

Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Michael Roden

**Afamin, Insulinresistenz und Inflammation:
Daten aus in vitro Studien und der KORA F4 Studie**

Dissertation

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

vorgelegt von
Thomas Fischer

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. phil. nat. Christian Herder

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Meißner

Zusammenfassung

Afamin ist ein Glykoprotein, das überwiegend in der Leber gebildet wird. Eine Meta-Analyse aus acht epidemiologischen Studien zeigte, dass erhöhte Spiegel von Afamin mit einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes (T2D) einhergehen. Eine andere humane Studie wies nach, dass zirkulierendes Afamin in adipösen im Vergleich zu schlanken Personen erhöht vorliegt und positiv mit pro-inflammatorischen Proteinen assoziiert. Adipositas und daraus resultierende inflammatorische Veränderungen im Fettgewebe zählen zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des Typ-2-Diabetes. Daher war das Ziel dieser Arbeit, (i) metabolische und inflammatorische Faktoren zu identifizieren, die die Afamin-Expression in humanen Hepatozyten regulieren, (ii) die Untersuchung des Effekts von Afamin auf die Insulinsignalkaskade und die Inflammation in humanen Adipozyten und (iii) die Bestimmung der Assoziation von Serum-Afamin mit einer Vielzahl von inflammatorischen Markern in der populationsbasierten KORA F4-Studie.

Hepatozyten wurden für 24 Stunden mit pro-inflammatorischen (IL-1 β , IL-6 und TNF α) und metabolischen (Glukose und Insulin) Faktoren stimuliert. Afamin wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Reife Adipozyten wurden für 24 Stunden mit einer physiologischen Afaminkonzentration von 90 mg/l stimuliert. Anschließend wurde der Phosphorylierungsgrad von Schlüsselproteinen von inflammatorischen (ERK, p38, NF κ B) und metabolischen Signalwegen (Akt) mittels Western Blot bestimmt. Zusätzlich wurde die Konzentration von 92 inflammatorischen Biomarkern in den Überständen der Adipozyten gemessen. Im letzten Teil wurde die Assoziation von Afamin mit 92 inflammatorischen Biomarkern bestimmt, die im Serum von 1082 Teilnehmern der KORA F4-Studie gemessen wurden.

Die Expression von Afamin aus Hepatozyten zeigte sich vermindert nach Stimulation mit inflammatorischen Faktoren (IL-1 β : -52%, IL-6: -36% und TNF α : -44%) und Glukose (-7%) und vermehrt nach Stimulation mit supraphysiologischen Insulinkonzentrationen (+13%). Bei physiologischen Insulinkonzentrationen war kein signifikanter Effekt zu beobachten. Die Afaminstimulation von Adipozyten hatte, bei gleichzeitigem Insulinstimulus, eine verminderte Aktivierung der Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Threonin (-21,5%) als zentralem Mediator des Insulinsignalwegs zur Folge. Die Aktivierung von inflammatorischen Schlüsselproteinen bzw. Transkriptionsfaktoren zeigte keine signifikante Veränderung. In den Überständen der Adipozyten fand sich eine vermehrte Bildung von 25 inflammatorischen Biomarkern (u.a. MCP-4, VEGFA und IL-13) nach der Behandlung mit Afamin. In der KORA F4-Studie konnte eine positive Korrelation mit 7 (u.a. MCP-1, FGF-21 und GDNF) und eine negative Korrelation mit 19 Biomarkern (u.a. CSF-1, IL-6 und TGF α) beobachtet werden.

Diese Arbeit gibt Hinweise darauf, dass Afamin zu einer verminderten Insulinsensitivität und einer vermehrten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Proteinen aus Adipozyten führen könnte. In der Zirkulation ist Afamin sowohl mit pro- als auch mit anti-inflammatorischen Biomarkern assoziiert, so dass die Beziehung zwischen Afamin und Inflammation in weiteren Studien näher untersucht werden sollte.

Summary

Afamin is a glycoprotein that is predominantly produced in the liver. A meta-analysis of eight epidemiological studies showed that elevated afamin levels were associated with an increased risk of type 2 diabetes. Another human study has shown that circulating afamin was elevated in obese versus lean individuals and that afamin was positively associated with pro-inflammatory proteins. Obesity and resulting inflammatory changes in adipose tissue are among the most important risk factors for the development of type 2 diabetes. The aim of this work was (i) to identify metabolic and inflammatory factors that regulate afamin expression in human hepatocytes, (ii) to study the effect of afamin on the insulin signalling cascade and inflammation in human adipocytes, and (iii) to determine the association of serum afamin with a range of inflammatory markers in the population-based KORA F4 study.

Hepatocytes were stimulated for 24 hours with inflammatory (IL-1 β , IL-6 and TNF α) and metabolic (glucose and insulin) factors. Afamin was measured in the supernatant by ELISA. Mature adipocytes were stimulated for 24 hours with a physiological afamin concentration of 90 mg/l. Thereafter the degree of phosphorylation of key proteins of inflammatory (ERK, p38, NF κ B) and metabolic signalling pathways (Akt) was determined by Western blot. In addition, the concentration of 92 inflammatory biomarkers was determined in the supernatants. Finally, the association of afamin with 92 inflammatory biomarkers was determined, which were measured in the serum of 1082 participants in the KORA F4 study.

The expression of afamin from hepatocytes was reduced after stimulation with inflammatory factors (IL-1 β : -52%, IL-6: -36% and TNF α : -44%) and glucose (-7%) and increased after stimulation with supraphysiological insulin concentrations. At physiological insulin concentrations, no significant effect was observed. The stimulation of adipocytes with afamin, while a simultaneous insulin stimulus was applied, resulted in a reduced phosphorylation of Akt at the amino acid threonine (-21.5%) as the central mediator of the insulin signalling cascade. In the supernatants of the adipocytes there was an increased release of 25 inflammatory biomarkers (including MCP-4, VEGFA and IL-13) after treatment with afamin. In the KORA F4 study a positive correlation with 7 (including MCP-1, FGF-21 und GDNF) and a negative correlation with 19 inflammatory biomarkers (including CSF-1, IL-6 and TGF α) was observed.

This work indicates that afamin may lead to decreased insulin sensitivity and increased release of pro-inflammatory proteins from adipocytes. In the circulation, afamin is associated with both pro- and anti-inflammatory biomarkers, so the relationship between afamin and inflammation should be further investigated in further studies.

Abkürzungsverzeichnis

Akt:	Proteinkinase B
ANOVA:	Analysis of Variance
BMI:	Körpermasseindex
BSA:	bovines Serumalbumin
BSS:	balanced salt solution
CCVK:	Colorimetric Cell Viability Kit
CV:	Coefficient of Variation
CRP:	C-reaktives Protein
COPD:	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR:	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK:	Extrazellulärsignal regulierte Kinase
HbA1C:	Glykiertes Hämoglobin
HCC:	Hepatozelluläres Karzinom
HDL:	Lipoprotein hoher Dichte
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA:	human leukocyte antigen
HRP:	Meerrettichperoxidase
hsCRP:	hochsensitives C-reaktives Protein
IκB:	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IL:	Interleukin
KORA:	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
MAPK:	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MODY:	Maturity Onset Diabetes of the Young
MONICA:	Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease
NFκB:	nuklärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet
OGTT:	oraler Glukosetoleranztest
OR:	Odds Ratio
p38:	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen

pAktSer:	an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B
pAktThr:	an Threonin 308 phosphorylierte Proteinkinase B
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
RIPA:	Radioimmunpräzipitationsassay
SAPHIR:	Salzburg Atherosclerosis Prevention Program in subjects at High Individual Risk
T1D:	Typ 1 Diabetes Mellitus
T2D:	Typ 2 Diabetes Mellitus
TNF:	Tumornekrosefaktor
USD:	United States Dollar
Wes:	Simple Western
WHO:	World Health Organisation
WST:	water soluble tetrazolium

Einheiten:

°C:	Grad Celsius
cm:	Zentimeter
dl:	Deziliter
g:	Gramm
kDa:	Kilodalton
kg:	Kilogramm
l:	Liter
m²:	Quadratmeter
mg:	Milligramm
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
µmol:	Mikromol
min:	Minuten
ml:	Milliliter
mmHg:	Millimeter Quecksilbersäule
nm:	Nanometer
pg:	Pikogramm
s:	Sekunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes	1
1.1.1	Einteilung	1
1.1.1.1	Diabetes Mellitus Typ 1	2
1.1.1.2	Diabetes Mellitus Typ 2	2
1.1.1.3	Weitere Diabetestypen	3
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie	4
1.1.3	Klinik und Therapie	5
1.2	Inflammation	6
1.2.1	Allgemein	6
1.2.2	Subklinische Inflammation	7
1.2.2.1	Definition	7
1.2.2.2	Wichtige Marker und Mediatoren	8
1.2.3	Inflammation und Diabetes	10
1.3	Afamin	11
1.3.1	Allgemein	11
1.3.2	Afamin und metabolisches Syndrom	13
1.3.3	Afamin und Inflammation	14
1.4	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Zellkultur – HepaRG Zellen	16
2.1.1	Entnahme des Zellüberstandes	16
2.1.2	Zelltyp	16
2.1.3	Zellkulturmedien	16
2.1.4	Zellzahl und Zelldichte	17
2.1.5	Zellkultivierung	18
2.1.6	Zellkultur zur Identifizierung von metabolischen und inflammatorischen Faktoren, welche die Afamin-Expression beeinflussen	18
2.1.7	Zellkultur zur Identifizierung der Auswirkung verschiedener Insulinkonzentrationen auf die Afaminexpression	19
2.1.8	Bestimmung der Zytotoxizität der verwendeten Stimulantien auf HepaRG Zellen mittels Water-soluble tetrazolium salt-8 Tests (WST-8)	20
2.1.9	Afamin-Bestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
2.2	Zellkultur – Präadipozyten	23
2.2.1	Zelltyp	23
2.2.2	Zellkulturmedien	23
2.2.3	Zellzahl und Zelldichte	24
2.2.4	Zellkultivierung	25

2.2.5	Stimulation der Zellen mit Afamin und Insulin	26
2.2.6	Abernten der Zellen	27
2.2.7	OLINK Multiplex-Assay	28
2.2.8	Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels Bichinonsäure (BCA)-Test	28
2.2.9	Bestimmung der Aktivierung inflammatorischer und metabolischer Signalwege mittels Simple Western (Wes)	29
2.3	KORA – Studie	32
2.3.1	Studiendesign und Population	32
2.3.2	OLINK Inflammation Panel	34
2.3.3	Störfaktoren	35
2.3.3.1	Interview	35
2.3.3.2	Anthropometrische Variablen	36
2.3.3.3	OGTT	36
2.3.3.4	Labormessungen	36
2.4	Statistische Auswertungen	36
3	Ergebnisse	39
3.1	Einfluss von metabolischen und inflammatorischen Faktoren auf die Afaminsekretion	39
3.2	Einfluss von Afamin auf Inflammation und Metabolismus humaner Adipozyten	44
3.2.1	Einfluss von Afamin auf inflammatorische und metabolische Signalwege in humanen Adipozyten	45
3.2.2	Einfluss von Afamin auf die Expression inflammatorischer Proteine in humanen Adipozyten	49
3.3	Korrelationen von Afamin mit verschiedenen inflammatorischen Markern in der KORA F4 Studie	51
3.3.1	Beschreibung der Studienpopulation	51
3.3.2	Korrelation von Afamin mit Biomarkern der Inflammation	52
4	Diskussion	56
4.1	Regulation der Afaminsekretion	56
4.2	Auswirkungen von Afamin auf die Insulinresistenz	58
4.3	Proinflammatorische Eigenschaften von Afamin	60
4.4	Afamin und subklinische Inflammation in einer Querschnittsstudie	62
4.5	Zusammenfassung	65
4.6	Stärken und Schwächen der Arbeit	65
4.7	Ausblick	67

1 Einleitung

1.1 Diabetes

Die erste Überlieferung des Diabetes stammt von den alten Ägyptern um 1500 v.Chr., die einen seltenen Zustand beschrieben, bei dem Patienten massiv urinieren mussten und Gewicht verloren (Polonsky, 2012). Den Begriff Diabetes prägte über tausend Jahre später Demetrius von Apameia, ein Grieche, der im 2. oder 1. Jahrhundert v.Chr. lebte. Der Begriff Diabetes steht dabei für durchlässig, da seine Vorstellung war, dass die großen Urinmengen, die mit der Krankheit einher gingen, dadurch zustande kamen, dass vom Patienten getrunkenes Wasser wie durch eine Röhre floss und unverändert wieder ausgeschieden wurde (Eknoyan und Nagy, 2005). Nicht nur das Verständnis der Krankheit war lange Zeit nicht tiefgreifend, auch die Therapie bestand nur aus Ernährungsumstellung und körperlicher Aktivität, was zu keinem zufriedenstellenden Therapieergebnis führte. Dies änderte sich erst im 20. Jahrhundert mit der Entdeckung des Insulins (Lakhtakia, 2013). Aber auch damit und einer Vielzahl an weiteren, entwickelten therapeutischen Möglichkeiten kann keine von diesen die Krankheit heilen oder aber wenigstens deren Progression final stoppen (Welters et al., 2017). Um solche Therapien entwickeln zu können, benötigt es ein möglichst tiefgreifendes Verständnis der Krankheit. Deshalb ist Forschung an Ursachen, die an der Entstehung von Diabetes beteiligt sein könnten, nach wie vor höchst relevant.

1.1.1 Einteilung

Diabetes Mellitus ist definiert als eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die durch chronische Hyperglykämie gekennzeichnet ist. Diese entsteht als Folge von Störungen der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder als Kombination der beiden (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2013). Die Diagnose Diabetes kann dabei durch eine Messung der Plasma-Glukose gestellt werden, die bei für Diabetes positivem Ergebnis zur Bestätigung wiederholt werden sollte. Dazu kann entweder die Nüchtern-Plasmaglukose (>8 Stunden nüchtern) direkt gemessen werden, wobei ein Wert von größer oder gleich 126 mg/dl als pathologisch gilt, oder ein oraler Glukose Toleranztest wird durchgeführt. Bei diesem nimmt der Patient eine definierte Menge Glukose (75 g) zu sich und die

Plasmaglukose wird nach 2 Stunden bestimmt. Hat er bei dieser Messung einen Plasmaglukosewert von größer oder gleich 200 mg/dl, gilt der Test als positiv. Auch durch einen erhöhten Glykiertes Hämoglobin (HbA1C) von über 6,5% lässt sich die Diagnose Diabetes Mellitus stellen. HbA1C ist ein Laborwert, der auf die Langzeitbelastung mit Glukose schließen lässt (American Diabetes Association, 2018). Die Erkrankungsgruppe lässt sich wie folgt weiter einteilen:

1.1.1.1 Diabetes Mellitus Typ 1

Beim Diabetes Mellitus Typ 1 (synonym verwendet mit Typ 1 Diabetes, T1D) kommt es zur immunvermittelten Zerstörung von β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas und damit zum Erlöschen der Insulinsekretion, dem so genannten absoluten Insulinmangel (Guthrie und Guthrie, 2004). Meist lassen sich dabei im Sinne einer Autoimmunerkrankung spezifische Autoantikörper gegen Proteine der β -Zellen, wie Anti-Glutamatdekarboxylase- oder Anti-Thyrosinphosphatase-Antikörper, nachweisen. Zur Manifestation der Krankheit kommt es, wenn ca. 80% der β -Zellen untergegangen sind (Herold, 2015). Neben dem Nachweis von Autoantikörpern hat T1D eine genetische Komponente. Diese zeigt sich in einem gehäuften familiären Auftreten und einer gehäuften Präsenz spezifischer HLA-Merkmale (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2018). T1D manifestiert sich meist früh und zügig im Kindesalter oder der Jugend, seltener kommt es zum Erkrankungsbeginn erst im Erwachsenenalter. Ca. 5-10% der Menschen mit Diabetes fallen in die Kategorie T1D (American Diabetes Association, 2018).

1.1.1.2 Diabetes Mellitus Typ 2

Diabetes Mellitus Typ 2 (synonym verwendet mit Typ 2 Diabetes, T2D) bezeichnet eine Form des Diabetes, die durch Insulinresistenz in Verbindung mit Insulinmangel gekennzeichnet ist. T2D beruht dabei auf einer zum Teil genetisch bedingten, multifaktoriellen Ätiologie, die unter Risikofaktoren wie abdomineller Adipositas oder Bewegungsmangel zur Manifestation des Diabetes führt (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2013). Insulinresistenz bezeichnet einen Zustand, bei dem Insulin seine volle Wirkung nicht mehr entfalten kann. Dadurch wird weniger Glukose in peripheres Gewebe aufgenommen und vermehrt Glukose in der Leber gebildet, was zu Hyperglykämien führen

kann (Duque-Guimarães und Ozanne, 2013). Insulinresistenz ist dabei ein charakteristischer und pathophysiologischer Aspekt des T2D (Osborn und Olefsky, 2012). Bei der Entstehung des T2D kann die abgeschwächte Insulinwirkung zunächst durch eine vermehrte Insulinausschüttung aus den β -Zellen im Pankreas kompensiert werden. Wird dies nicht mehr kompensiert, spricht man von relativem Insulinmangel und der T2D manifestiert sich. Durch immer größere Belastung der β -Zellen kann es zum Zelluntergang kommen, was zu einer verminderten Insulinsekretion und damit zu einem absoluten Insulinmangel führen kann (Weir und Bonner-Weir, 2004). T2D manifestiert sich eher langsam und im fortgeschrittenen Erwachsenenalter. Über 90% der Diabetespatienten haben Typ 2 Diabetes (American Diabetes Association, 2018).

