Sandwich-ELISAs* verwendet. Die Auswertung erfolgte über den *BioRad Reader*, die Bildgebung in *Graph Pad Prism*.

### **2.2.2.1 DPP4-ELISA**

Der DPP-4-ELISA wurde mit den Serumproben der Probanden und mit Überständen der Explantate durchgeführt. Für die Serumproben war eine 100fache Verdünnung notwendig, es wurden Aliquots mit 10 µl Probe und 990 µl Verdünnungslösung angesetzt. Die Überstände wurden unverdünnt gemessen. Waschpuffer, Substratlösung und die Standardreihe für DPP-4 wurden wie im Protokoll des Herstellers angegeben, hergestellt. 100 µl des Assay Diluent wurden in jeden Well der ELISA-Platte gegeben, gefolgt von den jeweiligen Aliquots bzw. der Kontrolllösung. Dies wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Hiernach wurden der Inhalt der *Wells* entfernt und die ELISA-Platte viermal mit der Waschlösung gewaschen. Zu jedem *Well* wurde hiernach 200 µl Konjugatlösung hinzugegeben und wieder zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, worauf vier Waschgänge folgten. Nun folgte die Hinzugabe von Substratlösung zu jedem *Well* mit nachfolgender 30minütiger Inkubation im Dunkeln. Zuletzt wurde die Stopplösung hinzugegeben und innerhalb von 30 Minuten im *BioRadReader* bei 450 nm Wellenlänge die Farbreaktion gemessen.

### **2.2.2.2. VEGF-ELISA**

Nach entsprechender Vorbereitung der Waschpuffer und Substratlösungen nach Angaben des Herstellers wurde in jedes leere *Well* insgesamt 100 µl der Verdünnungslösung, in jedes *Well* mit Probenlösung je 50 µl Verdünnungs- und 50 µl der Probenaliquots (Überstände der Explante) gegeben. Dies wurde luftdicht abgedeckt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden

auf einem Schüttler inkubiert. Dem folgten sechs Waschvorgänge und das Hinzufügen von 100 µl Biotin-Konjugat, welches wieder luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur unter Schütteln eine Stunde inkubiert wurde. Nach sechs weiteren Waschgängen wurde verdünntes Streptavidin zu allen *Wells* hinzugegeben und wieder für eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dem folgten sechs weitere Waschgänge und das Hinzufügen der Substratlösung, Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und Hinzufügen der Stoplösung, sowie das Auslesen der Reaktion auf einem Spectrophotometer (*BioRad Reader*) bei 450 nm Wellenlänge.

### **2.2.3 Zellkultur der menschlichen glatten Gefäßmuskelzellen und Proliferationsassay**

Es wurden primäre menschliche Muskelzellen der Koronararterien der Firma PromoCell von vier verschiedenen Spendern verwendet (männliche Kaukasier, 23, 31, 40 Jahre und eine weibliche 56jährige Kaukasierin). Der Proliferationsassay sollte in dieser Arbeit dazu dienen, die Zellproliferation der glatten Muskelzellen zu messen, wenn sie den konditionierten Medien verschiedener Probandengruppen exponiert waren. Hierbei misst man nicht direkt die Anzahl der sich teilenden Zellen, sondern spezifisch die neu synthetisierte DNS als sehr sensitives *Readout*. Um dies von der bereits vorhandenen DNA zu unterscheiden, benutzt man Bromdesoxyuridin (BrdU), welches ein Analogon von Thymidin darstellt. Während der Zellteilung wird es von der Zelle aufgenommen und anstatt von Desoxythymidintriphosphat in die neue DNA eingebaut. Um das BrdU als Marker für die Zellteilung nun sichtbar zu machen, ist die Detektion mit einem Antikörper und eine Chemilumineszenzfärbung notwendig.

Es wurden zunächst die glatten Muskelzellen in 96-*Well*-Kulturen ausgesät (10.000 Zellen/well in je 100 µl Nährmedium) und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurden die Zellen mit Hungermedium gewaschen und danach 24 weitere Stunden in Hungermedium inkubiert. Nun wurde 100 µl konditioniertes Medium oder Kontrollmedium, versetzt mit BrdU-Lösung/well hinzugegeben. Es folgte eine erneute Inkubation für 18 Stunden. Nach Entfernung der konditionierten Medien wurden die Zellen bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen mit einem BrdU Antikörper für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach einem Waschschrift mit der Substratlösung versetzt. Das Chemilumineszenzsignal wurde an einer LUMI-Imager-Apparatur ausgemessen.

## **2.3 Datenpräsentation und statistische Analyse**

Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. Um die statistische Signifikanz zu beweisen, wurde die univariate Varianzanalyse, *analysis of variance* (ANOVA) verwendet (post-hoc-test bei VEGF-Daten: *Bonferroni`s multiple comparison test*). Alle statistischen Analysen wurden mithilfe des Programms GraphPadPrims (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) bzw. JMP statistics Software (SAS Institute Inc., Cary, NC) angefertigt. Dabei wurde ein p-Wert von weniger als 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Gewinnung von subkutanen und viszeralen humanen Fettgewebeproben und Darstellung des Patientenkollektivs**

Für die Materialgewinnung für Lysate und konditioniertes Medium erklärten sich 47 PatientInnen bereit, Gewebeproben abzugeben. Es handelte sich hierbei um 16 weibliche und 31 männliche Patienten. Der Body Mass Index reichte von 18 bis 65,2 kg/m<sup>2</sup>, was einem Mittelwert von 23,35 kg/m<sup>2</sup> entspricht. Das mittlere Alter betrug bei einer Spannweite von 19 bis 87 Jahren 62 Jahre. 14 Patienten waren bereits an Typ 2 Diabetes erkrankt, wovon drei Teilnehmer einen insulinbedürftigen Diabetes mellitus aufwiesen. Sechs Patienten nahmen orale Antidiabetika wie Metformin und Glimperid bzw. Glibenclamid ein. Die hip-to-waist-ratio (HWR) betrug einen Mittelwert von rund 1,03. Der mittlere HbA1c im Serum lag bei 5,5%. 13 Patienten wurden wegen einer Hernie operiert, die durch vorangegangene Operationen (Narbenhernie), künstliche Darmausgänge oder Leisten-, beziehungsweise Zwerchfellbrüche bedingt war. 12 weitere Patienten unterzogen sich einer Wiederanschlussoperation bzw. einer Stoma-Rückverlagerung, etwa nach vorangegangener Sigmadivertikulitis. Neun Teilnehmer wurden wegen einer Sigmadivertikulitis konventionell bzw. laparoskopisch operiert (im entzündungsfreien Intervall); sechs Patienten wurden wegen Erkrankungen des Pankreas operiert, wie etwa Pseudozysten beziehungsweise chronischer Pankreatitiden. Andere Gründe einer Operation waren Adhäsioyosen, Cholezystitiden, bzw. Magenentleerungsstörungen bei Z. n. Whipple-Operation.

### **3.1.2 Diabetiker, unabhängig vom Gewicht**

Von den vierzehn Diabetikern wiesen zwei einen insulinbedürftigen Diabetes mellitus auf, sechs weitere waren medikamentös mit Glibenclamid, Glimpirid oder Metformin eingestellt, siehe Tabelle 1. Ein weiterer Proband war diätetisch eingestellt; die restlichen Diabetiker konnten keine Angaben zu der Therapieform machen. In der Gruppe der Diabetiker waren vier weibliche und zehn männliche Probanden. Neun der vierzehn Patienten lagen mit ihrem BMI  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ; die insulinbedürftigen Diabetiker waren normalgewichtig. Der Mittelwert beim BMI betrug  $22 \pm 6 \text{ kg/m}^2$ ; beim Gewicht  $64 \text{ kg} \pm 26 \text{ kg}$ . Der HbA1c als Parameter für den Langzeitblutzucker wurde bei dreizehn Patienten bestimmt, der Mittelwert war hier  $5,9 \pm 0,6 \%$ , was einer guten Einstellung entspricht. Die Leberparameter GOT und GPT waren mit einem Mittelwert von  $52 \pm 21 \text{ U/l}$  beziehungsweise  $20 \pm 19 \text{ U/l}$  weitestgehend unauffällig; ebenso die  $\gamma$ -GT mit  $40 \pm 28 \text{ U/l}$ . Die Leukozyten waren gemittelt ebenfalls im Normbereich ( $7,7/\mu\text{l} \pm 0,2$ ). Das als Entzündungsmarker geltende C-reaktive Protein war mit 1 nicht nennenswert erhöht. Das mittlere Alter in der Gruppe der Diabetiker betrug 60 Jahre  $\pm 5,7$  Jahre. Gelegentlicher Alkoholkonsum in Maßen wurde von zwei Probanden angegeben. Es waren zwei ehemalige Raucher und zwei aktuell stark rauchende Probanden (20 bzw. 25 Zigaretten pro Tag) in dem Kollektiv enthalten.

### 3.1.2 Adipöse Diabetiker

Von den Diabetikern waren insgesamt 9 Patienten mit einem BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> und somit adipös, davon zwei Frauen, siehe Tabelle 1. In dieser Gruppe erhöhte sich der mittlere BMI und das mittlere Körpergewicht demnach auf  $35,3$  kg/m<sup>2</sup>  $\pm 12,4$  bzw.  $104$  kg  $\pm 31$ . Auch der Mittelwert des HbA1c fiel mit  $6,3$  %  $\pm 0,4$  höher aus als im Kollektiv aller Diabetiker. Hervorzuheben ist auch der erhöhte Mittelwert für LDH mit  $257 \pm 56$  U/L. Der mittlere Wert der HWR betrug  $1,03 \pm 0,1$ . Alkoholkonsum wurde lediglich von zwei Probanden gelegentlich angegeben.

	<b>Diabetiker gesamt</b>	<b>Diabetiker, adipös</b>	<b>Diabetiker, schlank</b>
Verhältnis Männer : Frauen	10:4	7:2	3:2
Alter (Jahren)	$62 \pm 14$	$54 \pm 13$	$71 \pm 12$
Gewicht (kg)	$85 \pm 32$ **	$134 \pm 62$	$63 \pm 12$
Größe (m)	$1,71 \pm 0,12$	$1,74 \pm 0,17$	$1,66 \pm 0,11$
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$32 \pm 13$	$43 \pm 12$	$21 \pm 2$
HbA1c (%)	$6,0 \pm 2,0$	$6,5 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,7$
CRP (mg/dl)	$0,6 \pm 0,6$	$1 \pm 1$	$1 \pm 1$
Leukozyten (/nl)	$6,7 \pm 2,0$	$5,8 \pm 2,5$	$6,7 \pm 1,2$
GOT (U/l)	$31 \pm 13$	$31 \pm 5$	$31 \pm 21$
GPT (U/l)	$23 \pm 9$	$24 \pm 13$	$17 \pm 8$
Gamma-GT (U/l)	$37 \pm 15$ **	$33 \pm 9$ **	$78 \pm 78$ **

**Tabelle 1: Patientenkollektiv der Diabetiker:** Dargestellt ist das Patientenkollektiv der diabetischen Probanden, zunächst gesamt, anschließend BMI-abhängig differenziert nach schlanken und adipösen Diabetikern. Grenz-BMI war dabei  $25$  kg/m<sup>2</sup>; der erste Wert ist, außer bei der Altersangabe; der Mittelwert mit nachfolgender Standardabweichung. \*\* bezeichnet einzelne hohe Werte, die zu hohen Standardabweichungen führen.