1.1.1.3 Weitere Diabetestypen

Neben T1D und T2D, die den Großteil der Patienten betreffen, gibt es noch weitere Formen von Diabetes Mellitus, von denen einige hier kurz erläutert werden.

Ein solcher Diabetestyp ist der Gestationsdiabetes. Dieser bezeichnet einen Diabetes, der während der Schwangerschaft auftritt und mit Risiken für Mutter und Kind einhergeht (Benhalima et al., 2015). Hierbei kommt es vor allem im zweiten und dritten Trimester der Schwangerschaft zu einer erhöhten Glukoseintoleranz, die zu Hyperglykämien führen kann. Dabei kann der Gestationsdiabetes nach der Schwangerschaft in einen T2D übergehen oder vorerst ausheilen, wobei ein erhöhtes T2D-Risiko bleibt (Chiefari et al., 2017).

Neben T1D und T2D, die einen polygenetischen Hintergrund haben, gibt es auch monogenetisch bedingte Formen des Diabetes, z.B. *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY). MODY beschreibt eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen es durch Mutationen in Genen der β -Zell Entwicklung, Funktion und Regulation, der Glukosewahrnehmung oder im Insulingen zu Diabetes kommen kann (Thomas und Philipson, 2015). MODY manifestiert sich klassischerweise im jungen Erwachsenenalter (Kleinberger und Pollin, 2015).

Diabetes kann auch als Begleiterscheinung verschiedener anderer Erkrankungen auftreten, z.B. bei Krankheiten, die zu einer Zerstörung des Pankreas und damit zu einer verminderten Insulinsekretion führen, wie der Mukoviszidose (Savant und McColley, 2017) oder der chronischen Pankreatitis (Kleeff et al., 2017).

Auf die in diesem Kapitel erwähnten und auch auf weitere Formen des Diabetes wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Diabetes ist eine der größten Herausforderungen des Gesundheitswesens überhaupt. Weltweit waren 2017 ca. 424,9 Millionen Menschen aus der Gruppe der 20 bis 79 Jährigen erkrankt, das entspricht einem Anteil von 8,8%. Die dadurch verursachten Kosten für das Gesundheitssystem werden auf 727 Milliarden USD geschätzt. Bis ins Jahr 2045 soll die Zahl der Erkrankten auf 628,6 Millionen Menschen steigen, was einem Anteil von 9,9% entspricht (International Diabetes Federation, 2017).

Auch in Deutschland ist die Erkrankung Diabetes sehr präsent. So wird davon ausgegangen, dass ca. 7-8% der erwachsenen Bevölkerung an Diabetes erkrankt sind. Die Prävalenz war dabei in den letzten Jahren steigend und wird auch weiterhin als steigend eingeschätzt. (Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe, 2018)

Die Ursachen für die Entstehung von Diabetes sind nicht abschließend geklärt, auch wenn sowohl T1D als auch T2D eine genetische Komponente aufweisen (American Diabetes Association, 2018). Es sind zwar viele Gene bekannt, die mit T1D assoziiert sind, aber dennoch entwickelt die Mehrheit der genetisch prädisponierten Menschen keinen Diabetes (You und Henneberg, 2016). Man vermutet, dass zur Manifestation von T1D Ernährung, insbesondere Vitamin D, und Umweltfaktoren, die aber weitgehend noch nicht identifiziert werden konnten, beitragen könnten (Maahs et al., 2010).

Auch für den T2D sind mittlerweile über 200 assoziierte Gene bekannt (Mahajan et al., 2018). Die wichtigsten Risikofaktoren zur Ausbildung von T2D sind Alter, Fettleibigkeit, Bewegungsmangel, sozioökonomischer Status und familiäre Prädisposition (Fletcher et al., 2002). Darüber hinaus gelten beispielsweise ein Gestationsdiabetes der Mutter, Rauchen und ungesunde Ernährung mit Aufnahme von vielen gesättigten Fettsäuren als weitere Risikofaktoren (World Health Organization, 2016). Auch der regelmäßige Konsum von mit Zucker gesüßten Getränken ist mit einem erhöhten Diabetesrisiko assoziiert (Imamura et al., 2016).

1.1.3 Klinik und Therapie

Gemeinsame Symptome von T1D und T2D sind unter anderem vermehrter Durst, trockener Mund, häufiges Wasserlassen, Müdigkeit, verlangsamte Wundheilung und häufig wiederkehrende Infektionen. Dabei treten die Symptome bei T1D eher akut auf, bei T2D entwickeln sich diese überwiegend langsam (International Diabetes Federation, 2017). Eine schwerwiegende Erstmanifestation, die auch im späteren Verlauf der Krankheit noch auftreten kann, ist das diabetische Koma, ein akut lebensbedrohlicher Zustand, der durch den relativen oder absoluten Insulinmangel ausgelöst wird (Fayfman et al., 2017).

Diabetes als chronisch progressive Erkrankung geht mit zahlreichen, teils schwerwiegenden Komplikationen einher. So ist das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall erhöht (Dinesh Shah et al., 2015). Weiterhin steigt das Risiko für eine chronische Niereninsuffizienz (Dean, 2012). Zwei klassische Komplikationen sind auch die diabetische Retinopathie, die im schwersten Fall zur Blindheit führen kann (Hendrick et al., 2015), und das diabetische Fußsyndrom, das vor allem durch eine diabetisch bedingte Neuropathie entsteht (Volmer-Thole und Lobmann, 2016). Neben den somatischen Komplikationen kommt es zudem gehäuft zu psychischen Komplikationen wie einer Depression (Holt et al., 2014). Eine Risikoreduktion für die Komplikationen kann dabei durch einen dauerhaft gut eingestellten Blutglukosespiegel erreicht werden (Unnikrishnan et al., 2016).

In der Therapie von T1D und T2D gibt es Unterschiede. Ziel ist bei beiden Typen eine möglichst gute Blutglukosekontrolle. Beim T1D steht dabei aufgrund des absoluten Insulinmangels durch den Verlust der β -Zellen die Insulinsubstitution im Vordergrund. Bei dieser versucht man durch die Substitution verschieden lang wirksamer Insulinanaloga eine möglichst physiologische Insulinwirkung nachzuahmen. Als Orientierung für die benötigten Insulinmengen dient dabei der Blutglukosespiegel. Neben der Insulintherapie sind Ernährungsberatung des Patienten, die Glukoseselbstkontrolle und die psychosoziale Betreuung wichtige Bausteine der Therapie (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2018).

Bei der Therapie des T2D spielt die Insulintherapie ebenfalls eine Rolle, kommt aber meist erst ergänzend zum Einsatz, wenn verschiedene andere Therapien nicht zur gewünschten Blutglukoseeinstellung geführt haben (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2013). Therapeutisch sollten zuerst lebensstilmodifizierende nicht medikamentöse Möglichkeiten,

wie Ernährungsumstellung, Rauchentwöhnung und körperliche Aktivität, genutzt werden (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2013). Sollte das nicht zu ausreichend guter Blutglukosekontrolle führen, sollte zunächst ein orales Antidiabetikum eingesetzt werden. Zur Gruppe der oralen Antidiabetika gehören Metformin, Sulfonylharnstoffe, α -Glukosidasehemmer, Dipeptidyl-Peptidase-4-Inhibitoren, Gliflozine, Glinide und Glitazone. Diese wirken über die Steigerung der Insulinsekretion aus den β -Zellen oder über eine Verbesserung der Insulinsensitivität. Sollte das Therapieergebnis weiter nicht zufriedenstellend ausfallen, können mehrere orale Antidiabetika kombiniert werden oder es wird ergänzend eine Insulintherapie begonnen, die unterschiedlich intensiv durchgeführt werden kann. (Bundesärztekammer (BÄK) et al., 2013).s.o.

Neben der Blutglukoseeinstellung ist Vorbeugung und Behandlung der Komplikationen wichtig. Da diese mit erhöhter Morbidität und Mortalität einhergehen, ist die frühe Erkennung dieser durch Screeningmaßnahmen besonders wichtig (Hsieh et al., 2016). Weiterhin sind vor allem eine gute Einstellung der Blutlipide und des Blutdrucks von Bedeutung, da diese das Risiko für diabetische Nephropathie und Retinopathie sowie kardiovaskuläre Komplikationen senkt (Forbes und Cooper, 2013).

Alle genannten Therapien ändern nichts an der Entstehung von Diabetes. Das liegt unter anderem daran, dass über die Faktoren, die an der Entstehung des Diabetes beteiligt sind, wenig bekannt ist. Einen dieser Faktoren konnte man in den letzten Jahren identifizieren, die Inflammation. Was Inflammation ist und wie sie mit Diabetes zusammenhängt, möchte ich im folgenden Kapitel erläutern.

1.2 Inflammation

1.2.1 Allgemein

Seit Tausenden von Jahren ist die Inflammation bereits bekannt. Die erste Beschreibung der mit ihr einhergehenden klinischen Kardinalsymptome stammte vom römischen Arzt Cornelius Celsus, der diese mit *rubor et tumor cum calore et dolore* (Rötung und Schwellung mit Wärme und Schmerz) beschrieb. Die Kardinalsymptome wurden im 19. Jhd. um die *functio laesa* (Funktionseinschränkung) ergänzt (Medzhitov, 2010). Das Wort Inflammation leitet sich dabei vom lateinischen „inflammare“ ab, was übersetzt „entflammen“ oder „entzünden“ bedeutet (Rivas, 2010).

Die akute Inflammation soll hierbei den Organismus vor schädlichen Einflüssen schützen (Seelaender et al., 2015). Dabei ist Inflammation eine protektive Reaktion auf schädigende Einflüsse wie Infektion, Gewebeschädigung oder Verletzung (Kotas und Medzhitov, 2015). Die bereits erwähnten Kardinalsymptome der Inflammation entstehen vor allem durch eine lokale Gefäßreaktion. Durch eine Vasodilatation kommt es zur Rötung und Erwärmung. Außerdem erhöht sich die Gefäßpermeabilität, wodurch es zum Flüssigkeits- und Proteinaustritt (Schwellung) und zur Einwanderung von Entzündungszellen wie Monozyten und Neutrophilen ins Gewebe kommt (Rock et al., 2010). Diese Effekte werden über verschiedene Mediatoren, die vom Gewebe und den eingewanderten Entzündungszellen ausgeschüttet werden, vermittelt (Serhan, 2017). Das führt nicht nur zu einer lokalen, sondern auch einer systemischen Reaktion, die man anhand der Mediatoren und veränderter Proteinzusammensetzung im Plasma messen kann (Cone, 2001). Die gesamte akute inflammatorische Reaktion kann man unter dem Begriff Akute-Phase-Reaktion zusammenfassen (Baumann und Gauldie, 1994). Proteine, deren Expression durch diese Reaktion hoch oder runter reguliert wird, nennt man Akute-Phase-Proteine (Ceciliani et al., 2002). Der Prozess der akuten Inflammation muss streng kontrolliert werden, um nach einer Schädigung den Normalzustand wieder herstellen zu können. Dabei kommt es meist zu einem Ende der Inflammation, sobald der schädigende Einfluss entfernt oder beseitigt wurde (Rock et al., 2010). Sollten diese Mechanismen nicht greifen, kann es zu einer chronischen Inflammation kommen (Seelaender et al., 2015).

1.2.2 Subklinische Inflammation

1.2.2.1 Definition

Für die subklinische Inflammation gibt es keine exakte objektive Definition. Meist wird sie im Zusammenhang mit Erkrankungen wie T2D erwähnt. Bei subklinischer Inflammation handelt es sich um einen chronischen Zustand, bei dem die Konzentrationen von Mediatoren der Inflammation im Blut erhöht sind, ohne dass Kardinalsymptome der Entzündung vorhanden sind (Herder, 2011). Dabei ist das Ausmaß der Inflammation deutlich geringer als bei einer akuten Inflammation (Kolb und Mandrup-Poulsen, 2005).

Eine der Hauptursachen für die subklinische Inflammation ist die Fettleibigkeit. Diese führt zu einer dauerhaften, teils lebenslangen tonischen Aktivierung des Immunsystems

(Saltiel und Olefsky, 2017). Dafür gibt es verschiedene Ursachen, die im Fettgewebe zu finden sind. Überernährung, die mit Fettleibigkeit einhergeht, ist dabei ein Stress-Faktor für das Immunsystem (Donath, 2014). Durch die Einlagerung überschüssiger Nährstoffe in die Fettzellen kommt es zum Endoplasmatischen-Retikulum-Stress (Donath, 2014). Dieser führt zur Aktivierung verschiedener inflammatorischer Signalwege (Hotamisligil, 2010). Fettleibigkeit führt weiterhin zur Ansammlung von Makrophagen im Fettgewebe (Kolb und Mandrup-Poulsen, 2005). Die Ansammlung wird unter anderem von im Fettgewebe einzeln nekrotisch absterbenden Fettzellen ausgelöst (Cinti et al., 2005). Makrophagen wechseln dabei in einen proinflammatorischen Zustand und schütten inflammatorische Mediatoren aus (Mathis, 2013). Expansion des Fettgewebes, die bei Fettleibigkeit auftritt, führt zu einer lokalen Hypoxie (Ye, 2009), die zur Hochregulation verschiedener proinflammatorischer Adipokine führt. (Trayhurn, 2013). Die lokale Hypoxie führt auch zu Endoplasmatischen-Retikulum-Stress und zu den Einzelzellnekrosen (Ye, 2009).

1.2.2.2 Wichtige Marker und Mediatoren

Einer der wichtigsten Mediatoren der Inflammation ist Interleukin (IL)-1 β , eine molekulare Unterform von IL-1, einem proinflammatorischen Zytokin. Es wird vor allem in Monozyten im Blut produziert (Ferrero-Miliani et al., 2007). Zytokine sind kleine Proteine, die der Zellkommunikation dienen (Chousterman et al., 2017). IL-1 β vermittelt verschiedene inflammatorische Effekte wie Fieber, Vasodilatation und Hypotension (Peral de Castro et al., 2015). Es führt zur Produktion verschiedener anderer Zytokine, die Makrophagen in entzündetes Gewebe einwandern lassen können (Dinarello et al., 2010). IL-1 β kann die Bildung von IL-6 induzieren, einem weiteren wichtigen Mediator der Entzündung (Chung, 2009). IL-6 wird in verschiedenen Geweben gebildet, unter anderem in Leukozyten, Adipozyten und Endothelzellen (Pradhan, 2001). Es stimuliert die Bildung von verschiedenen weiteren Akute-Phase-Proteinen wie Serum Amyloid A, Fibrinogen und C-reaktivem Protein (CRP) in der Leber (Heinrich et al., 1990). Es reduziert die Produktion von Fibronectin und Albumin und ist verantwortlich für den mit Inflammation assoziierten Eisenmangel (Tanaka et al., 2014). Ein weiterer wichtiger Mediator der Inflammation ist der Tumornekrosefaktor α (TNF α). TNF α wird hauptsächlich in Monozyten und Neutrophilen, aber auch in vielen weiteren Zellen produziert (Balkwill, 2006). TNF α führt unter anderem zur Vasodilatation, zum Ödem über erhöhte Vasopermeabilität, zur Einwanderung von Entzündungszellen und zu Fieber (Zelová und

Hošek, 2013). Lokale Erhöhungen von TNF α können damit bei der Entstehung aller Kardinalsymptome der Entzündung beitragen (Tracey, 2002).

Neben den oben genannten Mediatoren, die die Effekte der Inflammation vermitteln, gibt es auch solche, die einen limitierenden, antiinflammatorischen Effekt haben wie Adiponektin. Adiponektin wird von Adipozyten ausgeschüttet und hat eine immunologische Funktion, deshalb fällt es in die Gruppe der Adipokine. Dabei macht Adiponektin den Großteil der von Adipozyten ausgeschütteten Adipokine aus (Herder et al., 2013a). Adiponektin reduziert inflammatorische Signale über verschiedene Rezeptoren in einer Reihe von Zellen, beispielsweise reduziert es die TNF α -vermittelten Effekte auf Endothelzellen (Wang und Scherer, 2016).

Neben entscheidenden Mediatoren der Inflammation gibt es auch wichtige Proteine in den Zellsignalwegen, die die inflammatorischen Signale vermitteln. Ein zentrales Protein in der inflammatorischen Reaktion ist der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B), ein wichtiger Transkriptionsfaktor. (Arkan et al., 2005). NF κ B liegt im Zytoplasma an *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* (I κ B) gebunden vor und wird durch Signale von außerhalb der Zelle aktiviert und von diesem abgespalten (Barnes und Karin, 1997). Dabei reguliert NF κ B die Produktion vieler verschiedener inflammatorischer Marker, unter anderem auch von IL-1 β , IL-6 und TNF α (Cai et al., 2005). Die Fehlregulation des NF κ B Signals kann zu verschiedenen Krankheiten wie inflammatorischen und immunologischen Störungen führen (Mitchell et al., 2016).

Ein weiterer wichtiger inflammatorischer Signalweg ist die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade (Sawatzky et al., 2006). Einer der zentralen Endpunkte der Signalkaskade ist dabei die Aktivierung von *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK) 1 und 2 (Brietz et al., 2016), die durch Phosphorylierung geschieht (Pearson et al., 2001). Der Signalweg kann dabei unter anderem durch IL-1 β , IL-6 und TNF α ausgelöst werden (Lisi et al., 2014; Fusello et al., 2006). ERK kann viele verschiedene Proteine beeinflussen wie Membranproteine oder Transkriptionsfaktoren (Ünal et al., 2017) und dadurch Zellen beispielsweise zur Apoptose bringen (Sawatzky et al., 2006). Ein weiterer wichtiger Endpunkt der MAPK-Signalkaskade ist die Gruppe der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38) (Brietz et al., 2016). Dieser Signalweg wird durch proinflammatorische Zytokine ausgelöst (Kyriakis und Avruch, 1996). p38 hat dabei eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Immunreaktion und ist beteiligt an Krankheiten

wie Asthma und Autoimmunerkrankungen (Johnson und Lapadat, 2002). Um p38 zu aktivieren, wird es phosphoryliert (Cuadrado und Nebreda, 2010).

1.2.3 Inflammation und Diabetes

In vielen Studien wurde die subklinische Inflammation als Risikofaktor für Insulinresistenz, β -Zell-Dysfunktion und T2D ausgemacht (Herder et al., 2013a). Es gibt mehrere Gründe, die nahelegen, dass Inflammation und Diabetes zusammenhängen. Ein Grund liegt darin, dass Leber, hämatopoetisches System, Immunsystem und Fettgewebe aus einem gemeinsamen Organ, dem Fettkörper, evolutionär hervorgegangen sind. Dabei kann der Fettkörper, der heute noch in *Drosophila*, einer Fliegenart, zu finden ist, auf metabolische und infektiöse Einflüsse reagieren und verbindet damit Diabetes und Inflammation organisch (Hotamisligil, 2017).

Auch in den Risikofaktoren für T2D lässt sich ein Zusammenhang zwischen Diabetes und Inflammation finden. Die meisten wichtigen Risikofaktoren für T2D wie Überernährung, ballaststoffarme Ernährung, sitzender Lebensstil, Schlafmangel und Depressionen führen zu einer lokalen oder systemischen niedriggradigen Inflammation (Kolb und Mandrup-Poulsen, 2010).

Der überwiegende Anteil der Patienten mit T2D ist zudem übergewichtig. Wie bereits erläutert führt Übergewicht zu subklinischer Inflammation. Es ist aber auch mit Insulinresistenz assoziiert, einem regelhaften Vorläufer von T2D (Saltiel und Olefsky, 2017; Wisse, 2004).

Auch klassische Marker der Inflammation verbinden diese mit Diabetes. TNF α führt zu Insulinresistenz in Adipozyten (Hotamisligil, 2017). Die Aktivierung von NF κ B trägt zur Bildung von inflammatorischen Mediatoren bei, die einen Anteil in der Entstehung von Insulinresistenz haben (Arkan et al., 2005). IL-1 β verursacht verschiedene Prozesse: Zum einen induziert es Insulinresistenz in Leberzellen (Nov et al., 2010), zum anderen führt es zum Tod von β -Zellen in den Pankreasinseln (Dinarello et al., 2010). Neben diesen direkten Mechanismen kann man eine Beteiligung von IL-1 β an T2D auch durch seine therapeutische Blockierung aufzeigen. So hatte in mehreren unabhängigen Studien die Blockade von IL-1 β durch einen rekombinanten Antagonisten eine bessere

Blutglukoseeinstellung und eine bessere sekretorische β -Zellfunktion zur Folge (Donath, 2014).

Neben diesen Mechanismen, die Biomarker der Inflammation mit T2D in Verbindung setzen, gibt es auch zahlreiche Querschnitts- und Kohortenstudien, die eine Assoziation von Mediatoren der Inflammation mit T2D darstellen. So zeigten mehrere, unabhängige Querschnittsstudien eine positive Assoziation von CRP, IL-6 und TNF α mit dem Vorhandensein von T2D bzw. Vorläufern von diesem wie Insulinresistenz (Yudkin et al., 1999; Frohlich et al., 2000; Müller et al., 2002; Hak et al., 2001). Eine Querschnittsstudie bezeichnet eine Studie, bei der Daten einmalig zu einem Zeitpunkt oder innerhalb eines kurzen Zeitfensters erfasst werden. Sie dient eher der Beschreibung des aktuellen Zustandes und weniger dem Nachweis eines Kausalzusammenhangs (Held, 2010). Dafür sind Kohortenstudien eher geeignet, da bei diesen eine Personengruppe prospektiv über einen gewissen Zeitraum oder bis ein bestimmtes Ereignis eintritt begleitet wird (Held, 2010). In Kohortenstudien ist der Zusammenhang verschiedener inflammatorischer Biomarker zu Studienbeginn mit der Entstehung von T2D im Verlauf der Studie untersucht worden. Dabei wurde unter anderem ein positiver Zusammenhang für CRP (Barzilay et al., 2001), IL-6 (Spranger et al., 2003) und IL-18, einem weiteren proinflammatorischen Zytokin (Thorand et al., 2005), festgestellt. Ein niedriger Adiponektinspiegel war ebenfalls mit der Entstehung von T2D assoziiert (Wannamethee et al., 2007). Insgesamt geht eine subklinische Inflammation dem T2D Jahre voraus (Kolb und Mandrup-Poulsen, 2005) und kann diesen sogar vorhersagen (Duncan et al., 2003).

Wegen dieser und weiterer Hinweise kann man Diabetes also auch als inflammatorische Erkrankung betrachten (Donath und Shoelson, 2011).

1.3 Afamin

1.3.1 Allgemein

Afamin wurde initial 1964 als tryptophanarmes α 1-Glykoprotein beschrieben (Haupt und Heide, 1964). Erst 30 Jahre später gelang eine Einordnung von Afamin in die Albumin-Genfamilie zu Albumin, Vitamin-D-Bindeprotein und α -Fetoprotein, mit dem es am nächsten verwandt ist (Lichenstein et al., 1994; Nishio und Dugaiczky, 1996). Afamin hat eine molekulare Masse von 87 kDa, wobei ca. 23% davon durch Glykosylierung zustande

kommen (Lichenstein et al., 1994). Afamin wird postnatal primär in der Leber gebildet. Dabei kommt es perinatal zu einer Unterdrückung der α -Fetoproteinbildung und einer vermehrten Afamin-Bildung (Bélanger et al., 1994). Afamin kommt im Plasma, in der Follikelflüssigkeit und im Liquor vor (Jerkovic et al., 2005) und hat eine mittlere Plasmakonzentration von 61 bis 73 mg/l (Kollerits et al., 2017). Afamin ist für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur, für 48 Stunden bei 4 °C und für 1 Jahr bei -20 °C bis -80 °C stabil. Seine Plasmawerte sind dabei unabhängig von Alter, Geschlecht, Nüchternheit, zirkadianer Rhythmik, Menstruationsphase und verschiedenen Erkrankungen wie COPD oder chronischer Nierenerkrankung. Erniedrigte Werte finden sich bei Patienten mit Herzkrankheiten, Pneumonie oder Sepsis (Dieplinger et al., 2013).

Über die Funktion von Afamin ist wenig bekannt. Es hat zwar spezifische Bindestellen für Vitamin E (Voegelé et al., 2002), die Rolle als Vitamin E Bindeprotein im Plasma ist aber wahrscheinlich eher von geringer Bedeutung, da Vitamin E im Plasma meist an Lipoproteine gebunden ist. In Follikelflüssigkeit und Liquor könnte es dagegen eine Rolle spielen (Jerkovic et al., 2005). Afamin könnte auch als Vitamin E Transporter über die Blut-Hirn-Schranke (Kratzer et al., 2009) oder die Darmbarriere dienen (Haga et al., 2015). Afaminwerte im Plasma steigen während der Schwangerschaft linear auf einen ungefähr doppelt so großen Ausgangswert an (Hubalek et al., 2014). Dabei sind die Afaminwerte bei Frauen, die eine Präeklampsie oder einen Gestationsdiabetes entwickeln, signifikant höher als bei Frauen mit unkomplizierter Schwangerschaft (Tramontana et al., 2018).

Afaminspiegel im Plasma verändern sich auch bei Patienten mit verschiedenen Malignomen. Sie sind beispielsweise erhöht beim Zervixkarzinom (Jeong et al., 2008) und beim prädiagnostischen Brustkrebs (Opstal-van Winden et al., 2011) und erniedrigt bei hepato- und cholangiozellulärem Karzinom (Ritorto und Borlak, 2011; Tolek et al., 2012) sowie beim Magenkarzinom (Penno et al., 2012).

Auch in der Zellkultur zeigte sich eine verminderte Bildung von Afamin aus verschiedenen HCC-Zelllinien wie Hep3B und HepG2 (Wu et al., 2000), die zunächst für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit angedacht waren.

1.3.2 Afamin und metabolisches Syndrom

Das metabolische Syndrom ist nicht einheitlich definiert. Die *International Diabetes Federation* definiert es als Gruppe von metabolischen Erkrankungen. Dabei muss ein Patient zentrales Übergewicht, definiert über Taillenumfang oder Körpermasseindex (BMI) über 30 kg/m², haben und mindestens zwei der folgenden Faktoren müssen zutreffen: Der Patient muss erhöhte Triglyzeride (≥ 150 mg/dl), erniedrigtes Lipoprotein hoher Dichte (HDL) Cholesterin (≤ 40 mg/dl für Männer bzw. ≤ 50 mg/dl für Frauen) oder erhöhten Blutdruck (systolisch ≥ 130 mmHg oder diastolisch ≥ 85 mmHg) haben bzw. eine spezifische Therapie für eine dieser drei Symptome erhalten oder eine erhöhte Nüchternplasmaglukose (≥ 100 mg/dl) bzw. einen bekannten Diabetes haben (International Diabetes Federation, 2006). Die *World Health Organization* (WHO) definiert das metabolische Syndrom ähnlich. Allerdings steht hier die Glukoseintoleranz bzw. Insulinresistenz mehr im Fokus. Außerdem kommen Symptome wie die Mikroalbuminurie hinzu (Alberti und Zimmet, 1998).

Ein starke Assoziation zwischen Afamin und den Komponenten des metabolischen Syndroms konnte zuerst im Mausmodell dargestellt werden (Kronenberg et al., 2014). Dazu wurde das humane Afamingen mittels Vektor, der die Desoxyribonukleinsäure (DNA) des humanen Afamingens als komplementäre DNA trug, an der Stelle ins Mausgenom eingeschleust, die unter der Kontrolle des murinen Albumin Promotors und Enhancers liegt. Das führte zu einer Überexpression von Afamin, und die Mäuse entwickelten ein erhöhtes Körpergewicht, erhöhte Triglyzeride, erhöhtes Gesamt-Cholesterin und erhöhte Blutglukosewerte. Das HDL-Cholesterin blieb unverändert. (Kronenberg et al., 2014).

In einem zweiten Schritt wurde die Assoziation von Afamin mit dem metabolischen Syndrom und seinen Komponenten in drei populationsbasierten Studien (Bruneck, SAPHIR, KORA) mit insgesamt über 5000 Studienteilnehmern untersucht. Es konnte eine positive Assoziation zwischen Afamin und den Parametern des metabolischen Syndroms aufgezeigt werden, die stärkste Assoziation bestand zwischen Afamin mit Taillenumfang und Triglyzeriden (Kronenberg et al., 2014). In einer weiteren Studie zu Patientinnen mit dem polyzystischen Ovar-Syndrom konnte unabhängig von der untersuchten Krankheit eine Assoziation von Afamin zu Insulinresistenz dargestellt und die Assoziation von Afamin zum metabolischen Syndrom bestätigt werden (Seeber et al., 2014).

Der Zusammenhang von Afamin mit Insulinresistenz konnte in einer großen Meta-Analyse aus mehreren mehrheitlich populationsbasierten Studien mit insgesamt über 20.000 Teilnehmern ebenfalls dargestellt werden. Zusätzlich zeigte sich eine positive Assoziation von Afamin mit T2D (Kollerits et al., 2017). Die Studie fand eine erhöhte Chance (Odds-Ratio (OR): 1,4) für die Prävalenz von T2D bei einer Steigerung der Afaminkonzentration im Plasma um 10 mg/l. Dabei wurde das OR bereits für die Störfaktoren Alter und Geschlecht adjustiert. Störfaktoren, auch Confounder genannt, sind in diesem Fall Faktoren, die sowohl die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Diabetes als auch die Afaminplasmakonzentration beeinflussen. Daher wurden weitere Störfaktoren wie HDL-, Cholesterin- und Triglyceridkonzentration, BMI und Hypertonus in die Berechnung einbezogen, was weiterhin zu einer positiven Assoziation führte (OR: 1,19) (Kollerits et al., 2017). Der Einschluss von Afamin in bestehende Vorhersagemodelle für T2D konnte dabei diese sogar noch verbessern (Kollerits et al., 2017). Die Kausalität für diesen Zusammenhang sowie mögliche ursächliche Mechanismen sind bislang ungeklärt (Kollerits et al., 2017).

1.3.3 Afamin und Inflammation

Wie bereits erläutert sind Inflammation und Diabetes eng miteinander verbunden. Da auch Afamin eine Rolle beim Diabetes zu spielen scheint, ist es naheliegend, dass Afamin auch einen Einfluss auf die Inflammation haben könnte. Auch die Leber als gemeinsamer Bildungsort für Afamin (Bélanger et al., 1994) und diverse Akute-Phase-Proteine (Ceciliani et al., 2002) und deren erhöhte Spiegel in Patienten mit T2D (Donath und Shoelson, 2011) unterstützen diese These.

Die aktuelle Studienlage dazu ist jedoch recht dünn und auch nicht eindeutig. So zeigt eine Querschnittsstudie aus Österreich eine inverse Assoziation zwischen Afamin und Plasmakonzentrationen von inflammatorischen Biomarkern wie IL-6 und CRP (Dieplinger et al., 2013). Die bereits erwähnte populationsbasierte Studie mit über 5000 Studienteilnehmern zeigte dagegen eine positive Assoziation von Afamin mit hochsensitivem CRP (hsCRP) (Kronenberg et al., 2014). Eine weitere Studie mit 82 fettleibigen und schlanken Teilnehmern konnte die Assoziation von Afamin mit IL-6 bestätigen und stellte eine weitere Assoziation von Afamin mit proinflammatorischen

Adipokinen dar. Mit antiinflammatorischen Mediatoren wie Adiponektin zeigte sich keine Assoziation (Seres et al., 2017).

Die größte populationsbasierte der oben genannten Studien zeigt eine positive Assoziation von Afamin mit inflammatorischen Markern. Daher erscheint es plausibel, dass auch Afamin eine proinflammatorische Wirkung haben könnte. Aufgrund der Studienlage ist dies jedoch nur eine Hypothese, weshalb es weiterer Untersuchungen des Zusammenhangs von Afamin und Inflammation bedarf.

1.4 Ziele der Arbeit

Afamin ist bisher noch nicht tiefgehend erforscht. So ist kaum etwas bekannt über Faktoren, die die Bildung von Afamin in der Leber beeinflussen.

Auch wenn Afamin mit der Inzidenz des T2D assoziiert ist, ist unklar, ob es eine Beteiligung an der Entstehung der Erkrankung bzw. von Vorläufern ebendieser, wie Insulinresistenz, hat.

Afamin scheint mit inflammatorischen Mediatoren assoziiert zu sein. Auch hier bedarf es näherer Untersuchung, da die bisherigen Studien nicht eindeutig sind und sich auf die Untersuchung einiger weniger Mediatoren beschränken. Ob Afamin Ursache für erhöhte inflammatorische Marker oder Folge dieser ist, ist unklar.

Aufgrund der oben erläuterten offen gebliebenen Fragen ergeben sich für diese Arbeit folgende Ziele:

1. Identifizierung inflammatorischer und metabolischer Faktoren, die die Afaminproduktion in Hepatozyten beeinflussen
2. Bestimmung des Effekts von Afamin auf die Produktion inflammatorischer Mediatoren durch humane Adipozyten
3. Bestimmung des Effekts von Afamin auf metabolische und inflammatorische Signalwege in humanen Adipozyten als einem zentralen Mediator von inflammatorisch vermittelter Entstehung von T2D
4. Klärung der Assoziation von Afamin mit einer Vielzahl von inflammatorischen Markern in einer populationsbasierten Studie

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur – HepaRG Zellen

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten bis zum Abernten der Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank (Heraeus, Kamin Air HB 2472) durchgeführt.

2.1.1 Entnahme des Zellüberstandes

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden auf Eis oder bei Kühlung durchgeführt.

Die entsprechende Mikrotiterplatte wurde nach exakt 24 Stunden aus dem Brutschrank entnommen und kalt gestellt. Die Überstände wurden separat entnommen und 10 min bei 1900g und 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde verworfen, nur die jeweiligen Überstände wurden entnommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, lysiert und eingefroren. Das Zelllysate wurde für diese Arbeit jedoch nicht weiter verwendet.

2.1.2 Zelltyp

Für die Versuche wurden ausschließlich HepaRG Zellen von Thermo-Fisher (Katalog Nr.: HPRGC10) verwendet. HepaRG Zellen entstammen aus einer immortalisierten hepatischen Zelllinie (Gripon et al., 2002). Nach Erhalt wurden diese in flüssigem Stickstoff (ca. -196°C) aufbewahrt.