### **3.1.3. Nichtdiabetiker, unabhängig vom Körpergewicht**

Das Kollektiv der Nichtdiabetiker bestand aus 33 Probanden, davon zwölf Frauen, vergleiche Tabelle 2. Das mittlere Gewicht betrug  $67 \text{ kg} \pm 14$  bei einem mittleren BMI von  $21,9 \text{ kg/m}^2 \pm 3$ . Der Mittelwert des HbA1c belief sich in dieser Gruppe auf  $5,3 \% \pm 0,3$ . Die HWR betrug  $1 \pm 0,1$ . Es gab acht Raucher in dem Kollektiv, sowie drei ehemalige Raucher, alle übrigen Probanden waren Nichtraucher. Sechs Probanden gaben einen täglichen Alkoholkonsum im Sinne eines Abusus an, zwei Patienten waren ehemalige Alkoholiker.

### **3.1.4 Adipöse Nichtdiabetiker**

Die Gruppe der adipösen Nichtdiabetiker umfasste 19 Probanden, wovon sechs Frauen waren, vergleiche Tabelle 2. Der mittlere BMI bzw. das mittlere Körpergewicht ergab Werte von  $36,6 \text{ kg/m}^2 \pm 9,12$  bzw.  $118 \text{ kg} \pm 46 \text{ kg}$ . Der HbA1c lag gemittelt bei  $5,6 \% \pm 0,14$ . Die HWR belief sich auf  $1,01 \pm 0,08$ , das mittlere Alter lag bei  $54 \text{ Jahren} \pm 21$ .

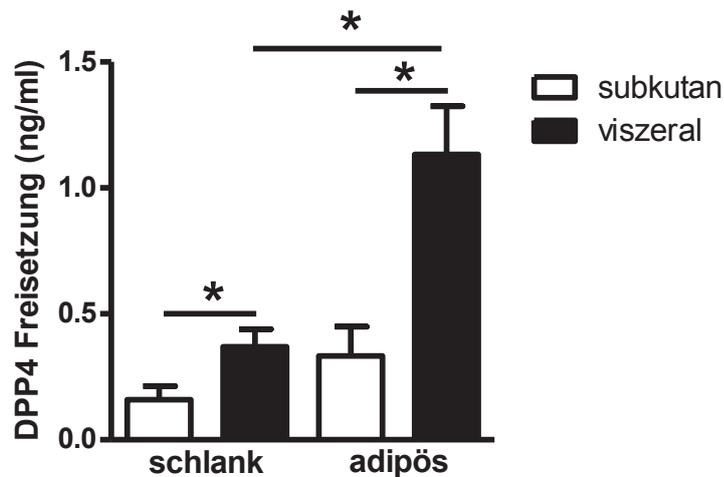
Vier Probanden gaben täglichen Alkoholkonsum an, zwei Patienten waren ehemalige Alkoholiker. Es gab sechs starke Raucher in der Gruppe, sowie zwei ehemalige Raucher.

	<b>Nichtdiabetiker gesamt</b>	<b>Nichtdiabetiker, adipös</b>	<b>Nichtdiabetiker, schlank</b>
Verhältnis Männer : Frauen	21:12	11: 5	10:7
Alter (Jahre)	$49 \pm 7$	$56 \pm 18$	$62 \pm 16$
Gewicht (kg)	$85 \pm 33$	$106 \pm 35$	$65 \pm 9$
Größe (m)	$1,73 \pm 0,1$	$1,75 \pm 0,1$	$1,71 \pm 0,1$
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$29 \pm 9,0$	$34 \pm 9$	$22 \pm 0$
HbA1c (%)	$5,6 \pm 0,5$	$4,9 \pm 2$	$5,2 \pm 1$
CRP (mg/dl)	$1 \pm 1$ **	$2,1 \pm 4$	$1 \pm 1$
Leukozyten (/nl)	$8,3 \pm 3,0$	$8 \pm 1,8$	$9 \pm 3,8$
GOT (U/l)	$24 \pm 7$ **	$31 \pm 14$	$24 \pm 8$
GPT (U/l)	$25 \pm 16$ **	$34 \pm 23$	$21 \pm 21$ **
Gamma-GT (U/l)	$34 \pm 21$	$75 \pm 156$ **	$87 \pm 209$ **

**Tabelle 2: Patientenkollektiv der Nichtdiabetiker:** Dargestellt ist das Patientenkollektiv der Nichtdiabetiker, zunächst gesamt, anschließend BMI-abhängig differenziert nach schlanken und adipösen Diabetikern. Grenz-BMI war dabei  $25 \text{ kg/m}^2$ ; der erste Wert ist, außer bei der Altersangabe; der Mittelwert mit nachfolgender Standardabweichung. \*\* bezeichnet einzelne hohe Werte, die zu hohen Standardabweichungen führen.

### 3.2. DPP-4

In der hier aufgeführten Versuchsreihe konnten wir zeigen, dass die Freisetzung von DPP-4 im viszeralen Fettgewebe im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe signifikant erhöht ist, vergleiche Abbildung 1. Dies gilt sowohl für die Versuchsgruppe der schlanken Probanden, in der DPP-4 in den viszeralen Adipozyten in einer Höhe von fast 0,5 ng/ml sezerniert wurde, als auch für die Gruppe der Übergewichtigen. Dort betrug die Sekretion mehr als 1 ng/ml und war somit signifikant höher als bei den schlanken Testpersonen.

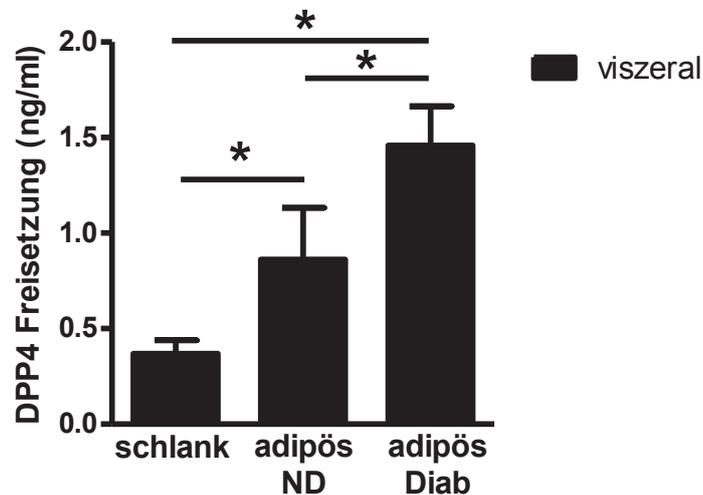


**Abb. 1: DPP-4-Freisetzung in subkutanem und viszeralem Fettgewebe normalgewichtiger und übergewichtiger Probanden:**

Die Menge von DPP4 in den konditionierten Medien der verschiedenen Fettgewebsproben wurde mittels ELISA gemessen. Subkutane Proben der schlanken Probanden: n = 12; viszerale Proben der schlanken Probanden: n = 13; subkutane und viszerale Proben der adipösen Probanden n = 11. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen sind mit \* gekennzeichnet (p < 0.05). Die Freisetzung von DPP-4 ist im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Probanden deutlich erhöht, im Gegensatz zu viszeralem und subkutanem Fettgewebe übergewichtiger und normalgewichtiger Probanden. Eine signifikant größere Sekretion von DPP-4 findet ebenfalls im viszeralen Fettgewebe der normgewichtigen Testpersonen relativ gesehen zu dem subkutanen Depot statt. Am stärksten ausgeprägt ist die Expression von DPP-4 bei den viszeralen Proben der übergewichtigen Nichtdiabetikern.

*Daten publiziert in: (133) Diabetes Care, December 2013 36:12 4083-4090, 2013: Adipose DPP4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro by Henrike Sell, Matthias Blüher, Nora Klöting, Raphaela Schlich, Miriam Willems, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, Arne Dietrich, Barbara A. Fielding, Peter Amer, Keith N. Frayn, Jürgen Eckel*

In einer weiteren Division der Experimente wurde die Gruppe der übergewichtigen Probanden in adipöse Diabetiker und Nichtdiabetiker unterteilt. In dieser Versuchsreihe fand man ebenfalls signifikante Unterschiede zueinander, aber auch zu den normgewichtigen Probanden, siehe Abbildung 2. Darin zeigt sich die höchste Sekretion von DPP-4 bei den übergewichtigen Diabetikern mit fast 1,5 ng/ml, im Gegensatz zu den übergewichtigen Nichtdiabetikern, die etwas über 1 ng/ml Gehalt an DPP-4 aufweisen. Dies beschreibt einen signifikanten Unterschied. Ebenso zeichnet sich die Differenz der DPP-4-Freisetzung zwischen normgewichtigen Nichtdiabetikern sowie beiden übergewichtigen Gruppen aus (133).



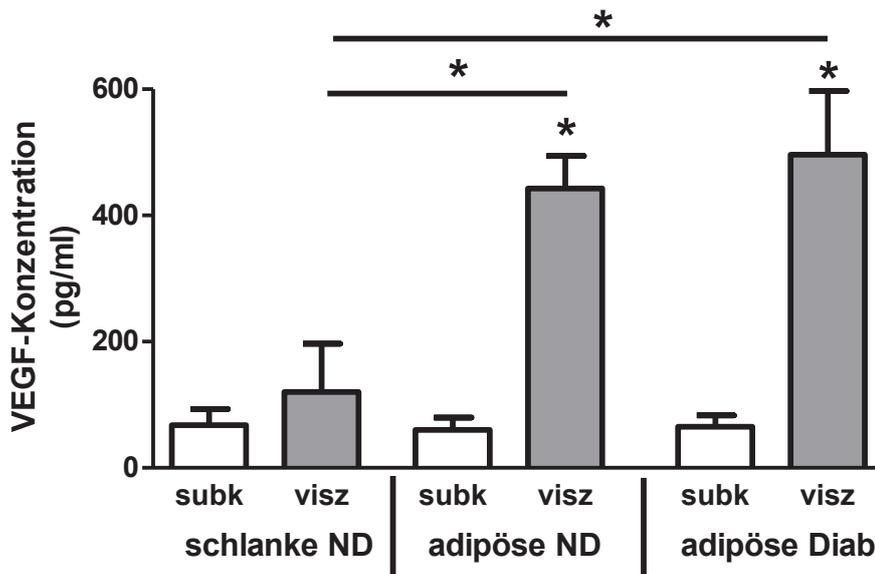
**Abb. 2: DPP-4-Freisetzung im viszeralen Fettgewebe normgewichtiger Probanden vs. übergewichtige Nichtdiabetiker vs. übergewichtige Diabetiker:**

*Legende: ND: Nichtdiabetiker, Diab: Diabetiker; die Freisetzung wird in ng/ml angegeben; Probanden der schlanken Nichtdiabetiker: n = 12; Probanden der adipösen Nichtdiabetiker: n = 6; Probanden der adipösen Diabetiker: n = 5.* Die übergewichtigen Diabetiker sezernieren im viszeralen Fettgewebe die größte Menge an DPP-4, signifikant unterschiedlich zu den Nichtdiabetikern. Bei den Nichtdiabetikern sind die übergewichtigen Probanden den normgewichtigen in ihrer DPP-4-Freisetzung signifikant überlegen.

*Daten publiziert in: (133) Diabetes Care, December 2013 36:12 4083-4090, 2013: Adipose DPP4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro by Henrike Sell, Matthias Blüher, Nora Klötting, Raphaela Schlich, Miriam Willems, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, Arne Dietrich, Barbara A. Fielding, Peter Arner, Keith N. Frayn, Jürgen Eckel*

### 3.3 VEGF

Die Freisetzung von VEGF zeigte sich insgesamt im viszeralen Fettgewebe stets größer, relativ gesehen zum subkutanen Fettgewebe, vergleiche Abbildung 3. Dies war in allen drei untersuchten Gruppen der schlanken und übergewichtigen Nichtdiabetiker, sowie der übergewichtigen Diabetiker der Fall. Zudem zeigten sich signifikante Unterschiede innerhalb der viszeralen Fettgewebe der verschiedenen Gruppen. Hier wiesen die übergewichtigen Diabetiker den signifikant höchsten Gehalt an VEGF auf, in Relation zu den übergewichtigen und auch den schlanken Nichtdiabetikern. Außerdem war der VEGF-Gehalt im viszeralen Fett der Diabetiker relativ zu dem im subkutanen Fettgewebe signifikant erhöht. Bei den übergewichtigen Nichtdiabetikern war die Freisetzung von VEGF im Verhältnis viszeral zu subkutan signifikant in ersterer erhöht. Zudem zeigte sich ein mengenmäßig signifikant größerer VEGF-Gehalt in den viszeralen Adipozyten der übergewichtigen Nichtdiabetikern gegenüber den schlanken Nichtdiabetikern. Bei den schlanken Nichtdiabetikern verhielt sich VEGF subkutan ähnlich wie viszeral in den niedrigsten Dosen der gesamten Vergleichsgruppe.

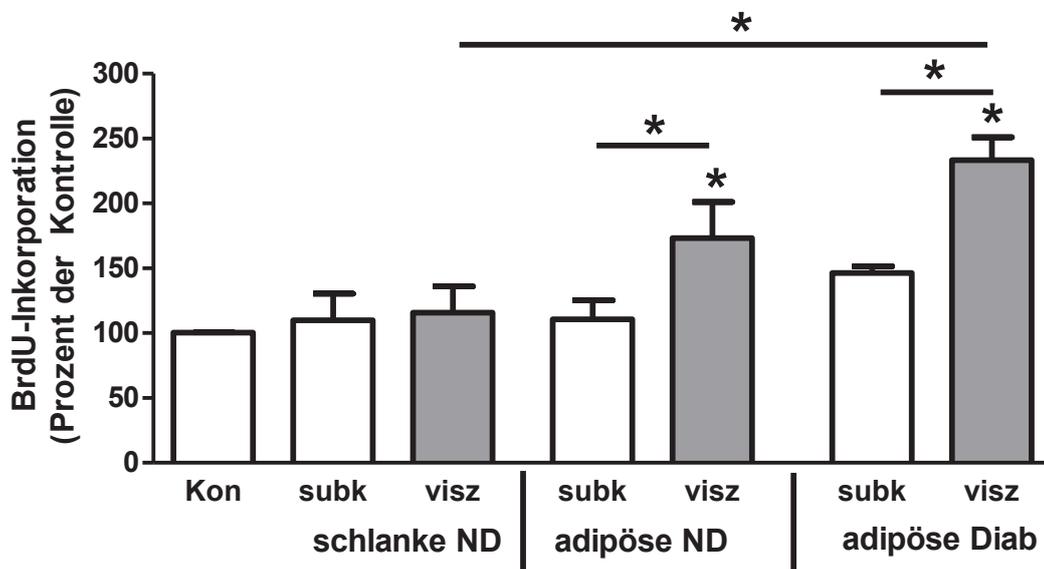


**Abb. 3: VEGF-Konzentration in pg/ml bei schlanken (n = 9) und adipösen Nichtdiabetikern (n = 7), sowie adipösen Diabetikern (n = 6) in subkutanem und viszeralem Fettgewebe:**

*Legende:* subk: subkutanes Fettgewebe; visz: viszerales Fettgewebe; ND: Nichtdiabetiker; Diab: Diabetiker. Die VEGF-Konzentration in konditionierten Medien wurde mittels ELISA gemessen. Im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe ist der Gehalt an VEGF in den konditionierten Medien der viszeralen Fettgewebe stets deutlich erhöht; am höchsten bei den übergewichtigen Diabetikern. Es herrschen signifikante Unterschiede zwischen den viszeralen VEGF-Gehalten der unterschiedlichen Probandengruppen.

*Daten publiziert in:* (120) *Mediators of Inflammation, Volume 2013 (2013), Article ID 982458, doi: 10.1155/2013/982458, 2013: VEGF in the crosstalk between human adipocytes and*

Der Einfluss von VEGF konnte auch in Bezug auf die SMC mit weiteren Experimenten dargestellt werden. So wurde eine Messung der BrdU-Inkorporation durchgeführt, um die Proliferation der glatten Muskelzellen nach Behandlung mit konditionierten Medien der einzelnen Fettgewebe zu überprüfen, siehe Abbildung 4. Hierbei zeigte sich, dass das konditionierte Medium des viszeralen Fettgewebes übergewichtiger Probanden signifikant die Proliferation von glatten Muskelzellen erhöhte. Bei Nichtdiabetikern mit Übergewicht war dies mit fast 150% im Vergleich zur Kontrolle der Fall, was auch signifikant zu den subkutanen, kaum erhöhten Proliferationsdaten derselben Probandengruppe, verändert war. Die konditionierten Medien der übergewichtigen Diabetiker zeigten demgegenüber sogar noch größere Effekte auf die Proliferation, nämlich fast 250% relativ zur Kontrolle. Dies ist nicht nur eine signifikante Erhöhung gegenüber dem subkutanen Gewebe der adipösen Diabetiker, sondern auch gegenüber der Proliferation im konditionierten Medium der viszeralen Adipozyten schlanker Nichtdiabetiker.



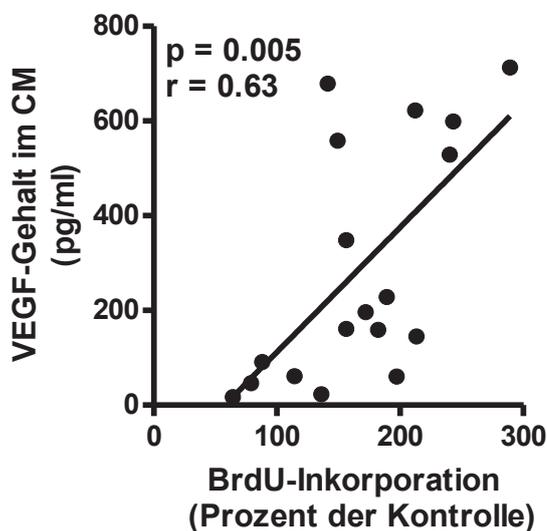
**Abb. 4:** Proliferation von VSMC nach Behandlung mit konditionierten Medien von subkutanem und viszeralem Fettgewebe schlanker (n=10) und übergewichtiger Nichtdiabetikern (n=11), sowie übergewichtiger Diabetikern (n=6) im Vergleich zur Kontrollgruppe, gemessen an der BrdU-Inkorporation:

*Legende:* Kon: Kontrolle; subk: subkutanes Fettgewebe, visz: viszerales Fettgewebe; ND: Nichtdiabetiker, Diab: Diabetiker. Während die Proliferation der VSMC bei den normalgewichtigen Testpersonen unabhängig vom Ursprung des CMs eine ähnliche Proliferation wie die Kontrolle zeigt, ist die Proliferation der VSMC nach Behandlung mit CM übergewichtiger Diabetiker und Nichtdiabetiker signifikant erhöht.

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit \* (im Vergleich zur Kontrolle), bzw. mit \* und darunter eingefügtem Balken (im Vergleich zur jeweilig anderen Probandengruppe) gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

Daten publiziert in: (120) *Mediators of Inflammation*, Volume 2013 (2013), Article ID 982458, doi: 10.1155/2013/982458, 2013: *VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue by* *Raphaela Schlich, Miriam Willems, Sabrina Greulich, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, D. Margriet Ouwens, Bujar Maxhera, Artur Lichtenberg, Jürgen Eckel, Henrike Sell*

Korreliert man nun den Gehalt von VEGF im konditionierten Medium des viszeralen Fettes aller Probanden mit der BrdU-Inkorporation, so lässt sich auch hier wieder feststellen, dass mit steigender VEGF-Konzentration auch die Proliferation, hier als BrdU-Inkorporation gemessen, ansteigt, vergleiche Abbildung 5 (120). Dies könnte für die starke Induktion der Proliferation sprechen, die VEGF auslöst.



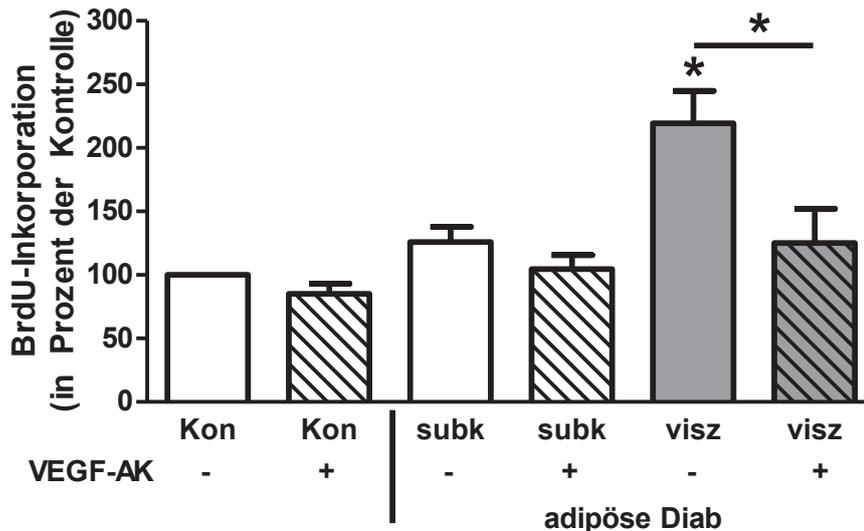
**Abb. 5:** Korrelation von VEGF-Gehalt in konditioniertem Medium (CM) der viszeralen Fettgewebsexplantate zur Proliferation, gemessen an der BrdU-Inkorporation

Legende: CM: konditioniertes Medium. Je mehr VEGF im konditionierten Medium der viszeralen Fettgewebsexplantate enthalten ist, desto größer war auch die Proliferation, gemessen an der BrdU-Inkorporation.