2.1.3 Zellkulturmedien

Für die Versuche wurden folgend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschriebene Zellkulturmedien verwendet:

Zusammensetzung	Lieferant
100 ml Williams' Medium E	Life technologies, 32551-020
10 ml FBS	Biochrom, S 0115
1 ml 100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin	Life technologies, 15140-148
100 µl 5 mg/ml bovines Insulin	Sigma, I6634-50mg
100 µl 50 000 µmol/l Hydrocortisone Hemisuccinat	Santa Cruz, sc-250130
2 ml DMSO (2%)	Sigma, D2438

Tabelle 1: HepaRG Nährmedium

DMSO: Dimethylsulfoxid; FBS: fetales bovines Serum; IU: internationale Einheiten; l: Liter; µg: Mikrogramm; µmol: Mikromol; mg: Milligramm; ml: Milliliter

Zusammensetzung	Lieferant
100 ml Williams' Medium E	Life technologies, 32551-020
1 ml 100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin	Life technologies, 15140-148
100 µl 50 000 µmol/l Hydrocortisone Hemisuccinat	Santa Cruz, sc-250130

Tabelle 2: HepaRG Inkubationsmedium

IU, internationale Einheit; l: Liter; µg: Mikrogramm; µmol: Mikromol; mg: Milligramm; ml: Milliliter

Alle Medien wurden nach dem Ansetzen unter sterilen Verhältnissen bei 4°C gelagert. Nur die für den jeweiligen Versuch benötigten Mengen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

Tabelle 3 zeigt die für die Versuche verwendeten Stimulanzen.

Stimulanz	Lieferant
IL-6	R&D Systems, Bestell-Nr. 7270-IL-025/CF, 25 µg
TNF-α	R&D Systems, Bestell-Nr. 210-TA-005/CF, 5 µg
IL-1β	R&D Systems, Bestell-Nr. 201-LB-005/CF, 5 µg
Adiponektin	R&D Systems, Bestell-Nr. 1065-AP-050, 50 µg
Glukose	Sigma, Bestell-Nr. G7021-100 G
porcines Insulin	Sigma-Aldrich, Bestell-Nr. I5523

Tabelle 3: Stimulanzen

Die Tabelle zeigt die für die Versuche verwendeten Stimulanzen.

BSA: bovines Serumalbumin; IL: Interleukin; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung; TNF: Tumornekrosefaktor

2.1.4 Zellzahl und Zelldichte

Vor dem Versuch wurden je zwei mit Kollagen-I beschichtete Mikrotiterplatten mit je 24 Vertiefungen (ThermoFisher, A1142802), die im Englischen *Well* genannt werden, vorbereitet. Diese Platten haben 24 gleichartigen Vertiefungen zu je 1,9 cm² Grundfläche. Dazu wurden je acht *Wells* mit 0,2 ml Nährmedium befüllt. Die restlichen *Wells* wurden

mit je 0,5 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) befüllt, um über die gesamte Mikrotiterplatte möglichst gleich bleibende Bedingungen zu erhalten. Zum Versuch wurde je ein Kryogeäß (10^7 Zellen in 1 ml Kryokonservierungsmedium) aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und unter Sichtkontrolle im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit 9 ml Nährmedium gemischt und für 2 min bei 360g zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Zellpellet entfernt. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Je 0,3 ml der Zellsuspension (\cong 600.000 Zellen) wurden in jedes bereits mit 0,2 ml Nährmedium befüllte *Well* der beiden 24-*Well* Platten überführt.

2.1.5 Zellkultivierung

Die Zellen wurden jeweils für insgesamt sieben Tage im Brutschrank kultiviert, da die Enzym-Aktivität von vor allem Cytochrom-P-Enzymen nach einem initialen Maximalwert rapide abnimmt und sich anschließend über sieben Tage regeneriert. Erst bei wieder ausreichend regenerierter Enzym-Aktivität sind die HepaRG Zellen für den Zellkulturversuch geeignet. Es wurde alle 48 Stunden bis maximal 72 Stunden das Nährmedium erneuert. Der Brutschrank lieferte mit 5% CO₂ und 37°C konstante Bedingungen.

2.1.6 Zellkultur zur Identifizierung von metabolischen und inflammatorischen Faktoren, welche die Afamin-Expression beeinflussen

Es wurden fünf unabhängige Versuche (= 5 Platten) geplant. Nach sieben Tagen wurde das Nährmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,5 ml Inkubationsmedium pro *Well* gewaschen und mit 0,5 ml Inkubationsmedium pro *Well* für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen nach dem Schema aus Abb. 1 mit je 0,5 ml Lösung für 24 Stunden stimuliert.

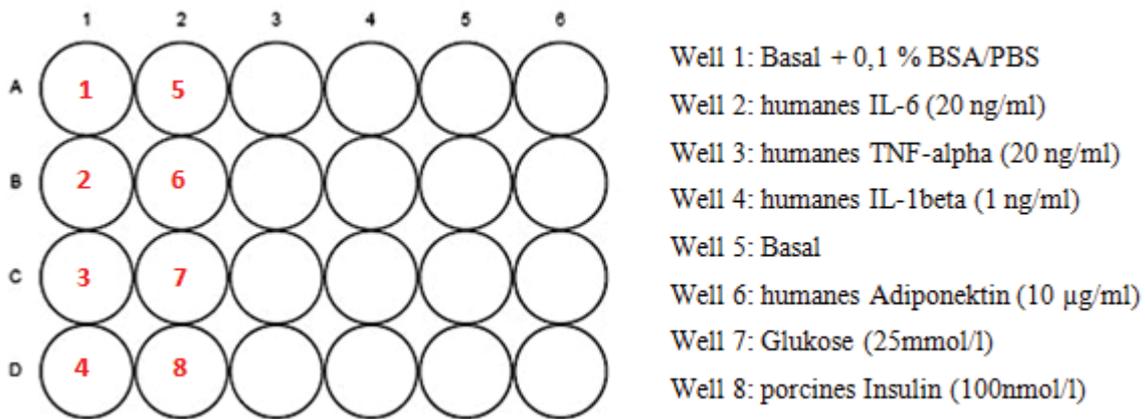


Abb. 1: Schematische Darstellung einer 24-Well-Platte

Die roten Zahlen geben dabei die *Well*-Nummer an. Rechts steht, wie die Zellen im entsprechenden *Well* stimuliert wurden.

BSA: bovines Serumalbumin; IL: Interleukin; l: Liter; µg: Mikrogramm; ml: Milliliter; mmol: Millimol; ng: Nanogramm; nmol: Nanomol; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung; TNF: Tumornekrosefaktor

Alle Lösungen wurden vor der Stimulation entsprechend vorbereitet. Basal bezeichnet Inkubationsmedium. In *Well* 1 befindet sich Inkubationsmedium im Verhältnis 100:1 zu 0,1% bovines Serumalbumin (BSA)/PBS. Die inflammatorischen Proteine von *Well* 2-4 wurden zunächst in 0,1% BSA/PBS gelöst, anschließend mit einer Verdünnung von 1:100 im Stimulationsmedium gelöst und dadurch auf in Abb. 1 angegebene Konzentrationen gebracht. Adiponektin, Glukose und Insulin sind jeweils direkt im Inkubationsmedium gelöst worden.

2.1.7 Zellkultur zur Identifizierung der Auswirkung verschiedener Insulinkonzentrationen auf die Afaminexpression

Es wurden 6 unabhängige Versuche (= 6 Platten) geplant. Dabei stand der Effekt von Insulin auf die Afaminsekretion im Vordergrund. Ansonsten wurde wie im vorherigen Kapitel verfahren, allerdings wurde diesmal wie in Abb. 2 stimuliert.

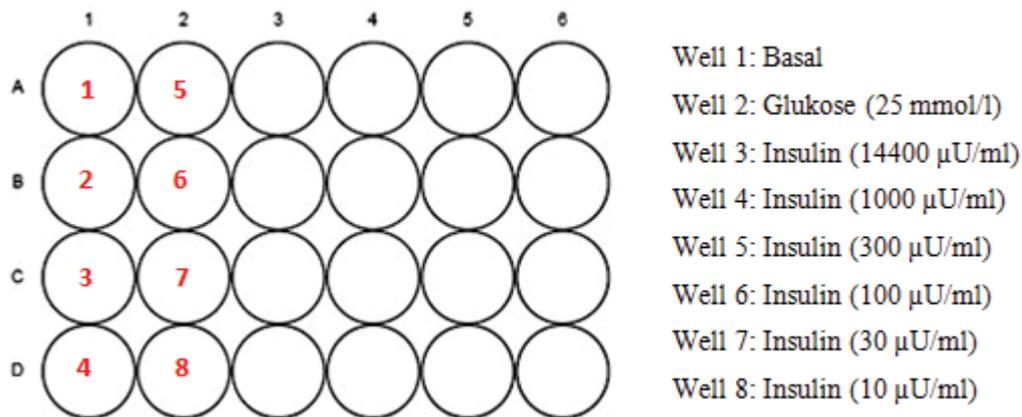


Abb. 2: Schematische Darstellung einer 24-Well-Platte

Die roten Zahlen geben dabei die *Well*-Nummer an. Rechts ist angegeben, wie die Zellen im entsprechenden *Well* stimuliert wurden.

l: Liter; ml: Milliliter; mmol: Millimol; μ U: Mikrounits

Alle Lösungen wurden vor der Stimulation entsprechend vorbereitet. Insulin und Glucose wurden dabei direkt im Inkubationsmedium gelöst.

2.1.8 Bestimmung der Zytotoxizität der verwendeten Stimulantien auf HepaRG Zellen mittels Water-soluble tetrazolium salt-8 Tests (WST-8)

Die Zellkulturarbeit verlief analog zu Kapitel 2.1.6, allerdings wurden die Zellen in drei Kollagen-beschichteten 96-*Well* Platten (ThermoFisher, A11428-03) in je 16 *Wells* zu je 100.000 Zellen pro *Well* ausgesät. Nach 24 Stunden Stimulation (siehe Abb. 3) wurden die Zellen nicht abgeerntet, sondern es wurde der nachfolgend beschriebene WST-8 Test durchgeführt.

WST-8, ein Tetrazolium-Salz, ist in Lösung gelblich und wird von lebensfähigen Zellen durch 1-Methoxy-5-Methylphenazinium-Methyl-Sulfat zu einem orangefarbenen Produkt reduziert. Dabei ist das Ausmaß der Umsetzung von WST-8 direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen und anhand der Lichtabsorption messbar. Damit eignet sich der WST-8 Test, um abzuschätzen, ob die eingesetzten Substanzen zytotoxisch auf HepaRG Zellen wirken.

Es wurden in jedes *Well* 10 μ l Colorimetric Cell Viability Kit(CCVK)-I Lösung (PromoCell, PK-CA705-CK04), die WST-8 enthält, hinzugegeben. Die Zellen wurden

weiter im Brutschrank inkubiert und nach 30 Minuten wurde die Lichtabsorption bei 450 nm Wellenlänge im Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan, Spectra Thermo) gemessen.

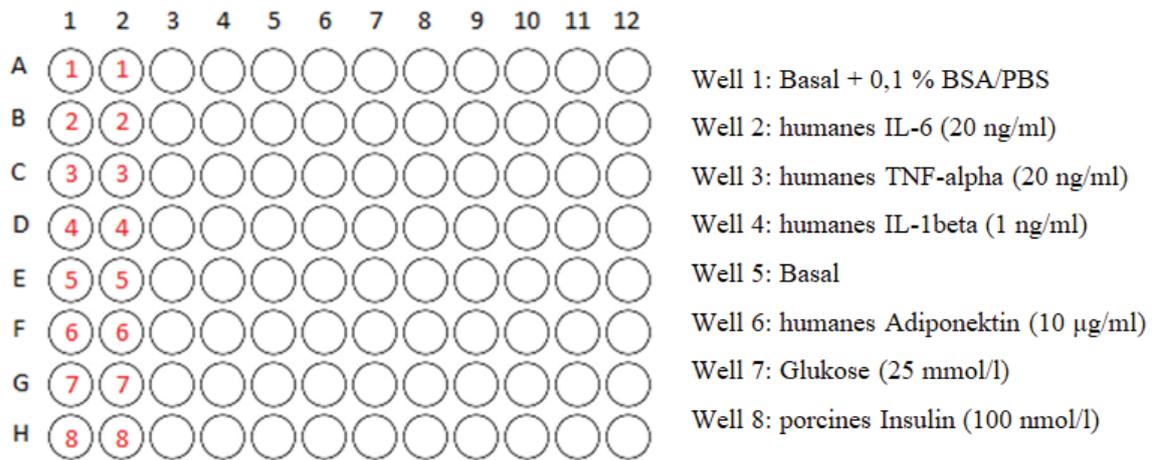


Abb. 3: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte

Die roten Zahlen geben dabei die *Well* Nummer an. Rechts ist aufgeführt, wie die Zellen im entsprechenden *Well* stimuliert wurden.

BSA: bovines Serumalbumin; IL: Interleukin; l: Liter; µg: Mikrogramm; mmol: Millimol; ng: Nanogramm; nmol: Nanomol; PBS: phosphatgepufferte Salzlösung; TNF: Tumornekrosefaktor

2.1.9 Afamin-Bestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei dem hier verwendeten ELISA handelt es sich um einen DuoSet-ELISA (R&D Systems, Bestell-Nr. DY8065-05) und ein Ancillary Reagent Kit (R&D Systems, Bestell-Nr. DY008) von R&D Systems. Alle im weiteren Verlauf dieses Kapitels genannten Antikörper und Reagenzien entstammen aus diesen beiden Kits.

ELISA ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Molekülen. Für diese Arbeit wurde ein so genannter Sandwich-ELISA verwendet. Dabei wird das Molekül, in diesem Fall Afamin, von einem Primärantikörper gebunden. Je mehr Afamin in der Probe vorhanden ist, desto mehr Afamin wird gebunden. Ein Sekundärantikörper bindet anschließend ebenfalls an Afamin. An diesen bindet in einem weiteren Schritt Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP), das eine Farbreaktion in einem noch zugefügten Reagenz katalysiert. Dabei hängt das Ausmaß des Farbumschlages direkt mit der initial gebundenen Afamin-Menge zusammen. Quantifiziert wird der Farbumschlag über eine Lichtabsorptionsmessung bei definierter Wellenlänge im Vergleich zu einer mitgeführten Standardreihe mit bekannter Afamin-Menge.

Initial wurde der Primärantikörper an die 96-Well Platte gebunden. Dazu wurde der Antikörper in PBS gelöst und auf eine Konzentration von 4 µg/ml gebracht. Anschließend wurden je 100 µl der Antikörperlösung in jedes *Well* pipettiert. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen luftdicht verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Platte mit Waschpuffer mittels Auto-Washer (Microplate Washer 405/TS; BioTek Instruments; Waschprogramm: 3x350 µl, 30 Sekunden Einweichzeit) gewaschen. Die Platte wurde auf einem Papiertuch ausgeklopft. Weiteres Waschen wurde in derselben Weise durchgeführt. Anschließend wurde die Platte mit je 300 µl Reagent Diluent 2 (einfach konzentriert \cong 1x) pro *Well* für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Durch diese Vorgehensweise sollten eventuell noch freie Proteinbindestellen besetzt und damit unspezifische Proteinbindung verhindert werden. Die Platte wurde wieder luftdicht verschlossen.

Nach einer Stunde wurde die Platte erneut gewaschen. Es wurden je 100 µl Überstand der jeweiligen HepaRG-Kulturen bzw. Standards (1:2 verdünnt in Reagent Diluent 2 (1x) als Verdünnungsreihe von 5000 pg/ml bis 78,1 pg/ml) pro *Well* der Platte pipettiert. Es wurden je zwei Wells mit dem gleichen Überstand bzw. Standard gefüllt, um bei der Messung später je zwei Messungen, also eine Doppelbestimmung, durchführen zu können. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet das Afamin aus Standard und Probe an den Primärantikörper.

Anschließend wurde die Platte gewaschen und je 100 µl Sekundärantikörper pro *Well* mit einer Konzentration von 0,125 µg/ml pipettiert. Dieser wurde in Reagent Diluent 2 (1x) gelöst. Dabei bindet auch der Sekundärantikörper an das Afamin.

Nach 2 Stunden wurde die Platte erneut gewaschen. Es wurden 100 µl Streptavidin-HRP, das vorher in Reagent Diluent 2 (1x) gelöst und so auf einfache Konzentration gebracht wurde, pro *Well* pipettiert. Die Platte wurde, luftdicht verschlossen, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet Streptavidin-HRP an den Sekundärantikörper.

Anschließend wurde erneut gewaschen und je 100 µl Substrat-Lösung pro *Well* pipettiert. Diese initial farblose Lösung wurde durch das Streptavidin-HRP zu einem Farbumschlag katalysiert. Nach 20 min wurde die Reaktion mit 50 µl Stop-Solution pro *Well* gestoppt. Danach wurde der Farbumschlag als Absorption mittels ELISA-Plattenmessgerät (Synergy 2; BioTek) bei 450 nm mit einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm gemessen.