Daten publiziert in: (120) *Mediators of Inflammation*, Volume 2013 (2013), Article ID 982458, doi: 10.1155/2013/982458, 2013: *VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue by* *Raphaela Schlich, Miriam Willems, Sabrina Greulich, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, D. Margriet Ouwens, Bujar Maxhera, Artur Lichtenberg, Jürgen Eckel, Henrike Sell*

Um auszuschließen, dass die Proliferation von anderen Mediatorsubstanzen ausgelöst wurde, die in den vorangegangenen Versuchen nicht berücksichtigt wurden, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt, bei dem VEGF durch einen Antikörper blockiert und so nicht mehr als Mediator tätig wurde. In der Vergleichsreihe wurde ein Proliferationsassay ohne VEGF-Blockierung durchgeführt, vergleiche Abbildung 6. In den Ergebnissen zeigt sich, dass

mit Blockierung von VEGF auch die Proliferation deutlich zurückgeht, bei den konditionierten Medien des viszeralen Fettgewebes der übergewichtigen Diabetiker sogar signifikant, auch im Gegensatz zu dem nicht-blockierten *Proliferationassay* mit den konditionierten Medien der *VATs* der Übergewichtigen. Nach Behandlung mit den konditionierten Medien der subkutanen Fettgewebsexplantate bleibt die Proliferation wie schon in den anderen Versuchen ähnlich wie bei den Kontrollen.



**Abb. 6: Proliferation in VSMC nach Behandlung mit konditionierten Medien von subkutanem und viszeralem Fettgewebe übergewichtiger Diabetiker (n=4, Kontrolle n=6) mit und ohne VEGF-Blockierung im Vergleich zu Kontrollgewebe, gemessen an der BrdU-Inkorporation**

*Legende:* Kon: Kontrolle; subk: subkutanes Fettgewebe; visz: viszerales Fettgewebe; VEGF-AK: VEGF-Antikörper; Diab: Diabetiker. Mit VEGF-Blockierung zeigt sich in allen Gruppen eine der Kontrolle ähnliche Proliferation. Bei ungestörtem Einfluss von VEGF zeigt sich hingegen eine deutlich höhere Proliferation, vor allem nach Behandlung mit CM der adipösen Diabetiker. Signifikante Unterschiede sind mit \* (im Vergleich zur Kontrolle), bzw. mit \* und darunter eingefügtem Balken (im Vergleich zur jeweilig anderen Probandengruppe) gekennzeichnet ( $p < 0.05$ ).

*Daten publiziert in:* (120) *Mediators of Inflammation*, Volume 2013 (2013), Article ID 982458, doi: 10.1155/2013/982458, 2013: *VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue by* Raphaëla Schlich, Miriam Willems, Sabrina Greulich, Florian Ruppe, Wolfram Trudo Knoefel, D. Margriet Ouwens, Bujar Maxhera, Artur Lichtenberg, Jürgen Eckel, Henrike Sell

## **4 Diskussion**

### **4.1 Subkutanes / viszerales Fett**

Beim Menschen werden verschiedene Fettverteilungsmuster am Körper unterschieden. Zum einen gibt es Menschen, die im Status des Übergewichtes eher eine gynoide Form, auch „Birnenform“ genannte Fettverteilung annehmen. Hiermit meint man das vorwiegend gluteal-femorale Verteilungsmuster, welches auch als Adipositas der unteren Körperhälfte bezeichnet wird. Diese Form des Übergewichts wird im Hinblick auf Erkrankungen wie Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen als günstigere Form angesehen (134-137). Demgegenüber steht die androide, „apfelähnliche“ Form der Adipositas, bei der die Adipozyten vor allem intraabdominell, i.e. „zentral“ angereichert sind. Dieses Verteilungsmuster wird als prädiagnostisch für die o.g. Komplikationen des metabolischen Syndroms gesehen (134).

Die Probanden, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben, wurden ebenfalls auf diese Eigenschaften hin überprüft. Dazu wurde der Umfang der Hüfte mit dem Umfang der Taille korreliert, die sogenannte *Hip-waist-ratio (HWR)* wurde gebildet. Dieser gilt bei Männern ab einem Quotienten von 1,0 und größer als gesundheitlich bedenklich; bei Frauen beträgt der Grenzwert  $\geq 0,85$ . Es konnte bei sieben Patienten eine Korrelation zwischen erhöhtem *HWR* und bereits diagnostiziertem Diabetes mellitus (sowohl insulinbedürftig als auch medikamentös behandelt) festgestellt werden. Bei fünf weiteren Patienten, die bereits einen Diabetes vorwiesen, wurde ein grenzwertig unterhalb des kritischen Wertes erweiterbarer *HWR* festgestellt (0,95-0,99). Darüber hinaus gab es erhöhte Werte bei sechzehn anderen Patienten, die keinen Diabetes in der Anamnese vorwiesen.

Die Fettdepots des menschlichen Körpers unterscheiden sich nicht nur in ihrer Lokalisation, sondern auch in metabolischen Eigenheiten. Diese Eigenschaften sind beim gesunden, schlanken Menschen vernachlässigbar, jedoch werden sie bei Übergewichtigen und Diabetikern eine unmittelbare Gefahrenquelle. So ist etwa nachgewiesen worden, dass vermehrtes viszerales Fett die Entwicklung eines metabolischen Syndroms begünstigt. Die im Überfluss enteral resorbierten Fettsäuren tragen zur Entwicklung einer hepatischen Insulinresistenz bei, wie Bergman et al. zeigen konnten (138): In der anatomischen Nähe des viszeralen Fettdepots zur Leber liegt nach Meinung mehrerer Arbeitsgruppen (134;138) die Begründung, weshalb vor allem viszerale Adipozytenhypertrophie (durch Einbau der freien Fettsäuren in das Gewebe) stattfindet. Dieser als „portal theory“ bezeichnete Zusammenhang zwischen Leber und viszeralem Fett konnte von Item et al. untermauert werden (134). Sie konnten zeigen, dass sowohl omentales als auch mesenteriales Fett, welches beide zur Gruppe der viszeralen Fettdepots gehören, vermehrt Adipokine und Fettsäuren freisetzen und diese über die Portalvene an die Leber abgeben. Damit, so die Hypothese, würde die Kapazität der Leber diese Substrate aufzunehmen, überschritten

werden und die hepatische Insulinresistenz bzw. im Falle der Fettsäuren die *Steatosis hepatis* („Fettleber“) resultieren. Bekannt ist auch, dass durch die Adipozytenhypertrophie eine Diskrepanz zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf besteht, was zu einer hypoxischen Situation im betreffenden Gewebe führt. Dieser Sauerstoffmangel führt zu einer Entzündungsreaktion im Sinne von vermehrter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (139;140). Dies hat wiederum zur Folge, dass Adipokine wie DPP-4 im Fettgewebe vermehrt freigesetzt werden (134;141).

Wie Blüher et al. (142) zeigen konnten, gibt es jedoch auch Übergewichtige, die anscheinend von den Komplikationen des metabolischen Syndroms (noch) nicht betroffen sind („*healthy obese*“). Bei diesen Personen konnte eine signifikant geringere Menge an viszeralem Fett, erhaltene Insulinsensitivität, geringerer Leberfettgehalt und erhaltene Adipozytenfunktion nachgewiesen werden. Demgegenüber steht die deutlich erhöhte viszerale Fettmasse, die bei Übergewichtigen mit bereits vorhandenen Komorbiditäten wie Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen einhergehen kann. Auch die Adipozytenhypertrophie und die damit assoziierte Funktionsstörung und veränderte Sekretion der Adipokine waren bei dieser als „*unhealthy obese*“ beschriebenen Gruppe deutlich vorhanden. Auch in der hier vorliegenden Arbeit gibt es Anhaltspunkte dafür, dass es die Gruppe der „*healthy obese*“ mit erhaltener Adipozytenfunktion und normaler Adipokinsekretion bzw. -expression gibt.

Die gestörte Adipokinsekretion im viszeralen Fett ließ sich auch in dieser Arbeit in den durchgeführten Westernblots nachweisen. Bei DPP-4 ist die Expression bei allen vier Probandengruppen viszeral signifikant höher als im subkutanen Fettgewebe; bei den übergewichtigen Probanden in einem quantitativ nochmals höheren Ausmaß als bei den schlanken Patienten. Dies spricht für die veränderte Proteinexpression, die von Blüher et al. beschrieben wird. Dass die Expression bei den übergewichtigen Nichtdiabetikern ähnlich hoch wie bei den übergewichtigen Diabetikern ist, könnte einen weiteren Hinweis auf die Theorie geben, die Blüher et al in ihrem Review zum Thema machen: dass augenscheinlich gesunde Übergewichtige mit erhaltener Insulinsensitivität und keinerlei Komorbiditäten auf Proteineebene bereits Eigenschaften eines Prädiabetikers bzw. Diabetikers aufweisen. Dafür könnte auch sprechen, dass die Sekretion von DPP-4 im subkutanen Fettgewebe dieser (übergewichtigen, nichtdiabetischen) Probanden auch relativ hoch ist, sogar höher als im subkutanen Fettgewebe der adipösen Diabetiker.

## **4.2 Adipokine**

Es ist hinreichend belegt, dass Fettgewebe nicht nur als Speicherort zu verstehen ist, sondern auch wesentliche endokrine Funktionen innehat (129;143). Daher gilt es, die sezernierten Stoffe, welche als Adipokine bezeichnet werden, hinsichtlich ihrer Funktion und Wirkungsweise genauer zu charakterisieren und in den physiologischen Ablauf der Stoffwechselfunktion einzuordnen.

Hinsichtlich des Ursprungs der Adipokine gibt es zahlreiche Studien, die belegen, dass es durchaus Unterschiede gibt, ob etwa subkutane oder viszerale Adipozyten untersucht werden. So gilt viszerales Fett als bedrohlicher, was die Entwicklung von Krankheiten wie Diabetes mellitus, Schlaganfall und Koronare Herzkrankheit angeht.

Vor allem die Tatsache, dass viele Adipokine im Status des Übergewichts anders sezerniert und exprimiert werden als bei Normalgewichtigen, gibt Hinweise darauf, dass diese Stoffe maßgeblich im veränderten Stoffwechsel interagieren und möglicherweise auch an der Entstehung von Komplikationen des Übergewichtes, wie Koronare Herzkrankheit und Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt sind (132). In dieser Arbeit wurde das neue Adipokin DPP-4 untersucht, welches als proinflammatorisch gilt. Dabei hat DPP-4 mit anderen Adipokinen gemeinsam, dass es sich nicht nur in seiner Expression zwischen übergewichtigen und normalgewichtigen Menschen unterscheidet, sondern auch abhängig von der Art des Fettdepots. Außerdem folgt DPP-4 im Status des Übergewichtes nicht länger dem physiologischen Regelkreis, dem es normalerweise unterliegt (132).

### 4.2.1 DPP-4

Die Wirkung von DPP-4 ist Gegenstand vieler aktueller wissenschaftlicher Studien (141;144). DPP-4 ist ein wichtiges Bindeglied zwischen den verschiedenen Symptomen des metabolischen Syndroms. Es hat sich gezeigt, dass die Konzentrationen der Exoprotease im übergewichtigen Zustand sowohl in seiner löslichen Form im Serum, als auch in der transmembranären Form, vor allem in Adipozyten (und hier im Besonderen in viszeralen Adipozyten), erhöht ist (141). DPP-4 bedient als Substrate auch *Glucagon-like peptide-1* und *gastric inhibitory polypeptide*, welche zum großen Teil für den sogenannten Inkretin-Effekt verantwortlich sind. Dieser Effekt bewirkt die postprandiale Insulinsekretion (145). DPP-4 hemmt diese Enzyme, sodass bei erhöhten Spiegel von DPP-4 folglich weniger Insulinsekretion mit konsekutiver Hyperglykämie resultieren könnte. GLP-1 bleibt jedoch auch unter diesen Hyperglykämien, wie etwa beim Diabetes mellitus Typ 2, aktiv. Daher sind DPP-4-Inhibitoren, die diesen Effekt von GLP-1 weiter unterstützen sollen, als orale Antidiabetika beim nichtinsulinbedürftigen Diabetes mellitus im Einsatz (146).

Das DPP-4-*Signalling* ist im Übergewicht gestört und könnte so die Entstehung von Diabetes mellitus im Zuge des metabolischen Syndroms fördern. Durch weiterführende Experimente müsste geklärt werden, ob durch das veränderte *Signalling* nachfolgend auch die Insulinsensitivität verändert ist (141). In ihrer Veröffentlichung zeigten Lamers et al., dass DPP-4 zwar in vielen Geweben und in unterschiedlichen Formen sezerniert wird, jedoch weist die aktuelle Studienlage auch darauf hin, dass vor allem in viszeralem Fett adipöser Menschen erhebliche Mengen an DPP-4 freigesetzt werden. So wird DPP-4 von viszeralen Adipozyten bis zu fünffachmehr sezerniert als dies in subkutanem Fettgewebe der Fall ist. Auch scheinen übergewichtige Diabetiker in höheren Mengen DPP-4 zu exprimieren und sezernieren als dies bei übergewichtigen Nichtdiabetikern und schlanken Probanden der Fall ist.

Dies konnte mit den durchgeführten Versuchen der *Westernblot*-Reihe ebenfalls nachvollzogen werden. Zum einen konnte in den Experimenten nachgewiesen werden, dass in viszeralem Fettgewebe signifikant mehr DPP-4 exprimiert wird, als in subkutanem Fettgewebe. Ebenso konnte verifiziert werden, dass die übergewichtigen Probanden eine deutlich erhöhte (bis 1,49fach mehr) Expression von DPP-4 aufwiesen, als die schlanken Mitprobanden. Dies stützt die Arbeitsthese, dass DPP-4 in viszeralem Fettgewebe Übergewichtiger vermehrt synthetisiert wird. Durch Übergewicht und die Hypertrophie im übermäßig vorhandenem Fettgewebe wird im selbigen Hypoxie und somit eine Dysregulation der sezernierten Adipokine hervorgerufen. Die Hypertrophie steht dabei vermutlich in unmittelbarem Zusammenhang zur veränderten Adipokinsekretion und der gestörten Insulinresistenz, die wiederum die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 zur Folge haben könnte (147). So werden durch die Hypoxie vermehrt

inflammatorische Reagenzien im Sinne der chronischen niedriggradigen Inflammation freigesetzt. Famulla et al. haben in *in-vitro*-Studien physiologische Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 10 % nachgestellt und in diesen primäre humane Adipozyten differenziert. Dabei zeigte sich, dass unter anderem die DPP-4-Sekretion bei niedrigen Sauerstoffleveln hochreguliert war. Das könnte als Argument dafür gewertet werden, dass DPP-4 an der niedriggradig chronischen Inflammation beteiligt ist (148). Dies wird auch gestützt durch die hiesigen Ergebnisse, welche die vermehrte Sezernierung von DPP-4 im viszeralen Fettgewebe der übergewichtigen Probanden zeigen. Auch dass es bei den übergewichtigen Diabetikern erhöht freigesetzt wird, stützt dies, da Diabetiker sich, wie bereits erwähnt, im Stadium der niedriggradigen chronischen Inflammation befinden (149). Sell et al. konnten in anderen Experimenten ebenfalls bestätigen, dass DPP-4 im Übergewicht eine wichtige Rolle zu spielen scheint. In Experimenten, in denen *in vivo* die DPP-4-Freisetzung gemessen wurde, zeigte sich eine höhere DPP-4-Freisetzung in übergewichtigen Probanden. Zudem stieg die Menge an gemessenem DPP-4 mit steigendem HbA1c, der mittleren Adipozytengröße und der viszeralen Fettmenge. Je höher die DPP-4-Konzentration, desto mehr Makrophagen zeigten sich in dem untersuchten viszeralen Fettgewebe. Das vermehrte Vorkommen von Makrophagen im Fettgewebe in Abhängigkeit von DPP-4 könnte einen Hinweis darauf sein, dass DPP-4 an inflammatorischen Signalwegen beteiligt ist (133).

In glatten Muskelzellen konnten Wronkowitz et al. bereits zeigen, dass konzentrationsabhängige DPP-4-Zugabe zu glatten Muskelzellen den Signalweg über ERK1/2 und NF- $\kappa$ B aktiviert. Dies setzt eine Kaskade inflammatorischer Reaktionen und die vermehrte Proliferation der glatten Muskelzellen in Gang. Das könnte im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen als Vorläufer der Atherosklerose gesehen werden und setzt DPP-4 folglich als möglichen *Link* zwischen Übergewicht und *CVD* ein (150). Für Adipozyten müsste ein ähnlicher Ansatz mit entsprechenden Versuchen noch folgen, um eine ähnlich inflammatorische Wirkung von DPP-4 im Fettgewebe zu bestätigen.

Um die mögliche Wirkungsweise von DPP-4 weiter zu verdeutlichen, sei hier noch eine weitere Studie angeführt. Conarello et al. haben in Versuchen mit DPP-4-defizienten Mäusen, sogenannten *Knock-out-Mäusen*, nachgewiesen, dass diese im Vergleich zum Wildtyp bei hochkalorischer Diät weder Übergewicht noch, als Vorstufe zum Diabetes, Hyperinsulinämie, entwickeln. Auch die GLP-1-Level waren im Blut der Knockout-Mäuse erhöht und ermöglichten so eine bessere Insulinsensitivität (151).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der DPP-4-Gehalt bei übergewichtigen und schlanken Probanden unterscheidet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb der Fettdepots der jeweils Schlanken bzw. Übergewichtigen unterschiedlich starke DPP-4-Expressionen herrschen. Auch konnte in dieser Arbeit die Hypothese unterstützt werden, dass DPP-4 in subkutanen Adipozyten geringer exprimiert wird als in viszeralen, und zwar bei

sämtlichen Subgruppen, gleich ob Nicht-Diabetiker oder Diabetiker, schlank oder übergewichtig – in allen Gruppen war die Expression von DPP-4 im subkutanen Fettgewebe stets niedriger als im viszeralen.

Diese Ergebnisse weisen zusammenfassend daraufhin, dass DPP-4 in Zukunft als Surrogatparameter für das metabolische Syndrom, kardiovaskuläre Krankheiten, Diabetes mellitus Typ 2 gelten könnte, da es signifikant mit anderen Markern für das metabolische Syndrom korreliert (BMI, Taillenumfang, Triglyceride) (141). Da dies auch für lösliches DPP-4 im Serum der Fall ist, könnte man so mit einem Screening bei Hochrisikogruppen wie Übergewichtigen mit einem hohen Anteil an viszeralem Fett bzw. androidem Verteilungsmuster Erkrankungen wie Diabetes oder Herzkrankheiten vor deren klinischem Eintreten erkennen. Auch frühzeitiges therapeutisches Eingreifen wäre so sicherlich mit der einfachen, kostengünstigen und schnellen Methode der Blutentnahme möglich. Da besonders übergewichtige Menschen mit einem erhöhten Anteil viszeralen Fetts von dieser Symptomatik zu betroffen sein scheinen, könnte es in Zukunft möglicherweise als sinnvoll erachtet werden, DPP-4-Inhibitoren bereits vor dem vollen Eintreten des Krankheitsbildes Diabetes mellitus / CVD als vorbeugende Therapiemaßnahme zu verschreiben. Um potentielle Einsichten zu gewinnen, ob ein T2D schneller entsteht, wenn erhöhte DPP-4-Sekretion bzw. –Expression herrschen, könnte man in zukünftigen Projekten, z. B. im Maus-Modell *in vivo* weiterforschen. Man könnte etwa eine Gruppe Mäuse mit einer *high-fat-diet* füttern, während eine Kontrollgruppe standardisiertes Mausfutter erhält. In Anlehnung an die Ergebnisse dieser Arbeit könnte die Gruppe der Mäuse, welche die *high fat diet* erhalten, durch gesteigerte DPP-4-Spiegel und –Expression gegebenenfalls schneller einen T2D entwickeln.

Da DPP-4-Inhibitoren in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden, wäre es interessant, in weiterführenden Experimenten den Einfluss von Größen wie unterschiedlichen Fettgeweben weiter zu erforschen. So könnten Forschungen *in vitro* im Zellmodell bzw. im Versuch mit Mäusen *in vivo* angestellt werden, ob und wie das DPP-4-Signalling im Fettgewebe sich möglicherweise von bereits erforschten DPP-4-Signalwegen in den glatten Muskelzellen unterscheidet (150). Dies würde einen differenzierteren Einblick auf die Wirkweise und mögliche Nebenwirkungen von bereits auf dem Markt zugelassenen Medikamenten geben. Außerdem könnte so die Chance geboten werden, potentiell neue Therapeutika mit weniger unerwünschten Arzneimittelwirkungen durch effizientere Wirkstoffe zu entwickeln, da die physiologische Wirkweise bekannt wäre und so gezielter *targets* angesteuert werden könnten.

#### **4.2.5 VEGF**

Für VEGF existieren zur Zeit dichotome Hypothesen (152). Die erste besagt, dass VEGF im Sinne eines proinflammatorischen Mediators die Proliferation von glatten Muskelzellen fördert und so die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen fördert. Die zweite Arbeitshypothese beruft sich auf Studien, die für VEGF einen durchaus protektiven Effekt aufzeigen konnten, da in diesen Arbeiten die Angiogenese durch VEGF gefördert wurde und so die Hypoxie und konsekutiv die Inflammation in den wachsenden Geweben reduziert bzw. verhindert werden konnte (152;153).

Die hier beschriebenen Verhaltensmuster von VEGF sind nicht im Reproduktionsprozesses des Fettgewebes entstanden und zeigen daher vermutlich Ergebnisse, die für die erstgenannte Hypothese sprechen, nämlich, dass dort hohe VEGF-Expressionsraten tendenziell proinflammatorisch wirken (152;153). Dies ist der Fall, da zum Einen die VEGF-Konzentrationen im bereits expandierten Fettgewebe der übergewichtigen Probanden signifikant höher sind als bei den schlanken Probanden, unabhängig ob bei Diabetikern oder Nichtdiabetikern. Dabei lässt sich vor allem verzeichnen, dass die Expression von VEGF im VAT höher ist als im SAT, was wiederum mit einem höheren Status der Inflammation in Verbindung und konsekutiv Folgeerkrankungen wie Diabetes oder CVD gebracht wird(154). Dies könnte durch proinflammatorische Adipokine zustande kommen, welche die Sekretion von VEGF induzieren und so die Komplikationen des metabolischen Syndroms fördern. Dies konnte in dieser Arbeit durch verschiedene konditionierte Medien unterschiedlicher Fettgewebsarten imitiert werden. (120). Dazu gehört auch die Induktion der Proliferation von glatten Muskelzellen, die durch VEGF und seine Rezeptoren offensichtlich stimuliert werden, zu proliferieren und so wesentlich dazu beitragen, die Arterienwand zu verdicken. Als Resultat erschwert dies die Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase. Dies führt zu Stase des Blutes, was wiederum prothrombogene Ereignisse fördert, wie etwa Thrombozytenadhäsion, Plaquebildung, Atherosklerose.