2.2 Zellkultur – Präadipozyten

Alle folgenden Arbeiten bis zum Abernten der Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt

2.2.1 Zelltyp

Alle verwendeten Präadipozyten wurden kommerziell erworben (Lonza, PT-5020; PromoCell, C-12730). Die Präadipozyten wurden dabei aus subkutanem Fettgewebe isoliert. Für den Versuch wurden Präadipozyten von fünf verschiedenen Spendern im Alter von 27, 37, 42, 55 und 56 Jahren ohne Diabetes und ohne Adipositas verwendet. Es wurden Zellen von drei Frauen und zwei Männern untersucht. Alle waren kaukasischer Abstammung.

Die Zellen wurden vor Verwendung im flüssigen Stickstoff (ca. -196°C) gelagert.

2.2.2 Zellkulturmedien

Für die Versuche wurden die in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführten Zellkulturmedien verwendet:

Zusammen- setzung	Wachstums- medium in Präadipozyten- Basalmedium	Differenzierungs- medium in Präadipozyten- Basalmedium	Nutrition- medium in Adipozyten- Basalmedium	Inkubations- medium in Adipozyten- Basalmedium
FBS	0,05 ml	-	0,03 ml	-
ECGS	0,004 ml	-	-	-
EGF	10 ng	-	-	-
Hydro- cortison	1 µg	-	-	-
D-Biotin	-	8 µg	8 µg	8 µg
Insulin	-	0,5 µg	0,5 µg	-
Dexamethaso- n	-	400 ng	400 ng	-
IBMX	-	44 µg	-	-
L-Thyroxin	-	9 ng	-	-
Ciglitazon	-	3 µg	-	-
Heparin	90 µg	-	-	-
Gentamycin	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg

Tabelle 4: Adipozyten Zellkulturmedien

Die angegebenen Werte beziehen sich jeweils auf einen Milliliter Medium. Die Supplemente entstammen aus den jeweiligen Kits aus Tabelle 5.

ECGS: *endothelial cell growth supplement*; EGF: *epidermal growth factor*; FBS: fetales bovines Serum; IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin

Medium / Kit	Lieferant
Präadipozyten Basalmedium	Promocell, Bestell-Nr. 27411
Wachstumsmedium Supplement Kit	Promocell, Bestell-Nr. C-39427
Differenzierungsmedium Supplement Kit	Promocell, Bestell-Nr. C-39437
Adipozyten Basalmedium	Promocell, Bestell-Nr. 27431
Nutritionmedium Supplement Kit	Promocell, Bestell-Nr. C-39439
Gentamycin	Lonza, Bestell-Nr. 17-518Z
Biotin (für Inkubationsmedium)	Sigma-Aldrich, Bestell-Nr. B4639

Tabelle 5: Supplemente

Alle Medien wurden nach dem Ansetzen bei 4°C gelagert. Nur die benötigten Mengen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

2.2.3 Zellzahl und Zelldichte

Vor dem Versuch wurde eine Kulturflasche (Falcon Cell Culture Flask, REF: 353136) mit 20 ml Medium befüllt und im Brutschrank vorgewärmt. Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und unter Sichtkontrolle im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 9 ml Wachstumsmedium überführt und für 10 min bei

300g zentrifugiert. Der Überstand über dem dabei gebildeten Zellpellet wurde verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zelldichte wurde mit einem C-Chip (NanoEnTek, DHC-N01) bestimmt. Mithilfe von Trypanblau konnte die Zellzahl in 0,1 µl Zellsuspension in zwei separaten Zählkammern unter einem Lichtmikroskop (Leica DMIL) ausgezählt werden. Trypanblau reichert sich in abgestorbenen Zellen an, gesunde Zellen bleiben farblos. Über die Verdünnung mit Trypanblau kann die Zellzahl auf 1 ml Zellsuspension umgerechnet und über den Mittelwert aus beiden Zählkammern errechnet werden. Anschließend wurde ein Volumen der Zellsuspension entsprechend 675.000 Zellen für die Spender 1 bis 4 bzw. 375.000 Zellen bei Spender Nr. 5 in die vorbereitete Kulturflasche überführt.

2.2.4 Zellkultivierung

Die Zellen wurden im Brutschrank unter konstanten Bedingungen mit 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90%, die lichtmikroskopisch kontrolliert wurde, wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurden die Zellen mit einem Detach Kit (PromoCell, C-41210), bestehend aus 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure gepufferter *balanced salt solution* (HEPES BSS), Trypsin/EDTA Lösung und Trypsin Neutralisierungslösung, aus der Kulturflasche gelöst. Die dabei entstandene Zellsuspension wurde für 3 min bei 220g zentrifugiert. Der Überstand vom Zellpellet wurde entfernt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellzählung wurde, wie im vorigen Kapitel beschrieben, erneut durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in vier *Wells* einer sechs *Well*-Platte, also einer Mikrotiterplatte mit sechs gleichartigen Vertiefungen, (Greiner Bio-One; Cellstar; Katalognr.: 657-160) zu je 150.000 Zellen pro *Well* ausgesät. Die *Wells* wurden dabei mit Wachstumsmedium auf insgesamt 2 ml Volumen aufgefüllt. Das Wachstumsmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert.

Nach Erreichen einer Konfluenz von nahezu 100% wurde die Differenzierung der Zellen gestartet. Dazu wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch 2 ml Differenzierungsmedium pro *Well* ersetzt. Der Mediumwechsel bezeichnet Tag 1. Nach genau 72 Stunden wurde das Differenzierungsmedium entfernt und durch Nutritionmedium ersetzt. Alle zwei bis drei Tage wurde dieses erneuert. Der Differenzierungsprozess zu Adipozyten, der an einem immer stärkeren Anreichern von

Lipidtröpfchen in den Zellen erkennbar war, war an Tag 14 abgeschlossen und die Zellen konnten stimuliert werden.

2.2.5 Stimulation der Zellen mit Afamin und Insulin

Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml Inkubationsmedium gewaschen und anschließend für vier Stunden mit 1 ml Inkubationsmedium inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde entfernt. Die Zellen wurden nach Abb. 4 mit je 1 ml Lösung stimuliert.

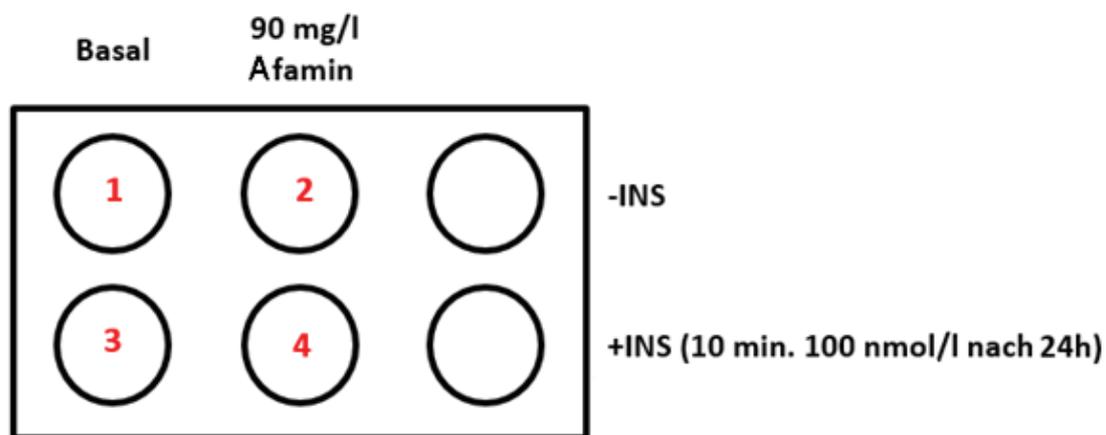


Abb. 4: Schematische Darstellung einer 6-Well-Platte

Über der Zeichnung ist angegeben, wie die Zellen in den *Wells* darunter stimuliert worden sind. Rechts ist angegeben, ob die Zellen in den davon links stehenden *Wells* einen Insulinstimulus erhalten haben.

INS: Insulinstimulus; l: Liter; min: Minuten; mg: Milligramm; nmol: Nanomol

Afamin wurde als Sonderanfertigung (biotechnie, CUST0I701) geliefert. Afamin wurde in *Human Embryonic Kidney-293*-Zellen, einer Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, exprimiert. Es war in PBS gelöst. Da 286 μ l der Afamin-Lösung für 1 ml Stimulationslösung einer Konzentration von 90 mg/l Afamin benötigt wurden, wurde die basale Lösung mit 286 μ l PBS und 714 μ l Inkubationsmedium angesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden stimuliert. Bei den Zellen in *Well* 3 und 4 wurde, um die Insulinsignalkaskade zu aktivieren und den Einfluss von Afamin auf ebendiese bestimmen zu können, ein Insulinstimulus durchgeführt. Dazu wurde nach der Inkubation in *Well* 3 und 4 10 μ l Insulinlösung mit einer Konzentration von 10 μ mol/l hinzugegeben und die Platte für weitere 10 min inkubiert. *Well* 1 und 2 wurden ohne Zugabe von Insulin ebenfalls für weitere 10 min inkubiert.

2.2.6 Abernten der Zellen

Alle folgenden Arbeiten wurden auf Eis oder bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Zusammensetzung des benötigten Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Puffers ist in Tabelle 6 dargestellt.

Zusammensetzung	Lieferant
NaCl 150 mmol/l	Roth, Artikel-Nr. 3957.3
NP-40 1%	Abcam, ab142227
Na-DOC 0,5%	Roth, Artikel-Nr. 3484.1
SDS 0,1%	Merck, 428029-1EA
TRIS pH 8,0 50 mmol/l	Roth, Artikel-Nr. AE15.1

Tabelle 6: RIPA Puffer

Alle Substanzen wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

NaCl: Natriumchlorid; Na-DOC: Desoxycholsäure Natriumsalz NP-40: 4-Nonylphenyl-poly(ethylene glycol); SDS: Natriumlaurylsulfat, TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Nach dem Insulinstimulus wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und auf Eis gestellt. Die Überstände wurden separat aus den *Wells* entnommen und 10 min bei 2250g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die trockenen Zellen wurden in der 6 *Well* Platte für mindestens einen Tag bei -80°C eingefroren. Die Überstände wurden aus der Zentrifuge entnommen. 800 µl je Überstand über dem Pellet wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Die mit Zellen behaftete 6 *Well* Platte wurde aus dem Tiefkühlschrank entnommen. Es wurde Lysepuffer mit 800 µl RIPA-Puffer, 100 µl complete Proteaseinhibitor (Roche, 04 693 124 001) und 100 µl PhosSTOP Phosphataseinhibitor (Roche, 04 906 845 001) angesetzt. Von dieser Lösung wurden je 100 µl pro *Well* auf die Zellen pipettiert, nachdem die Zellen angetaut waren. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber (Sarstedt, 83.1832) von der Platte abgelöst und mitsamt Lysepuffer aus den *Wells* entnommen. Anschließend wurden sie mit Ultraschall (Bandelin Sonopuls mini20, Dauer: 10 s, Intensität: 70%, Puls: 0,9 s, Pause: 1 s) behandelt, um die Zellmembran zu öffnen und für 60 min bei 4°C und 20.000g zentrifugiert. Dabei bildete sich am Boden des Gefäßes ein Pellet und oben eine Fettschicht. Es wurde jeweils 80 µl der wässrigen Lösung ohne Fettschicht entnommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.7 OLINK Multiplex-Assay

Die Messung von Biomarkern der Inflammation in den Zellkulturüberständen wurde von Olink Proteomics (Uppsala, Schweden) mittels Multiplex-Immunoassay durchgeführt. Dabei wurden im OLINK Inflammation Panel 92 verschiedene Biomarker der Inflammation gemessen. Nur die Überstände ohne Insulinstimulus wurden dazu verwendet. Die Messergebnisse wurden als Normalized Protein Expression (NPX) ausgegeben, einer Einheit, die auf dem \log_2 -Wert der Proteinkonzentrationen basiert.

Dieser Immunoassay basiert auf der Proximity Extension Assay Technologie, die einen Schritt beim Nachweis kombiniert, indem sie Oligonukleotid-markierte Antikörper, ein nahe abhängiges DNA Polymerisationsereignis und eine Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Vermehrung nutzt (Herder et al., 2018). Dabei bindet an jedes gemessene Protein ein Paar Oligonukleotid-markierter Antikörper und, falls sich die zwei Antikörper in der Nähe befinden, entsteht eine PCR-Zielsequenz durch ein naheabhängiges DNA-Polymerisationsereignis. Die resultierende DNA-Sequenz wird anschließend durch eine Standard Echtzeit PCR nachgewiesen und quantifiziert (Enroth et al., 2014).

Über alle 92 gemessenen Marker betragen die mittleren Intra-Assay und Inter-Assay Variationen 7% bzw. 18%.

In die Analyse wurden nur die Messwerte von Markern der Inflammation eingeschlossen, bei denen mindestens 40% der Messwerte über der Nachweisgrenze lagen. Bei allen so eingeschlossenen Markern wurden die Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze durch die jeweilige Nachweisgrenze ersetzt.

2.2.8 Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels Bichinonsäure (BCA)-Test

Der BCA-Test ist eine biochemische Methode, um die Proteinmenge in einer Lösung zu bestimmen. Dabei nutzt der Test das Prinzip, dass zweiwertige Kupferionen, die an Peptidbindungen binden, im alkalischen Milieu zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Diese können mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden, den man über Lichtabsorption in einem Mikroplattenleser messen kann. Dabei wird umso mehr

Farbkomplex gebildet, je mehr Protein in der Lösung ist. Zur Quantifizierung wird eine Eichkurve aus BSA mit bekannter Proteinmenge mitgeführt.

Für diese Arbeit wurde ein Farbreagenz aus 50 Teilen Reagenz A (ThermoFisher, 23228) und 1 Teil Reagenz B (ThermoFisher, 23224) verwendet. Die Lysate der Fettzellen wurden 1:2 in RIPA-Puffer verdünnt. Ein Gemisch von je 10 µl Lysat-Verdünnung und 200 µl Farbreagenz wurde für alle Proben in eine 96-Well Platte pipettiert und eine Standardreihe aus BSA und RIPA-Puffer wurde vorbereitet, von der ebenfalls je 10 µl mit 200 µl Farbreagenz auf die Platte pipettiert wurden. Die Platte wurde für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank ohne erhöhte Luftfeuchtigkeit (Heraeus Instruments; Typ B 290) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm Wellenlänge im Mikroplattenleser (Synergy 2; BioTek) gemessen.

2.2.9 Bestimmung der Aktivierung inflammatorischer und metabolischer Signalwege mittels Simple Western (Wes)

Beim klassischen Western-Blot wird ein Proteingemisch anhand der Proteingrößen in einem Polyacrylamid-Gel mithilfe eines elektrischen Feldes aufgeteilt. Dabei bilden die Proteine je nach Proteinmenge und -größe unterschiedlich große Banden. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran übertragen. Das Muster der Auftrennung bleibt dabei erhalten. Einzelne Proteine können mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Für diese Arbeit wurde kein klassischer Western-Blot verwendet. Die spezifischen Proteinmengen wurden mittels Wes (ProteinSimple) bestimmt. Die in Kombination mit dem Wes verwendeten Materialien können aus der Tabelle 7 entnommen werden. Der Wes ist ein Gerät, das die Aufteilung der Proteine nach Größe und anschließende Inkubation mit Primärantikörpern gegen das zu messende Protein in Kapillaren durchführt. Die Proteine müssen vorher denaturiert werden. Für die verschiedenen Messungen musste manuell eine für das Gerät spezifische Platte mit den Lysaten, spezifischen Erstantikörpern, daran bindenden mit HRP konjugierten Zweitantikörpern, Antikörper-Diluent, einem Luminol-Peroxid Gemisch als Chemolumineszenz, einer biotinylierten Proteinleiter und daran bindendem Streptavidin-HRP entsprechend der beiliegenden Anleitung vorbereitet werden. Die Zelllysate wurden dabei, je nach zu bestimmendem Zielprotein, mit Sample Buffer und

Mastermix auf eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration verdünnt. Die Mischungsverhältnisse wurden dazu auf der Basis der Gesamtproteinkonzentrationen in den jeweiligen Zelllysaten ermittelt. Die Platten enthielten bereits eine Separations-Matrix, eine Stapel-Matrix, einen Puffer für den Lauf und einen Puffer zur Entfernung der Matrizen.

Material	Hersteller, Produkt-Nr.
AntiBody-Diluent-2	ProteinSimple, 042-203
Kapillaren	ProteinSimple, SM-W004
Luminol-S	ProteinSimple, 043-311
Peroxide	ProteinSimple, 043-379
Platten	ProteinSimple, PS-PP03
Sample Buffer	ProteinSimple, 042-195
Standard-Pack	ProteinSimple, PS-ST01
Streptavidin-HRP	ProteinSimple, 042-414
Wasch Puffer	ProteinSimple, 042-202

Tabelle 7: Materialien des Wes

Die Separations-Matrix wurde in die einzelnen Kapillaren geladen, über die später die Proteine nach Größe aufgeteilt wurden. Die Stapel-Matrix wurde in die Kapillaren aufgenommen, um ein frühzeitiges Verteilen der Proteine zu verhindern. Die Lysate und die biotinylierte Proteinleiter wurden geladen und die Kapillaren wurden in den Puffer für den Lauf getaucht. Über eine elektrische Spannung wurden die Proteine in der Separations-Matrix nach ihrer Größe aufgeteilt. UV-Licht fixierte die Proteine an der Kapillarwand. Die Matrix wurde entfernt und der Erstantikörper wurde geladen. Die Proteine wurden für 90 min inkubiert. Die Kapillaren wurden gespült und der Zweitantikörper bzw das Streptavidin-HRP wurden aufgenommen. Diese wurden 30 min inkubiert. Anschließend wurde gespült und die Chemolumineszenz geladen. Die HRP, die mit dem Zweitantikörper bzw. dem Streptavidin konjugiert war, katalysierte eine Lichtreaktion in der Chemolumineszenz, die von einer Kamera aufgenommen wurde. Daraus ließ sich die im Lysat vorhandene relative Proteinmenge bzw. deren Phosphorylierungsgrad quantifizieren.

Die Proteine, die bestimmt wurden, können aus Tabelle 8 entnommen werden. Dabei musste der primäre Antikörper wie in der Tabelle angegeben in Antibody Diluent 2 verdünnt werden. Auch die geladene Gesamtproteinmenge lässt sich der Tabelle entnehmen. Nur die verschiedenen Proteinkinase B (Akt)-Messungen als Teile der Insulinsignalkaskade (Boucher et al., 2014) wurden in den insulinstimulierten und in den nicht-insulinstimulierten Proben durchgeführt. Die restlichen Messungen wurden nur in

den nicht-insulinstimulierten Proben vorgenommen. Als Sekundärantikörper wurde für alle Messungen ein Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziegen (ProteinSimple, 042-206) verwendet. Eine erfolgreiche Proteinauftrennung wurde in jedem Versuch durch die Auftrennung der mitgeführten Proteinleiter angezeigt.

Antigen	Hersteller, Produkt-Nr.	Verdünnung	Geladene Proteinmenge
pAktSer473	Cell Signalling, 9271	1:25	0,2 µg/µl
pAktThr308	Cell Signalling, 4056	1:25	0,2 µg/µl
totalAkt	Cell Signalling, 9272	1:25	0,2 µg/µl
pNFkB p65 (Ser536)	Cell Signalling, 3033	1:25	0,1 µg/µl
NFkB p65	Cell Signalling, 4765	1:50	0,1 µg/µl
p-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signalling, 4377	1:50	0,2 µg/µl
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signalling, 4695	1:50	0,2 µg/µl
p-p38 MAPK	Cell Signalling, 4511	1:25	0,2 µg/µl
p38 MAPK	Cell Signalling, 9212	1:50	0,2 µg/µl

Tabelle 8: primäre Antikörper

Akt: Proteinkinase B; ERK: extrazellulärsignal regulierte Kinase; NFkB: nuklärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet; p38: p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen; p: phosphoryliert; Ser: Serin; Thr: Threonin

Die Messwerte wurden als Fläche unter der Kurve mit der Software Compass (ProteinSimple) bestimmt. Diese trägt in einem Graph die Chemilumineszenz über dem Proteingewicht auf. Dabei entsteht eine Kurve mit einem Maximum bei dem spezifischen Gewicht des untersuchten Proteins. Die Fläche unter dieser Kurve ist dann ein Maß für die enthaltene Proteinmenge. Diese wird von der Software ermittelt. Wie diese Kurven dann im Einzelnen aussehen, ist beispielhaft in Abb. 5 dargestellt.

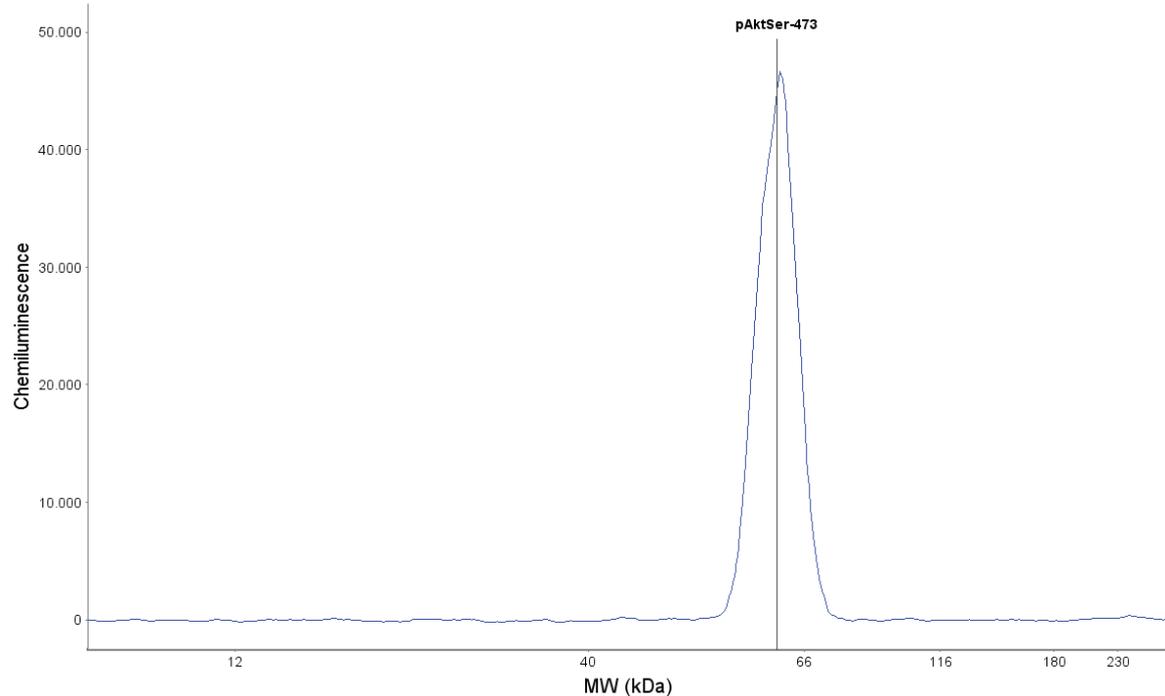


Abb. 5: Chemilumineszenzmessung im Wes

Dargestellt ist die Messkurve der Chemilumineszenz für die pAktSer Messung mit einem Maximum der Kurve bei ca. 60kDa. Die Fläche unter der Kurve stellt ein Maß für die gemessene Proteingesamtmenge dar. kDa: Kilodalton; pAktSer: an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B

2.3 KORA – Studie

Die KORA-Studie wurde an anderer Stelle bereits beschrieben (Rathmann et al., 2009; Rathmann et al., 2003; Rathmann et al., 2010; Herder et al., 2013b; Herder et al., 2015; Herder et al., 2018; Holle et al., 2005). Im Folgenden sollen nur die für diese Arbeit relevanten Aspekte dargestellt werden.

2.3.1 Studiendesign und Population

Der nicht-experimentelle Teil dieser Arbeit basiert auf Daten von Probanden der Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg F4 (KORA F4). Ziel der KORA Studie war die Bestimmung der Prävalenz und Inzidenz verschiedener chronischer Krankheiten wie Diabetes in der Allgemeinbevölkerung und Identifikation neuer Risikofaktoren für diese Erkrankung (Herder et al., 2013b). Dabei handelt es sich um eine Fortsetzung und Erweiterung der MONICA-Projekts (*Monitoring Trends and*

Determinants in Cardiovascular Disease) der WHO (Holle et al., 2005). Die KORA-Studie ist in mehrere Teilstudien unterteilt, die sich unter anderem in verschiedenen Studienteilnehmern und Untersuchungszeiträumen unterscheiden (Holle et al., 2005). Bei der KORA F4 Studie (2006-2008) handelt es sich um die Nachfolgeuntersuchung der KORA S4 Studie (1999-2001).

Initial wurden 1999 in der KORA S4 Studie 2656 Probanden aus der Stadt Augsburg, 16 umliegenden Städten und 70 Gemeinden mit insgesamt 600.000 Einwohnern im Alter von 55 bis 74 Jahren rekrutiert. Dazu wurden die Gebiete durch Clusterauswahl ausgewählt und die Probanden durch ein geschichtetes Zufallsstichprobenverfahren ermittelt (Holle et al., 2005). Von diesen 2656 Probanden haben 1653 an der Studie teilgenommen. (Rathmann et al., 2003). Dabei wurden basale Informationen über den soziodemographischen Status, Risikofaktoren (Rauchen, Alkoholkonsum, physische Aktivität, etc.), Krankengeschichte, chronische Krankheiten in der Familie, Medikamentenanamnese und weiteres von geschultem medizinischem Personal in persönlichen Interviews erhoben. Außerdem wurde eine standardisierte körperliche Untersuchung inklusive Blutdruckmessung und anthropometrischer Messungen durchgeführt (Holle et al., 2005). Zusätzlich wurde ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT), sofern kein Diabetes diagnostiziert war, durchgeführt (Herder et al., 2013b) und eine Blutprobe entnommen (Rathmann et al., 2009).

Von 2006-2008 wurden die Probanden der KORA S4 Studie in der KORA F4 Studie erneut, inklusive zweitem OGTT, sofern kein Diabetes diagnostiziert war, untersucht. An dieser Studie nahmen insgesamt 1209 Probanden teil (Herder et al., 2013b). Isoliert betrachtet handelt es sich bei der KORA F4 Studie um eine Querschnittsstudie.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Bayerischen Landesärztekammer genehmigt (Ethik-Kommission Nr. 06068) und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studie und hatten die Möglichkeit, ihr Einverständnis auf bestimmte Prozeduren zu beschränken, so konnten sie zum Beispiel die Aufbewahrung von biologischem Material verweigern (Holle et al., 2005).

Für diese Arbeit wurden die Probanden ausgewählt, bei denen Daten zum OLINK Inflammation Panel vorhanden waren, insgesamt 1115 Probanden. Darüber hinaus mussten folgende Daten vollständig vorliegen:

- Afamin im Plasma
- Alter zum Stichtag (01.07.2007)
- Geschlecht
- Body Mass Index

Außerdem wurden Probanden mit bekanntem T1D, bekanntem Medikamenten-induziertem Diabetes oder unklaren Ergebnissen im OGTT (wegen fehlender OGTT Informationen oder nicht validierbar) ausgeschlossen. Danach verblieben 1082 Probanden zur weiteren Analyse.

2.3.2 OLINK Inflammation Panel

Die Marker der subklinischen Inflammation wurden mittels OLINK Inflammation Multiplex-Immunoassay (siehe Kapitel 2.2.7) im Nüchtern-Serum gemessen, das insgesamt 92 Marker der Inflammation bestimmt (Herder et al., 2018). Dazu wurden den Probanden Blut ohne Stauung nach Fasten über Nacht entnommen (Rathmann et al., 2009). Die vollständige Auflistung der 92 Marker lässt sich im Anhang der Tabelle 13 entnehmen. Folgende Biomarker wurden aufgrund fehlender Daten bzw. Daten unter der Nachweisgrenze (> 25%) ausgeschlossen:

- Artemin
- Interferon-gamma
- Interleukin-2
- Interleukin-2 Rezeptoruntereinheit beta
- Interleukin-4
- Interleukin-5
- Interleukin-10 Rezeptoruntereinheit alpha
- Interleukin-13
- Interleukin-17A
- Interleukin-20
- Interleukin-20 Rezeptoruntereinheit alpha
- Interleukin-22 Rezeptoruntereinheit alpha-1
- Interleukin-24
- Interleukin-33
- Leukämiehemmender Faktor
- Neurturin
- *T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain*
- *Thymic stromal lymphopoietin*
- Tumornekrosefaktor-alpha

Außerdem wurde Caspase-8 von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da der Inter-Assay Coefficient of Variation (CV) über 20% lag. Der Inter-Assay CV ist dabei ein Maß für den Unterschied der Ergebnisse verschiedener Messungen. Beschreibt man den Unterschied der Ergebnisse in einer Messung, wird das Maß dafür als Intra-Assay CV bezeichnet (Rodbard, 1974). Die Berechnung der Intra- und Inter-Assay CVs beruht dabei auf der Messung dreier Kontrollseren, die jeweils in Doppelbestimmung auf jeder Platte mitbestimmt wurden (Herder et al., 2018). Damit verblieben 72 Marker der Inflammation zur weiteren Analyse.

2.3.3 Störfaktoren

In der KORA F4 Studie wurden Störfaktoren, die einen Einfluss auf die Assoziation zwischen Afaminplasmakonzentration und Serumkonzentration von Biomarkern der subklinischen Inflammation haben können, bestimmt. Dabei wurden im Wesentlichen Eigenschaften ausgewählt, die metabolische und immunologische Faktoren beeinflussen. Diese wurden *a priori* so ausgewählt, dass für alle untersuchten Biomarker der Inflammation das gleiche Modell zur Adjustierung angewandt werden konnte.

2.3.3.1 Interview

Die Interviews wurden auf Basis standardisierter Protokolle durchgeführt. Dabei wurde unter anderem Alter und Geschlecht des Probanden erfasst. Lebensstil-Faktoren, die erfragt wurden, waren unter anderem die sportliche Aktivität, definiert als einmal pro Woche über eine Stunde Sport, der Raucherstatus und der Alkoholkonsum. In der Krankengeschichte wurde ermittelt, ob die Probanden an hohem Bluthochdruck litten bzw. Medikamente dagegen einnahmen, nach bisherigen Myokardinfarkten und Diabetes wurde gefragt, der beim Bejahen durch Nachfragen beim Hausarzt validiert wurde. Außerdem wurde die Medikamentenanamnese unter anderem für nichtsteroidale Antiphlogistika (ohne Acetylsalicylsäure) durchgeführt (Rathmann et al., 2003; Rathmann et al., 2009).

2.3.3.2 Anthropometrische Variablen

Größe und Gewicht wurden in leichter Kleidung der Probanden durch geschultes Personal ermittelt. Dabei wurde das Gewicht auf 0,1 kg und die Größe auf 0,5 cm genau bestimmt. Der Blutdruck wurde im Sitzen nach 15-minütiger Ruhephase am rechten Arm mit Hilfe eines automatischen Messgeräts bestimmt. Bluthochdruck war dabei als Blutdruck über 140 mmHg systolisch oder über 90 mmHg diastolisch ohne gleichzeitige Einnahme antihypertensiver Medikation festgelegt (Rathmann et al., 2003; Rathmann et al., 2009).

2.3.3.3 OGTT

Bei Probanden, die keinen Diabetes in der Anamnese angaben, wurde ein OGTT durchgeführt. Dazu mussten die Patienten über Nacht fasten (≥ 8 Stunden), es wurde eine erste Blutprobe aus einer ungestauten Vene entnommen und die Probanden mussten oral 75 g Glukose in wässriger Lösung aufnehmen. Nach zwei Stunden wurde eine zweite Blutprobe entnommen. Die Serumglukosespiegel wurden anschließend im Zentrallabor der Uniklinik Augsburg mittels Hexokinasemethode bestimmt (Herder et al., 2015).

2.3.3.4 Labormessungen

Das Blut wurde wie oben beschrieben entnommen, gekühlt (4-8°C) ins Labor der Uniklinik Augsburg transportiert und dort innerhalb von maximal 6 Stunden nach Entnahme analysiert. Gesamtcholesterin wurde mittels Boehringer Cholesterinoxidase-Phenol-4-Aminophenazon Methode gemessen. HbA1C wurde mittels turbidimetrischem immunologischem Prüfverfahren bestimmt. Die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) wurde mittels *Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration*-Formel aus dem Serumkreatinin berechnet (Rathmann et al., 2003; Rathmann et al., 2009).

2.4 Statistische Auswertungen

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism (Version 7) verwendet. Als Grundlage dienten dazu meist die *fold changes* der Werte aus den einzelnen Messungen. Diese berechnen sich wie folgt:

Gemessener Wert / Mittelwert der dazugehörigen Basalwerte

Anschließend wurden die fold changes aus dem jeweiligen Messwert der Stimulation zum jeweiligen Messwert der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Die OLINK Daten aus den Zellkulturüberständen wurden vor der Bestimmung der *fold changes* entlogarithmiert. Dazu wurde der von OLINK ausgegebene Messwert wie folgt umgewandelt:

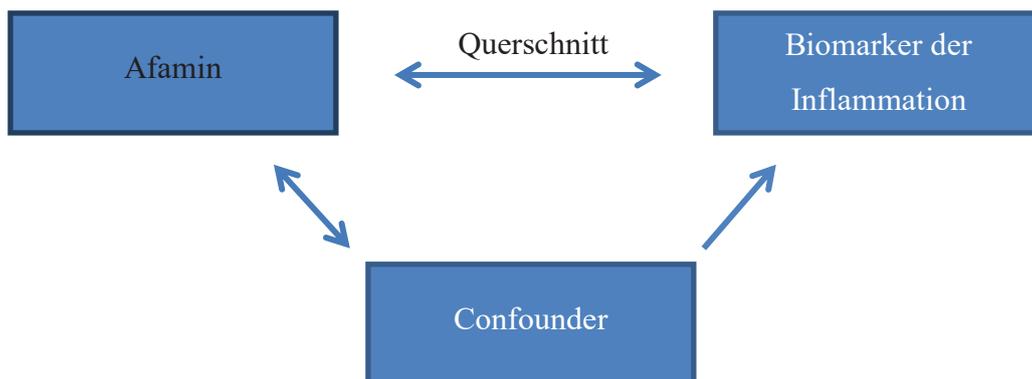
$$\text{Relative Proteinkonzentration} = 2^{\text{NPX}}$$

Für den HepaRG Versuch wurden die Unterschiede mittels Analysis of Variance (ANOVA) mit anschließender Korrektur für multiples Testen nach Benjamini und Hochberg ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden hierbei anhand des q-Wertes bestimmt, der einen für multiples Testen korrigierten p-Wert darstellt. Bei den Versuchen mit Adipozyten wurden gepaarte T-Tests angewandt.