Die hiesigen Ergebnisse stützen die These, dass in Zusammenhang mit der Konzentrationsmenge an VEGF auch die proliferative Wirkung der konditionierten Medien des betreffenden Gewebes steigt. Da die Konzentration vor allem in den viszeralen Fettdepots der übergewichtigen Probanden signifikant erhöht war, zeigt sich auch die Proliferation hier erhöht. Dies spricht wiederum für die Eigenschaft des viszeralen Fettgewebes als endokrines Gewebe, welches aktiv an der Entstehung von metabolischen Komplikationen beteiligt ist, da es in hohem Maße proinflammatorische Substanzen wie etwa VEGF sezerniert (141;155).

Damit kann weiter die These untermauert werden, dass VEGF eine wichtige Substanz für die Proliferation im viszeralen Fettgewebe ist und so sicherlich ein bedeutendes Verbindungsglied

zwischen Fettgewebe und der Entwicklung von Krankheiten, die mit Übergewicht assoziiert sind. Dafür spricht auch, dass gezeigt werden konnte, dass proinflammatorische Substanzen, zum Beispiel IL-1 $\beta$  und IL-6 die VEGF-Sekretion fördern (156).

## **5 Schlussfolgerung**

Es ist unumstritten, dass kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Folgeerkrankungen eine der Haupttodesursachen weltweit sind. In der Pathogenese dieser Erkrankungen spielt auch die sogenannte niedriggradige chronische Inflammation eine Rolle, welche die Plaquebildung bei Atherosklerose teilweise zu bedingen scheint. Dabei ist die Pathogenese dieser Inflammationsform noch immer nicht vollständig erforscht, jedoch konnten viele Hinweise gefunden werden, dass dies unter anderem durch Substanzen unterhalten wird, welche von den verschiedenen Fettgewebsdepots des menschlichen Körpers sezerniert werden, den Adipokinen. Untersuchungen lassen vermuten, dass es ähnlich wie bei Zytokinen, pro- und antiinflammatorische Adipokine gibt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dabei die Vermutung nahe, dass in Abhängigkeit der Lokalisation des Fettdepots (subkutan/viszeral), als auch in Abhängigkeit vom BMI, DPP-4 als hier untersuchtes Adipokin in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert bzw. sezerniert wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das menschliche Fettgewebe als sehr vielseitiges endokrines Organ gewertet werden kann, welches diverse Adipokine sezerniert, die nachfolgend als Mediatoren in der Entwicklung kardiovaskulärer Pathologien agieren. Dies konnte etwa durch die Proliferationsassays mit den verschiedenen konditionierten Medien der Fettgewebsexplantate gezeigt werden: Unabhängig ob Diabetiker oder nicht, in Abhängigkeit vom erhöhten BMI ließ sich auch erhöhte VEGF-Freisetzung vornehmlich aus dem viszeralen Fettgewebe nachweisen, mit konsekutiv vermehrter Proliferation der glatten Muskelzellen. Als neues Adipokin wurde DPP4 untersucht und festgestellt, dass die DPP-4-Expression im viszeralen Fettgewebe stets erhöht ist, vor allem bei den adipösen Probanden und hier bei den adipösen Diabetikern, was als proinflammatorische Wirkung dieses Adipokins ausgelegt werden könnte. Bezüglich der hier dargestellten Ergebnisse von DPP-4 kann man schlussfolgern, dass das menschliche Fettgewebe, abhängig vom BMI DPP-4 sezerniert, welche die niedriggradige, chronische Inflammation des Körpers unterhalten und somit einen wesentlichen Teil zur Entstehung und Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen könnten. Die weitere Erforschung der Interaktion mit anderen pro- und antiinflammatorischen Adipokinen untereinander und mit diversen anderen *targets* muss weiter untersucht werden, auch in Zusammenhang mit Übergewicht und Lokalisation der jeweiligen Fettgewebsdepots. Dies könnte weitere wichtige Erkenntnisse in der Pathogenese und konsekutiv zur Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen geben.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Iwahashi,H, Itoh,N, Yamagata,K, Imagawa,A, Nakajima,H, Tomita,K, Moriwaki,M, Waguri,M, Yamamoto,K, Miyagawa,J, Namba,M, Hanafusa,T, Matsuzawa,Y: Molecular mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in autoimmune diabetes: potential targets for preventive therapy. *Cytokines Cell Mol Ther* 4:45-51, 1998
2. Zimmet,P, Alberti,KG, Shaw,J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787, 2001
3. Zimmet,PZ: Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. *Diabetologia* 42:499-518, 1999
4. Tuei,VC, Maiyoh,GK, Ha,CE: Type 2 diabetes mellitus and obesity in sub-Saharan Africa. *Diabetes Metab Res Rev* 26:433-445, 2010
5. Grundy,SM, Cleeman,JI, Daniels,SR, Donato,KA, Eckel,RH, Franklin,BA, Gordon,DJ, Krauss,RM, Savage,PJ, Smith,SC, Jr., Spertus,JA, Costa,F: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735-2752, 2005
6. van Genugten,RE, Serne,EH, Heymans,MW, van Raalte,DH, Diamant,M: Postprandial microvascular function deteriorates in parallel with gradual

- worsening of insulin sensitivity and glucose tolerance in men with the metabolic syndrome or type 2 diabetes. *Diabetologia* 56:583-587, 2013
7. Boren,J, Taskinen,MR, Olofsson,SO, Levin,M: Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med* 274:25-40, 2013
  8. Schaffer,JE: Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14:281-287, 2003
  9. Oliver,E, McGillicuddy,F, Phillips,C, Toomey,S, Roche,HM: The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *Proc Nutr Soc* 69:232-243, 2010
  10. Reaven,GM: Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 75:473-486, 1995
  11. Colditz,GA, Willett,WC, Rotnitzky,A, Manson,JE: Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122:481-486, 1995
  12. Perseghin,G, Ghosh,S, Gerow,K, Shulman,GI: Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes* 46:1001-1009, 1997

13. RANDLE,PJ, GARLAND,PB, HALES,CN, NEWSHOLME,EA: The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789, 1963
14. Roden,M, Price,TB, Perseghin,G, Petersen,KF, Rothman,DL, Cline,GW, Shulman,GI: Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859-2865, 1996
15. Rothman,DL, Shulman,RG, Shulman,GI: <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89:1069-1075, 1992
16. Bonadonna,RC, Del,PS, Saccomani,MP, Bonora,E, Gulli,G, Ferrannini,E, Bier,D, Cobelli,C, DeFronzo,RA: Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 92:486-494, 1993
17. Rothman,DL, Magnusson,I, Cline,G, Gerard,D, Kahn,CR, Shulman,RG, Shulman,GI: Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:983-987, 1995
18. Jellinger,PS: Focus on incretin-based therapies: targeting the core defects of type 2 diabetes. *Postgrad Med* 123:53-65, 2011

19. Alberti,KG, Eckel,RH, Grundy,SM, Zimmet,PZ, Cleeman,JI, Donato,KA, Fruchart,JC, James,WP, Loria,CM, Smith,SC, Jr.: Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity.  
*Circulation* 120:1640-1645, 2009
20. Kaplan,NM: The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149:1514-1520, 1989
21. Reaven,GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.  
*Diabetes* 37:1595-1607, 1988
22. Balkau,B, Charles,MA: Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR).  
*Diabet Med* 16:442-443, 1999
23. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III).  
*JAMA* 285:2486-2497, 2001
24. World Health Organization, Dept.of Noncommunicable Disease Surveillance:  
*Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*

*report of a WHO consultation*. Geneva, World Health Organization, 1999

25. Gupta,A, Gupta,V: Metabolic syndrome: what are the risks for humans? *Biosci Trends* 4:204-212, 2010
26. Canello,R, Clement,K: Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG* 113:1141-1147, 2006
27. Gesta,S, Tseng,YH, Kahn,CR: Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131:242-256, 2007
28. National Heart LaBI, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (: *Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults the evidence report*. Bethesda, Md., National Heart, Lung, and Blood Institute in cooperation with the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 1998
29. Health C: *Canadian guidelines for body weight classification in adults*. Ottawa, Health Canada, 2003
30. Khan,NA, McAlister,FA, Rabkin,SW, Padwal,R, Feldman,RD, Campbell,NR, Leiter,LA, Lewanczuk,RZ, Schiffrin,EL, Hill,MD, Arnold,M, Moe,G, Campbell,TS, Herbert,C, Milot,A, Stone,JA, Burgess,E, Hemmelgarn,B, Jones,C, Larochelle,P, Ogilvie,RI, Houlden,R, Herman,RJ, Hamet,P, Fodor,G,

Carruthers,G, Culleton,B, DeChamplain,J, Pylypchuk,G, Logan,AG, Gledhill,N, Petrella,R, Tobe,S, Touyz,RM: The 2006 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: Part II - Therapy. *Can J Cardiol* 22:583-593, 2006

31. Graham,I, Atar,D, Borch-Johnsen,K, Boysen,G, Burell,G, Cifkova,R, Dallongeville,J, De,BG, Ebrahim,S, Gjelsvik,B, Herrmann-Lingen,C, Hoes,A, Humphries,S, Knapton,M, Perk,J, Priori,SG, Pyorala,K, Reiner,Z, Ruilope,L, Sans-Menendez,S, Op Reimer,WS, Weissberg,P, Wood,D, Yarnell,J, Zamorano,JL: European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Atherosclerosis* 194:1-45, 2007

32. Zhou,BF: Predictive values of body mass index and waist circumference for risk factors of certain related diseases in Chinese adults--study on optimal cut-off points of body mass index and waist circumference in Chinese adults. *Biomed Environ Sci* 15:83-96, 2002

33. Oka,R, Kobayashi,J, Yagi,K, Tanii,H, Miyamoto,S, Asano,A, Hagishita,T, Mori,M, Moriuchi,T, Kobayashi,M, Katsuda,S, Kawashiri,MA, Nohara,A, Takeda,Y, Mabuchi,H, Yamagishi,M: Reassessment of the cutoff values of waist circumference and visceral fat area for identifying Japanese subjects at risk for the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 79:474-481, 2008

34. Florez,H, Silva,E, Fernandez,V, Ryder,E, Sulbaran,T, Campos,G, Calmon,G, Clavel,E, Castillo-Florez,S, Goldberg,R: Prevalence and risk factors associated with the metabolic syndrome and dyslipidemia in White, Black, Amerindian and

Mixed Hispanics in Zulia State, Venezuela. *Diabetes Res Clin Pract* 69:63-77,

2005

35. Marquezine,GF, Oliveira,CM, Pereira,AC, Krieger,JE, Mill,JG: Metabolic syndrome determinants in an urban population from Brazil: social class and gender-specific interaction. *Int J Cardiol* 129:259-265, 2008
36. Grundy,SM, Cleeman,JI, Daniels,SR, Donato,KA, Eckel,RH, Franklin,BA, Gordon,DJ, Krauss,RM, Savage,PJ, Smith,SC, Jr., Spertus,JA, Costa,F: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735-2752, 2005
37. Perseghin,G, Ghosh,S, Gerow,K, Shulman,GI: Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes* 46:1001-1009, 1997
38. Hotamisligil,GS, Shargill,NS, Spiegelman,BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
39. Lago,F, Dieguez,C, Gomez-Reino,J, Gualillo,O: Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3:716-724, 2007

40. Lago,F, Gomez,R, Gomez-Reino,JJ, Dieguez,C, Gualillo,O: Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 34:500-510, 2009
41. Wozniak,SE, Gee,LL, Wachtel,MS, Frezza,EE: Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54:1847-1856, 2009
42. Trayhurn,P, Beattie,JH: Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329-339, 2001
43. Gualillo,O, Gonzalez-Juanatey,JR, Lago,F: The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med* 17:275-283, 2007
44. Packard,RR, Libby,P: Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54:24-38, 2008
45. Rocha,VZ, Libby,P: Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 6:399-409, 2009
46. Juge-Aubry,CE, Somm,E, Pernin,A, Alizadeh,N, Giusti,V, Dayer,JM, Meier,CA: Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine* 29:270-274, 2005
47. Balistreri,CR, Caruso,C, Candore,G: The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010:802078, 2010

48. Fantuzzi,G: Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol* 121:326-330, 2008
49. Subramanian,V, Ferrante,AW, Jr.: Obesity, inflammation, and macrophages. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 63:151-159, 2009
50. Zeyda,M, Farmer,D, Todoric,J, Aszmann,O, Speiser,M, Gyori,G, Zlabinger,GJ, Stulnig,TM: Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)* 31:1420-1428, 2007
51. Zeyda,M, Stulnig,TM: Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 112:61-67, 2007
52. Sell,H, Eckel,J: Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:366-370, 2010
53. Lafontan,M, Berlan,M: Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24:276-283, 2003
54. Gesta,S, Bluher,M, Yamamoto,Y, Norris,AW, Berndt,J, Kralisch,S, Boucher,J, Lewis,C, Kahn,CR: Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6676-6681, 2006

55. Vohl,MC, Sladek,R, Robitaille,J, Gurd,S, Marceau,P, Richard,D, Hudson,TJ, Tchernof,A: A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12:1217-1222, 2004
56. Vidal,H: Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissues. *Ann Med* 33:547-555, 2001
57. Karalis,KP, Giannogonas,P, Kodela,E, Koutmani,Y, Zoumakis,M, Teli,T: Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J* 276:5747-5754, 2009
58. Chudek,J, Wiecek,A: Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep* 58 Suppl:81-88, 2006
59. Purnell,JQ, Kahn,SE, Samuels,MH, Brandon,D, Loriaux,DL, Brunzell,JD: Enhanced cortisol production rates, free cortisol, and 11beta-HSD-1 expression correlate with visceral fat and insulin resistance in men: effect of weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E351-E357, 2009
60. Gordon,S: Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest* 117:89-93, 2007
61. Lumeng,CN, DelProposto,JB, Westcott,DJ, Saltiel,AR: Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 57:3239-3246, 2008

62. Bourlier,V, Zakaroff-Girard,A, Miranville,A, De,BS, Maumus,M, Sengenés,C, Galitzky,J, Lafontan,M, Karpe,F, Frayn,KN, Bouloumie,A: Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117:806-815, 2008
63. Canello,R, Tordjman,J, Poitou,C, Guilhem,G, Bouillot,JL, Hugol,D, Coussieu,C, Basdevant,A, Bar,HA, Bedossa,P, Guerre-Millo,M, Clement,K: Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55:1554-1561, 2006
64. Harman-Boehm,I, Bluher,M, Redel,H, Sion-Vardy,N, Ovadia,S, Avinoach,E, Shai,I, Kloting,N, Stumvoll,M, Bashan,N, Rudich,A: Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2240-2247, 2007
65. Sengenés,C, Miranville,A, Lolmede,K, Curat,CA, Bouloumie,A: The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med* 262:415-421, 2007
66. Weisberg,SP, McCann,D, Desai,M, Rosenbaum,M, Leibel,RL, Ferrante,AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003
67. Cinti,S, Mitchell,G, Barbatelli,G, Murano,I, Ceresi,E, Faloia,E, Wang,S, Fortier,M, Greenberg,AS, Obin,MS: Adipocyte death defines macrophage

localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347-2355, 2005

68. Huber,J, Kiefer,FW, Zeyda,M, Ludvik,B, Silberhumer,GR, Prager,G, Zlabinger,GJ, Stulnig,TM: CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3215-3221, 2008
69. Faust,IM, Johnson,PR, Stern,JS, Hirsch,J: Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol* 235:E279-E286, 1978
70. Henegar,C, Tordjman,J, Achard,V, Lacasa,D, Cremer,I, Guerre-Millo,M, Poitou,C, Basdevant,A, Stich,V, Viguierie,N, Langin,D, Bedossa,P, Zucker,JD, Clement,K: Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 9:R14, 2008
71. Jernas,M, Palming,J, Sjöholm,K, Jennische,E, Svensson,PA, Gabrielsson,BG, Levin,M, Sjögren,A, Rudemo,M, Lystig,TC, Carlsson,B, Carlsson,LM, Lonn,M: Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J* 20:1540-1542, 2006
72. Maury,E, Ehala-Aleksejev,K, Guiot,Y, Detry,R, Vandenhooft,A, Brichard,SM: Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E656-E665, 2007

73. Skurk,T, Alberti-Huber,C, Herder,C, Hauner,H: Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023-1033, 2007
74. Spalding,KL, Arner,E, Westermark,PO, Bernard,S, Buchholz,BA, Bergmann,O, Blomqvist,L, Hoffstedt,J, Naslund,E, Britton,T, Concha,H, Hassan,M, Ryden,M, Frisen,J, Arner,P: Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787, 2008
75. Trayhurn,P, Wang,B, Wood,IS: Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 100:227-235, 2008
76. Wang,B, Wood,IS, Trayhurn,P: Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch* 455:479-492, 2007
77. Ye,J: Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 33:54-66, 2009
78. Cnop,M: Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36:348-352, 2008
79. Ghanim,H, Mohanty,P, Deopurkar,R, Sia,CL, Korzeniewski,K, Abuaysheh,S, Chaudhuri,A, Dandona,P: Acute modulation of toll-like receptors by insulin. *Diabetes Care* 31:1827-1831, 2008

80. Vitseva, OI, Tanriverdi, K, Tchkonja, TT, Kirkland, JL, McDonnell, ME, Apovian, CM, Freedman, J, Gokce, N: Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 16:932-937, 2008
81. Cani, PD, Bibiloni, R, Knauf, C, Waget, A, Neyrinck, AM, Delzenne, NM, Burcelin, R: Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57:1470-1481, 2008
82. Leuwer, M, Welters, I, Marx, G, Rushton, A, Bao, H, Hunter, L, Trayhurn, P: Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice. *Pflugers Arch* 457:731-741, 2009
83. Lamers, D, Schlich, R, Greulich, S, Sasson, S, Sell, H, Eckel, J: Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 15:1177-1188, 2011
84. Ntaios, G, Gatselis, NK, Makaritsis, K, Dalekos, GN: Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 227:216-221, 2013
85. Pischon, T, Girman, CJ, Hotamisligil, GS, Rifai, N, Hu, FB, Rimm, EB: Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 291:1730-1737, 2004

86. Lamers,D, Famulla,S, Wronkowitz,N, Hartwig,S, Lehr,S, Ouwens,DM, Eckardt,K, Kaufman,JM, Ryden,M, Muller,S, Hanisch,FG, Ruige,J, Arner,P, Sell,H, Eckel,J: Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 60:1917-1925, 2011
87. Yazbeck,R, Howarth,GS, Abbott,CA: Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci* 30:600-607, 2009
88. Demuth,HU, McIntosh,CH, Pederson,RA: Type 2 diabetes--therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1751:33-44, 2005
89. Verspohl,EJ: Novel therapeutics for type 2 diabetes: incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacol Ther* 124:113-138, 2009
90. Horie,Y, Kanada,S, Watada,H, Sarashina,A, Taniguchi,A, Hayashi,N, Graefe-Mody,EU, Woerle,HJ, Dugi,KA: Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and tolerability profiles of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin: a 4-week multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIa study in Japanese type 2 diabetes patients. *Clin Ther* 33:973-989, 2011
91. Boland,CL, Degeeter,M, Nuzum,DS, Tzefos,M: Evaluating second-line treatment options for type 2 diabetes: focus on secondary effects of GLP-1 agonists and DPP-4 inhibitors. *Ann Pharmacother* 47:490-505, 2013

92. Yazbeck,R, Howarth,GS, Abbott,CA: Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci* 30:600-607, 2009
93. Pitman,MR, Sulda,ML, Kuss,B, Abbott,CA: Dipeptidyl peptidase 8 and 9-- guilty by association? *Front Biosci* 14:3619-3633, 2009
94. Gorrell,MD: Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)* 108:277-292, 2005
95. Bauvois,B, De,M, I, Dumont,J, Rouillard,D, Zhao,HX, Bosmans,E: Constitutive expression of CD26/dipeptidylpeptidase IV on peripheral blood B lymphocytes of patients with B chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 79:1042-1048, 1999
96. Abbott,CA, Yu,DM, Woollatt,E, Sutherland,GR, McCaughan,GW, Gorrell,MD: Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem* 267:6140-6150, 2000
97. Muscelli,E, Mari,A, Casolaro,A, Camastra,S, Seghieri,G, Gastaldelli,A, Holst,JJ, Ferrannini,E: Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57:1340-1348, 2008

98. Kieffer,TJ, McIntosh,CH, Pederson,RA: Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136:3585-3596, 1995
99. Campbell,RK: Clarifying the role of incretin-based therapies in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 33:511-527, 2011
100. Drucker,DJ, Nauck,MA: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705, 2006
101. Vilsboll,T, Holst,JJ: Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47:357-366, 2004
102. Toft-Nielsen,MB, Madsbad,S, Holst,JJ: Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3853-3860, 2001
103. Toft-Nielsen,MB, Damholt,MB, Madsbad,S, Hilsted,LM, Hughes,TE, Michelsen,BK, Holst,JJ: Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3717-3723, 2001
104. Hildebrandt,M, Rose,M, Monnikes,H, Reutter,W, Keller,W, Klapp,BF: Eating disorders: a role for dipeptidyl peptidase IV in nutritional control. *Nutrition* 17:451-454, 2001

105. Reinhold,D, Goihl,A, Wrenger,S, Reinhold,A, Kuhlmann,UC, Faust,J, Neubert,K, Thielitz,A, Brocke,S, Tager,M, Ansorge,S, Bank,U: Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice. *Clin Chem Lab Med* 47:268-274, 2009
106. Baumgartner,I, Isner,JM: Somatic gene therapy in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 63:427-450, 2001
107. Flamme,I, Risau,W: Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 116:435-439, 1992
108. Risau,W, Sariola,H, Zerwes,HG, Sasse,J, Eklom,P, Kemler,R, Doetschman,T: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102:471-478, 1988
109. Fong,GH, Rossant,J, Gertsenstein,M, Breitman,ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70, 1995
110. Shalaby,F, Rossant,J, Yamaguchi,TP, Gertsenstein,M, Wu,XF, Breitman,ML, Schuh,AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62-66, 1995
111. Carmeliet,P, Ng,YS, Nuyens,D, Theilmeier,G, Brusselmans,K, Cornelissen,I, Ehler,E, Kakkar,VV, Stalmans,I, Mattot,V, Perriard,JC, Dewerchin,M,