Die Korrelation von Afamin mit verschiedenen Biomarkern der Inflammation wurde mittels multipler linearer Regression ermittelt und dabei für folgende Confounder adjustiert:

- Geschlecht, Alter, BMI, HbA1C, Glukosetoleranz Status, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, eGFR, Bluthochdruck, Myokardinfarktanamnese, nichtsteroidale Antiphlogistika in Medikamentenanamnese, sportliche Aktivität, Raucherstatus, Alkoholkonsum

Dafür wurde das Modell aus Abb. 6 angewandt:



$$\text{Afamin} = \alpha + \beta_1 * \text{Biomarker} + \beta_2 * \text{Alter} + \beta_3 * \text{Geschlecht} + \dots$$

Abb. 6: Adjustierung für Störfaktoren

Dabei wurde Afamin im Plasma als abhängige Variable und der jeweilige Marker der Inflammation als unabhängige Variable definiert. Die NPX-Werte der OLINK-Daten wurden für diese Analyse wegen einer besseren Normalverteilung nicht umgewandelt. Der Regressionskoeffizient β_1 , der im Folgenden der Einfachheit halber nur als β bezeichnet wird, gibt dabei den Anstieg der Afamin-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom NPX-Wert des jeweiligen Biomarkers der Inflammation an. Das Beta kann dabei, je nach positiver oder negativer Korrelation, positive oder negative Werte annehmen. Ob eine statistisch signifikante Korrelation vorliegt wird dabei über den p-Wert ermittelt. Die Signifikanz wurde definiert als p-Wert $< 0,05$ (*).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von metabolischen und inflammatorischen Faktoren auf die Afaminsekretion

Nach 7 Tagen in Kultur wurden die HepaRG Zellen stimuliert. Unter dem Mikroskop stellten sie sich dann wie in Abb. 7 beispielhaft aufgeführt dar.

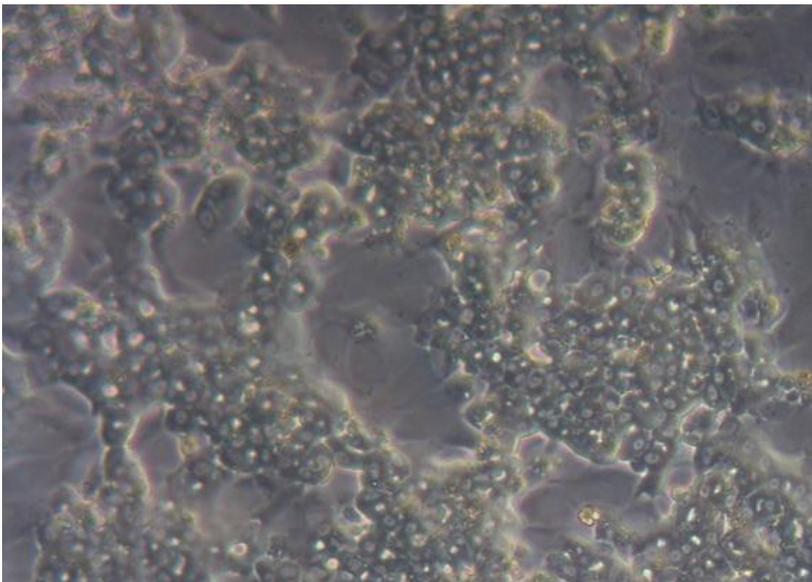


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme von HepaRG Zellen

HepaRG Zellen nach 7 Tagen in Zellkultur; dargestellt sind Zellen aus Kapitel 2.1.6 vor Wechsel auf Inkubationsmedium und Stimulation. Vergrößerung: 100fach

Um den Einfluss inflammatorischer Faktoren auf die Afaminsekretion zu ermitteln, wurden in fünf unabhängigen Versuchen HepaRG Zellen mit verschiedenen inflammatorischen Mediatoren (IL-6, TNF α und IL-1 β) stimuliert. Als Vergleich dienten die zugehörigen, unstimulierten Zellen. Als Ausgangswert für die Berechnung eines signifikanten Unterschiedes der Afaminkonzentration im Zellkulturüberstand der jeweiligen stimulierten bzw. nicht-stimulierten HepaRG Zellen dienten deren *fold changes*, die wie in Kapitel 2.4 beschrieben berechnet wurden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Afaminkonzentration im Zellkulturüberstand um 36% bei Stimulation mit IL-6 ($q = 0,015$), um 44% bei Stimulation mit TNF α ($q = 0,0011$) und um 52% bei Stimulation mit IL-1 β ($q = 0,0003$) (siehe Abb. 8).

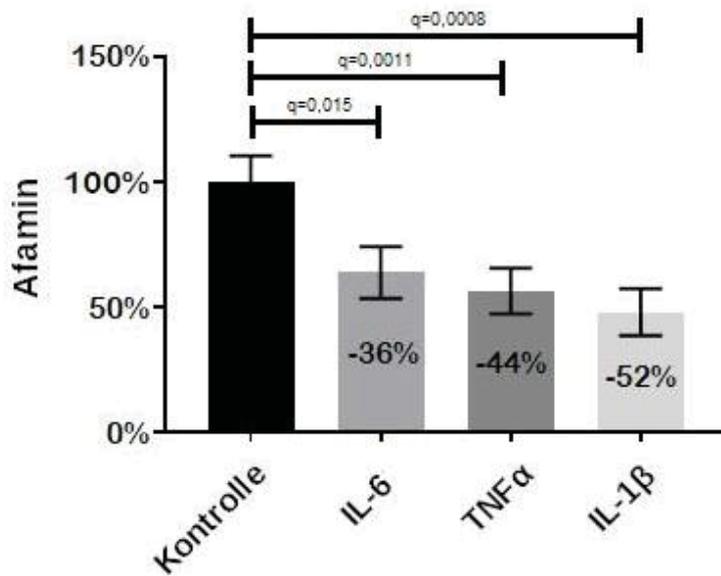


Abb. 8: Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren auf die Afaminexpression in HepaRG Zellen

Die Abbildung zeigt die Afaminkonzentrationen in den Überständen der inflammatorisch stimulierten HepaRG Zellen. Kontrollen wurden im Mittel auf 100% gesetzt, wobei 100% einer Afaminkonzentration von 5049 pg/ml entspricht. Diese wurden für jeweils 24 Stunden stimuliert. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt (n=5). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. In den Balken ist die prozentuale Reduktion der Afaminkonzentration im Vergleich zum Basalwert angegeben. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mittels ANOVA mit anschließender Korrektur für multiples Testen mittels Falscherkennungsrate nach Benjamini und Hochberg durchgeführt.

IL: Interleukin; TNF: Tumornekrosefaktor

Neben den proinflammatorischen Mediatoren wurde auch der Einfluss eines antiinflammatorischen Mediators, dem Adiponektin, auf die Afaminexpression aus HepaRG Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen in vier unabhängigen Versuchen mit Adiponektin stimuliert. Als Vergleich dienten die zugehörigen, unstimulierten Zellen. Die Berechnung eines signifikanten Unterschieds erfolgte über die *fold changes* mittels T-Tests. Es zeigte sich eine Reduktion der Afaminkonzentration im Zellkulturüberstand um 6% bei Stimulation mit Adiponektin, die allerdings nicht statistisch signifikant war ($p = 0,1191$) (siehe Abb. 9).

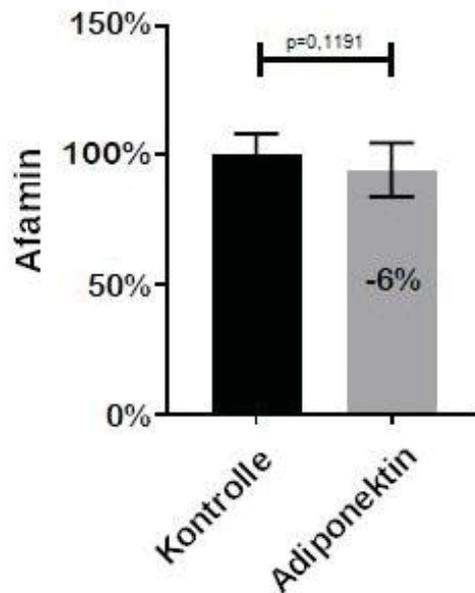


Abb. 9: Einfluss von Adiponektin auf die Afaminexpression in HepaRG Zellen

Die Abbildung zeigt die Afaminkonzentrationen in den Überständen der mit Adiponektin stimulierten HepaRG Zellen. Kontrollen wurden im Mittel auf 100% gesetzt, wobei 100% einer Afaminkonzentration von 3544 pg/ml entspricht. Diese wurden für jeweils 24 Stunden stimuliert. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt (n=4). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. In den Balken ist die prozentuale Reduktion der Afaminkonzentration im Vergleich zum Basalwert angegeben. Der Vergleich zwischen beiden Gruppen wurde mittels T-Test durchgeführt.

Um den Einfluss metabolischer Faktoren auf die Afaminexpression zu ermitteln, wurden in sechs unabhängigen Versuchen HepaRG Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Insulin stimuliert. Dabei wurden Insulin-Konzentrationen von 10 μ U/ml bis 14400 μ U/ml verwendet. Als Vergleich dienten die zugehörigen, unstimulierten Zellen. Die Berechnung eines signifikanten Unterschieds erfolgte über die *fold changes* mittels ANOVA. Dabei zeigte sich nur bei der höchsten, zur Stimulation verwendeten Insulinkonzentration (14400 μ U/ml) eine signifikante Veränderung der Afaminkonzentration im Zellkulturüberstand ($q = 0,0381$). Diese war im Vergleich zu den unstimulierten Zellen im Mittel um 13% größer. Bei Stimulation mit allen anderen verwendeten Insulinkonzentrationen kam es zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Afaminkonzentration im Zellkulturüberstand (siehe Abb. 10).

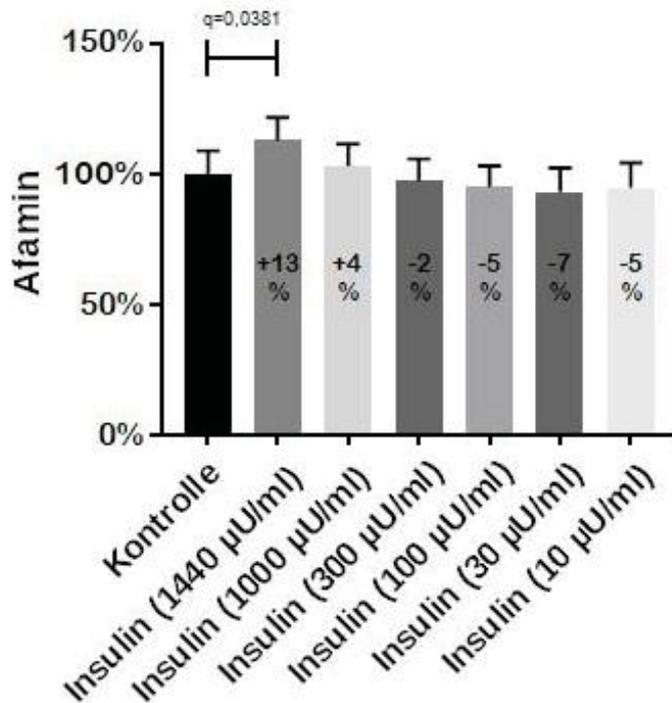


Abb. 10: Einfluss von Insulin auf die Afaminexpression in HepaRG Zellen

Die Abbildung zeigt die Afaminkonzentrationen in den Überständen der mit Insulin stimulierten HepaRG Zellen. Kontrollen wurden im Mittel auf 100% gesetzt, wobei 100% einer Afaminkonzentration von 6523 pg/ml entspricht. Diese wurden für jeweils 24 Stunden stimuliert. Es wurden sechs unabhängige Versuche durchgeführt (n=6). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. In den Balken ist die prozentuale Reduktion der Afaminkonzentration im Vergleich zum Basalwert angegeben. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mittels ANOVA mit anschließender Korrektur für multiples Testen mittels Falscherkennungsrate nach Benjamini und Hochberg durchgeführt.
 µU: Mikrounits; ml: Milliliter

Neben Insulin als metabolischem Faktor wurde auch der Einfluss von Glukose auf die Afaminexpression aus HepaRG Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen in elf unabhängigen Versuchen mit Glukose (25 mmol/l) stimuliert. Als Vergleich dienten die zugehörigen, unstimulierten Zellen. Die Auswertung erfolgte über die *fold changes* mittels T-Test. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Afaminkonzentration im Zellkulturüberstand um 7% bei Stimulation mit Glukose ($p = 0,007$) (siehe Abb. 11).

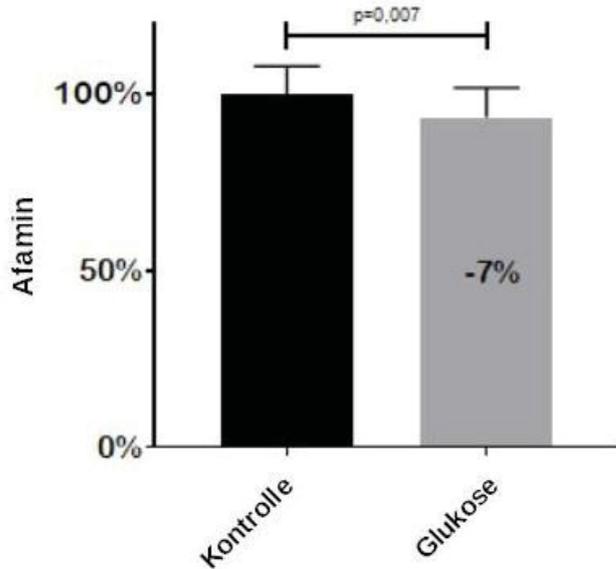


Abb. 11: Einfluss von Glukose auf die Afaminexpression in HepaRG Zellen

Die Abbildung zeigt die Afaminkonzentrationen in den Überständen der mit Glukose stimulierten HepaRG Zellen. Kontrollen wurden im Mittel auf 100% gesetzt, wobei 100% einer Afaminkonzentration von 5778 pg/ml entspricht. Diese wurden für jeweils 24 Stunden stimuliert. Es wurden elf unabhängige Versuche durchgeführt (n=11). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. In den Balken ist die prozentuale Reduktion der Afaminkonzentration im Vergleich zum Basalwert angegeben. Der Vergleich zwischen beiden Gruppen wurde mittels T-Test durchgeführt.

Um einen potenziell zytotoxischen Einfluss der untersuchten inflammatorischen und metabolischen Faktoren auf HepaRG Zellen zu ermitteln, wurden in drei unabhängigen Versuchen HepaRG Zellen mit den untersuchten Faktoren für jeweils 24 Stunden stimuliert. Die Zytotoxizität wurde mit dem WST-8-Test bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den stimulierten und unstimulierten Zellen (siehe Abb. 12).

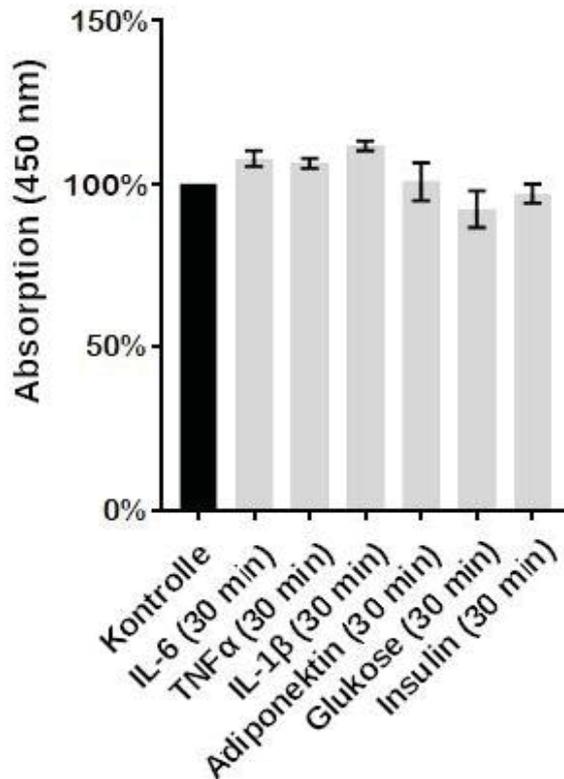


Abb. 12: Einfluss der untersuchten inflammatorischen und metabolischen Faktoren auf die Viabilität von HepaRG Zellen

Die Abbildung zeigt die Lichtabsorption bei 450 nm in den Überständen der inflammatorisch und metabolisch stimulierten HepaRG Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CCVK-I Lösung, die WST-8 enthält. Kontrollen wurden im Mittel auf 100% gesetzt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Diese sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. In den Balken ist die prozentuale Reduktion der Afaminkonzentration im Vergleich zum Basalwert angegeben. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mittels ANOVA mit anschließender Korrektur für multiples Testen mittels Falscherkennungsrate nach Benjamini und Hochberg durchgeführt

IL: Interleukin; min: Minuten; nm: Nanometer; TNF: Tumornekrosefaktor

3.2 Einfluss von Afamin auf Inflammation und Metabolismus humaner Adipozyten

Humane Präadipozyten von fünf verschiedenen Spendern wurden kultiviert und über 14 Tage zu Adipozyten differenziert. Die Differenzierung war dabei erkennbar an einer zunehmenden Anreicherung von Lipidtröpfchen, wie in Abb. 13 beispielhaft dargestellt.