- Flameng,W, Nagy,A, Lupu,F, Moons,L, Collen,D, D'Amore,PA, Shima,DT:  
Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice  
lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and  
VEGF188. *Nat Med* 5:495-502, 1999
112. Aiello,LP, Avery,RL, Arrigg,PG, Keyt,BA, Jampel,HD, Shah,ST, Pasquale,LR,  
Thieme,H, Iwamoto,MA, Park,JE, .: Vascular endothelial growth factor in  
ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N*  
*Engl J Med* 331:1480-1487, 1994
113. Banai,S, Shweiki,D, Pinson,A, Chandra,M, Lazarovici,G, Keshet,E:  
Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by  
myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*  
28:1176-1179, 1994
114. Isner,JM: The role of angiogenic cytokines in cardiovascular disease. *Clin*  
*Immunol Immunopathol* 80:S82-S91, 1996
115. Isner,JM, Asahara,T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies  
for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103:1231-1236, 1999
116. Celletti,FL, Waugh,JM, Amabile,PG, Brendolan,A, Hilfiker,PR, Dake,MD:  
Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression.  
*Nat Med* 7:425-429, 2001

117. Grosskreutz,CL, Anand-Apte,B, Duplaa,C, Quinn,TP, Terman,BI, Zetter,B, D'Amore,PA: Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* 58:128-136, 1999
118. Ishida,A, Murray,J, Saito,Y, Kanthou,C, Benzakour,O, Shibuya,M, Wijelath,ES: Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 188:359-368, 2001
119. Iacobellis,G, Sharma,AM: Epicardial adipose tissue as new cardio-metabolic risk marker and potential therapeutic target in the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des* 13:2180-2184, 2007
120. Schlich,R, Willems,M, Greulich,S, Ruppe,F, Knoefel,WT, Ouwens,DM, Maxhera,B, Lichtenberg,A, Eckel,J, Sell,H: VEGF in the Crosstalk between Human Adipocytes and Smooth Muscle Cells: Depot-Specific Release from Visceral and Perivascular Adipose Tissue. *Mediators Inflamm* 2013:982458, 2013
121. Lehr,S, Hartwig,S, Sell,H: Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* 6:91-101, 2012
122. Cordero,OJ, Salgado,FJ, Nogueira,M: On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 58:1723-1747, 2009

123. Lambeir,AM, Durinx,C, Scharpe,S, De,M, I: Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40:209-294, 2003
124. Mulvihill,EE, Drucker,DJ: Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr Rev* 35:992-1019, 2014
125. Rohrborn,D, Wronkowitz,N, Eckel,J: DPP4 in Diabetes. *Front Immunol* 6:386, 2015
126. Cinti,S, Mitchell,G, Barbatelli,G, Murano,I, Ceresi,E, Faloia,E, Wang,S, Fortier,M, Greenberg,AS, Obin,MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347-2355, 2005
127. Kershaw,EE, Flier,JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556, 2004
128. Ouwens,DM, Sell,H, Greulich,S, Eckel,J: The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 14:2223-2234, 2010
129. Scherer,PE: Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55:1537-1545, 2006

130. Sell,H, Dietze-Schroeder,D, Eckel,J: The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 17:416-422, 2006
131. Waki,H, Tontonoz,P: Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2:31-56, 2007
132. Lehr,S, Hartwig,S, Lamers,D, Famulla,S, Muller,S, Hanisch,FG, Cuvelier,C, Ruige,J, Eckardt,K, Ouwens,DM, Sell,H, Eckel,J: Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 11:M111, 2012
133. Sell,H, Bluher,M, Kloting,N, Schlich,R, Willems,M, Ruppe,F, Knoefel,WT, Dietrich,A, Fielding,BA, Arner,P, Frayn,KN, Eckel,J: Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care* 36:4083-4090, 2013
134. Item,F, Konrad,D: Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. *Obes Rev* 13 Suppl 2:30-39, 2012
135. Arrigo,AP, Viot,S, Chaufour,S, Firdaus,W, Kretz-Remy,C, Diaz-Latoud,C: Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* 7:414-422, 2005

136. Balistreri,CR, Caruso,C, Candore,G: The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010:802078, 2010
137. Balkau,B, Charles,MA: Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR).  
*Diabet Med* 16:442-443, 1999
138. Bergman,RN, Kim,SP, Catalano,KJ, Hsu,IR, Chiu,JD, Kabir,M, Hucking,K, Ader,M: Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome.  
*Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1:16S-19S, 2006
139. Weisberg,SP, McCann,D, Desai,M, Rosenbaum,M, Leibel,RL, Ferrante,AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003
140. Xu,H, Barnes,GT, Yang,Q, Tan,G, Yang,D, Chou,CJ, Sole,J, Nichols,A, Ross,JS, Tartaglia,LA, Chen,H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830, 2003
141. Lamers,D, Famulla,S, Wronkowitz,N, Hartwig,S, Lehr,S, Ouwens,DM, Eckardt,K, Kaufman,JM, Ryden,M, Muller,S, Hanisch,FG, Ruige,J, Arner,P, Sell,H, Eckel,J: Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 60:1917-1925, 2011

142. Bluher,M: The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. *Curr Opin Lipidol* 21:38-43, 2010
143. Arner,P: The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 14:137-145, 2003
144. Omar,BA, Vikman,J, Winzell,MS, Voss,U, Ekblad,E, Foley,JE, Ahren,B: Enhanced beta cell function and anti-inflammatory effect after chronic treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in an advanced-aged diet-induced obesity mouse model. *Diabetologia* 56:1752-1760, 2013
145. Drucker,DJ, Nauck,MA: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705, 2006
146. Ahren,B: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications. *Diabetes Care* 30:1344-1350, 2007
147. Wellen,KE, Hotamisligil,GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119, 2005
148. Famulla,S, Schlich,R, Sell,H, Eckel,J: Differentiation of human adipocytes at physiological oxygen levels results in increased adiponectin secretion and isoproterenol-stimulated lipolysis. *Adipocyte* 1:132-181, 2012

149. Taube,A, Schlich,R, Sell,H, Eckardt,K, Eckel,J: Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H2148-H2165, 2012
150. Wronkowitz,N, Gorgens,SW, Romacho,T, Villalobos,LA, Sanchez-Ferrer,CF, Peiro,C, Sell,H, Eckel,J: Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor 2. *Biochim Biophys Acta* 1842:1613-1621, 2014
151. Conarello,SL, Li,Z, Ronan,J, Roy,RS, Zhu,L, Jiang,G, Liu,F, Woods,J, Zycband,E, Moller,DE, Thornberry,NA, Zhang,BB: Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6825-6830, 2003
152. Sun,K, Wernstedt,A, I, Kusminski,CM, Bueno,AC, Wang,ZV, Pollard,JW, Brekken,RA, Scherer,PE: Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5874-5879, 2012
153. Elias,I, Franckhauser,S, Ferre,T, Vila,L, Tafuro,S, Munoz,S, Roca,C, Ramos,D, Pujol,A, Riu,E, Ruberte,J, Bosch,F: Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 61:1801-1813, 2012
154. Ledoux,S, Queguiner,I, Msika,S, Calderari,S, Rufat,P, Gasc,JM, Corvol,P, Larger,E: Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* 57:3247-3257, 2008

155. Sell,H, Dietze-Schroeder,D, Eckardt,K, Eckel,J: Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone.

*Biochem Biophys Res Commun* 343:700-706, 2006

156. Rega,G, Kaun,C, Demyanets,S, Pfaffenberger,S, Rychli,K, Hohensinner,PJ, Kastl,SP, Speidl,WS, Weiss,TW, Breuss,JM, Furnkranz,A, Uhrin,P, Zaujec,J, Zilberfarb,V, Frey,M, Roehle,R, Maurer,G, Huber,K, Wojta,J: Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue

in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1587-1595, 2007

<sup>1</sup> Kerner W, Brückel J, Böhm BO. **Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus.** Oktober 2004. Scherbaum WA, Kiess W (Hrsg.): Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). [http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL\\_Klassifikation\\_Update\\_2004.pdf](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Eckel und Prof. Dr. med. W. T. Knoefel für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der Möglichkeit im DDZ und der viszeralkirurgischen Abteilung der HHU Düsseldorf arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Eckel und Frau Dr. rer. nat. Sell möchte ich ausdrücklich danken für ihre Geduld und Ausdauer, sowie die jahrelange Möglichkeit, auch kurzfristig und über eMail, aber immer auch persönlich, mir mit Hilfestellungen und Unterstützung beiseite gestanden zu haben.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Raphaela Schlich bedanken, die mich in die Labortätigkeiten eingewiesen und mir mit Rat und Tat stets beiseite gestanden hat, egal in welchem Anliegen und über Jahre hinweg. Dankeschön.

Frau Prof. Dr. med. M. Grandoch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. med. Florian Ruppe möchte ich danken, da er derjenige war, der mir den Zugang zu dieser Arbeit ermöglicht und mir die Einarbeitung in der Klinik sehr erleichtert hat.

Natürlich danke ich auch allen Mitarbeitern des DDZ, mit denen ich intensiv in dem halben Jahr von Oktober 2010 bis März 2011 und immer wieder auch danach zusammenarbeiten durfte: Annika, Susanne, Silja, Nina, Sven, Sabrina, Claudia, Marcel, Sven, Manuela, Angelika, Andrea, den Birgits und Danielas, Kristin... es war immer eine angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre mit euch, herzlichen Dank. Ebenso möchte ich mich beim OP-Personal der Uniklinik Düsseldorf bedanken, die während Operationen daran erinnert haben, dass da noch jemand auf seine Proben wartet und bei den Operateuren, für ihre Bereitschaft, mir bei der Probengewinnung zu helfen.

Ich danke meinem Mann, der mit stoischer Zuversicht das erfolgreiche Ende dieser Arbeit prophezeit hat und trotz aller Widrigkeiten nicht von dieser Vorhersage abgewichen ist. Danke für deine Unterstützung!

Danken möchte ich auch meinem Vater, der mich dazu ermutigt und es mir ohne Zögern ermöglicht hat, ein Freimester für das Durchführen der experimentellen Arbeit zu nehmen. Im Gesamten möchte ich mich meiner Familie in Trier danken, dass sie unablässiges Interesse an meiner Arbeit gezeigt und mich so weiter angetrieben haben.

Meiner Schwester möchte ich im Besonderen danken, da sie nicht müde wurde und wird, mich immer wieder auf's Neue zu motivieren und mir zu helfen.

Danke an meine „Schwiegerfamilie“, die mich nicht erst seit der Hochzeit tatkräftig bei allem unterstützt hat.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, mir aber trotzdem mit welchen noch so kleinen Taten, Gesten oder anderswie geholfen haben.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

10.07.2018, Miriam Kraus

---