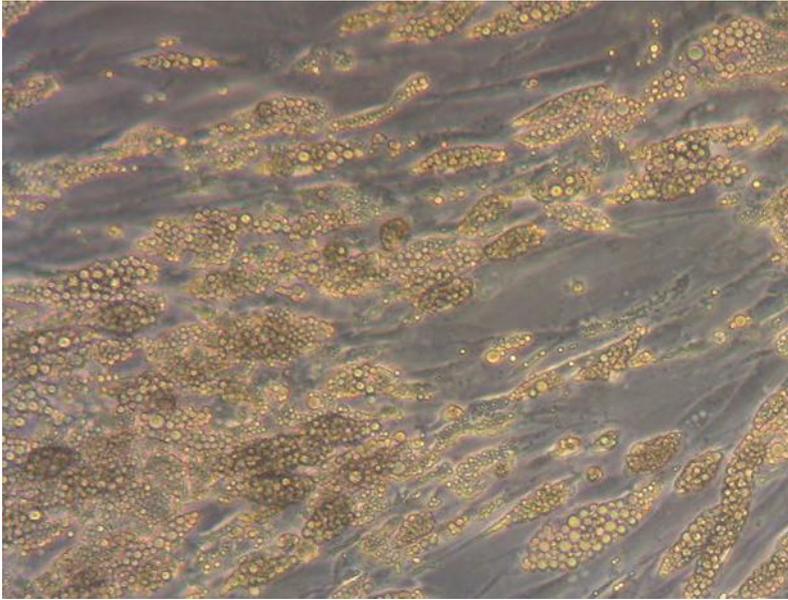


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahme von differenzierten Adipozyten

Die Abbildung zeigt differenzierte Adipozyten vor Stimulation mit Afamin. Gelblich stellen sich Lipidtröpfchen dar. Vergrößerung: 100fach

Um den Einfluss von Afamin auf Inflammation und Metabolismus in humanen Adipozyten zu untersuchen, wurden die Adipozyten im Anschluss an die abgeschlossene Differenzierung für 24 Stunden mit 90 mg/l Afamin behandelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Adipozyten. Um den Einfluss von Afamin auf metabolische Signalwege in An- und Abwesenheit von Insulin in humanen Adipozyten zu untersuchen, wurden pro Spender nach 24 Stunden Afaminstimulation zusätzlich ein 10-minütiger Insulinstimulus für jeweils eine Zellgruppe, die mit Afamin stimuliert wurde, und für eine Kontrollgruppe ohne Afaminbehandlung durchgeführt. Pro Spender wurden so insgesamt vier verschiedene Ansätze verfolgt wurden: Einmal wurden Zellen nicht mit Afamin stimuliert, einmal wurden Zellen nicht mit Afamin, aber anschließend mit Insulin stimuliert, einmal wurden Zellen mit Afamin stimuliert und einmal wurden Zellen mit Afamin und anschließend mit Insulin stimuliert.

3.2.1 Einfluss von Afamin auf inflammatorische und metabolische Signalwege in humanen Adipozyten

Die Lysate der oben beschriebenen humanen Adipozyten wurden auf Schlüsselproteine inflammatorischer und metabolischer Signalwege untersucht. Dazu wurden Western Blots mit den Lysaten der Adipozyten durchgeführt. Um festzustellen, welchen Einfluss Afamin

auf die untersuchten Signalwege hat, wurde die Aktivität verschiedener Schlüsselproteine der Signalwege untersucht. Als Maß der Aktivierung wurde der Quotient aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein bestimmt. Abb. 14 zeigt beispielhaft einen der durchgeführten Western Blots. Zu sehen sind dabei die Proteinbanden, die sich bei der Untersuchung der Lysate auf Akt des Zellkulturversuchs von einem Spender gebildet haben. Es wurden die Gesamtmenge von Akt und an Threonin der Position 308 phosphoryliertes Akt gemessen. Diese führen zu einer Bandenbildung bei einer Proteingröße um die 60 kDa.

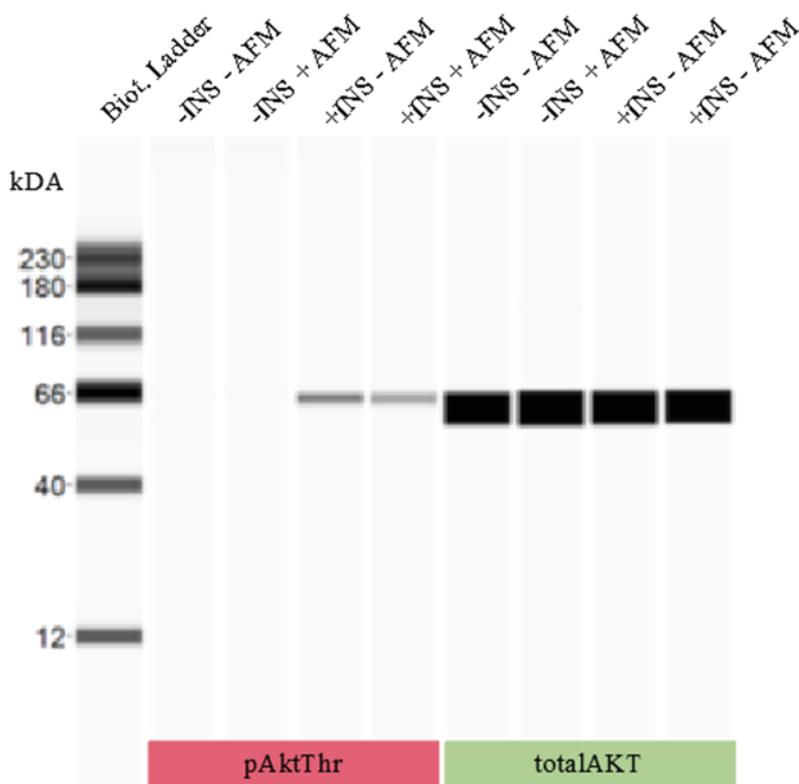


Abb. 14: Exemplarische Darstellung eines Western Blots mit Lysaten der Adipozyten

Die Abbildung zeigt die Proteinauftrennung im Wes aus den Lysaten der Adipozyten eines Spenders. Die Darstellung wurde aus der in Kapillaren gemessenen Chemolumineszenz abgeleitet. Im roten und grünen Feld sind die Primärantikörper angegeben, die in den jeweiligen Bahnen verwendet wurden. Über den Banden steht, nach welchem Schema die Zellen des Laufs ursprünglich stimuliert worden sind.

AFM: Afamin; Biot.Ladder: Biotinylated Ladder; INS: Insulinstimulus; pAktThr: an Threonin 308 phosphorylierte Proteinkinase B; totalAkt: Gesamtmenge Proteinkinase B; +: Stimulation erfolgt; -: Stimulation nicht erfolgt

Zunächst werden die Ergebnisse des Einflusses von Afamin auf metabolische Schlüsselproteine aus den Zelllysaten der Adipozyten dargestellt. Dazu wurden Western Blots durchgeführt, um die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an der Aminosäure Serin der Position 473 bzw. der Aminosäure Threonin an Position 308 in den Zelllysaten der Adipozyten zu bestimmen. In Abwesenheit von Insulin zeigte sich eine

signifikante Erhöhung um 105,6% der Aktivierung Serin-Phosphorylierung von Akt in den afaminstimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ($p = 0,0002$). Nach Insulinstimulus ergab die Stimulation mit Afamin eine Erhöhung um 10,7% im Vergleich zu nicht afaminstimulierten Zellen, die allerdings nicht statistisch signifikant war ($p = 0,6811$) (siehe Abb. 15).

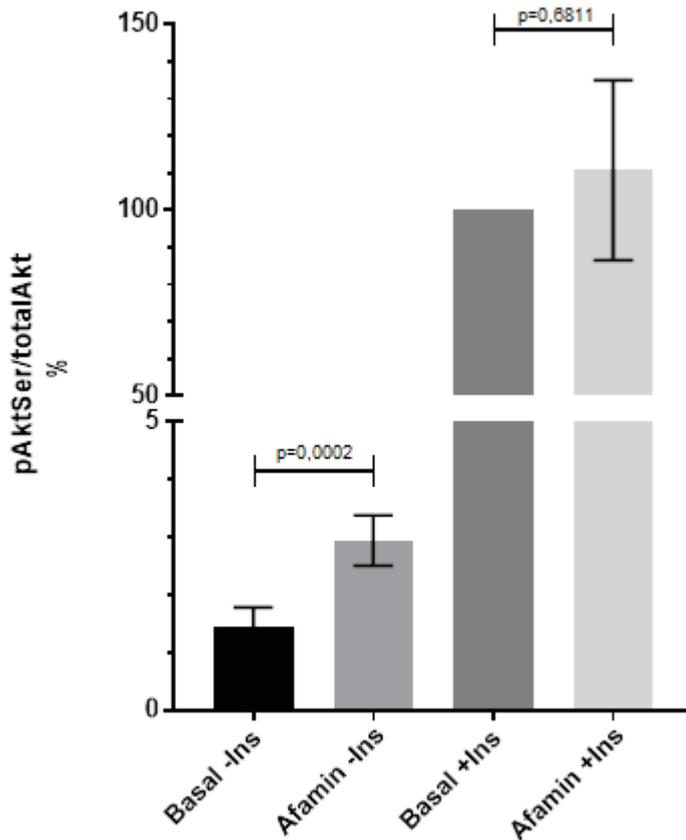


Abb. 15: Phosphorylierung von Akt Ser473 in Abhängigkeit von Afamin und Insulin in humanen Adipozyten

Die Abbildung zeigt die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an der Aminosäure Serin an der Position 473 in den Lysaten der Adipozyten. Die Aktivierung von Akt wurde anhand des Quotienten aus phosphoryliertem und Gesamt-Protein bestimmt. Die Aktivierung von Akt bei unstimulierten Adipozyten, die einen Insulinstimulus erhalten haben, wurde pro Spender auf 100% gesetzt. Die Aktivierung bei den anders stimulierten Zellen wurde pro Spender als prozentuale Abweichung davon bestimmt. Die Stimulation mit oder ohne Afamin erfolgte für 24 Stunden, der anschließende Afaminstimulus dauerte 10 min. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt ($n=5$). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. Der Vergleich von insulinstimulierten und unstimulierten Zellen wurde mittels T-Tests durchgeführt.

-Ins, nicht insulinstimuliert; +Ins, insulinstimuliert; pAktSer: an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B; totalAkt: Gesamtmenge Proteinkinase B

In Abwesenheit von Insulin zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Aktivierung von Akt durch Threonin-Phosphorylierung in den Lysaten von afaminstimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen ($p = 0,9840$). Die Stimulation mit Afamin und

Insulin ergab eine signifikante Reduktion der Aktivierung von Akt durch Threoninphosphorylierung um 21,5% ($p = 0,0254$) (siehe Abb. 16).

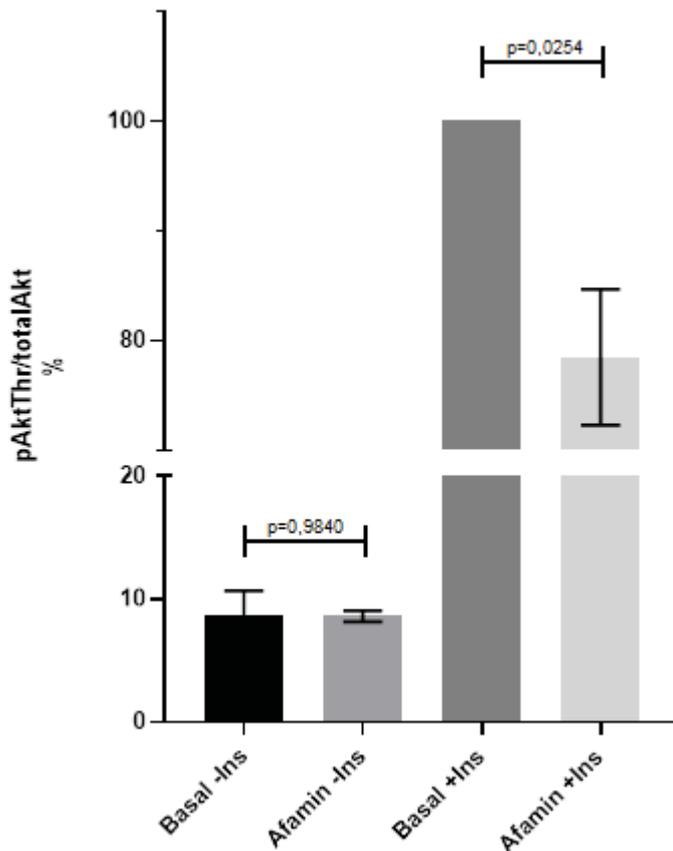


Abb. 16: Phosphorylierung von Akt Thr308 in Abhängigkeit von Afamin und Insulin in humanen Adipozyten

Die Abbildung zeigt die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin an der Position 308 in den Lysaten der Adipozyten. Die Aktivierung von Akt wurde anhand des Quotienten aus phosphoryliertem und Gesamt-Protein bestimmt. Die Aktivierung von Akt bei unstimulierten Adipozyten, die einen Insulinstimulus erhalten haben, wurde pro Spender auf 100% gesetzt. Die Aktivierung bei den anders stimulierten Zellen wurde pro Spender als prozentuale Abweichung davon bestimmt. Die Stimulation mit oder ohne Afamin erfolgte für 24 Stunden, der anschließende Insulinstimulus dauerte 10 min. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt ($n=5$). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. Der Vergleich von insulinstimulierten und unstimulierten Zellen wurde mittels T-Tests durchgeführt.

-Ins, nicht insulinstimuliert; +Ins, insulinstimuliert; pAktThr: an Threonin 308 phosphorylierte Proteinkinase B; totalAkt: Gesamtmenge Proteinkinase B

Weiterhin werden die Ergebnisse des Einflusses von Afamin auf inflammatorische Schlüsselproteine (ERK, NF κ B und p38) aus den Zelllysaten der Adipozyten dargestellt. Dazu wurden Western Blots durchgeführt, um die Aktivierung der einzelnen Proteine durch Phosphorylierung in den Zelllysaten der Adipozyten zu bestimmen. Es wurden nur die Ansätze ohne Insulinstimulus untersucht. Für die Aktivierung der untersuchten inflammatorischen Schlüsselproteine ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den

Lysaten der afaminstimulierten Adipozyten im Vergleich zu unstimulierten Adipozyten (alle $p > 0,05$) (siehe Abb. 17)

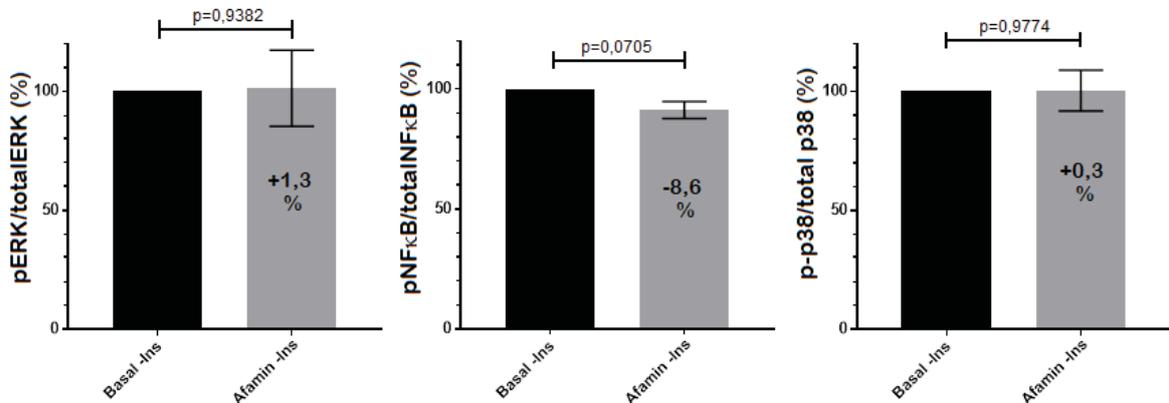


Abb. 17: Aktivierung inflammatorischer Schlüsselproteine in Abhängigkeit von Afamin in humanen Adipozyten

Die Abbildung zeigt die Aktivierung inflammatorischer Schlüsselproteine durch Phosphorylierung in den Lysaten der Adipozyten. Die Aktivierung von verschiedenen Proteinen wurde anhand des Quotienten aus phosphoryliertem und gesamt Protein bestimmt. Die Aktivierung des jeweiligen Proteins bei nicht afaminstimulierten Adipozyten wurde pro Spender auf 100% gesetzt. Die Aktivierung bei afaminstimulierten Zellen wurde pro Spender als prozentuale Abweichung davon bestimmt. Die Stimulation mit oder ohne Afamin erfolgte für 24 Stunden. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt ($n=5$). Diese wurden als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. Der Vergleich zwischen afaminstimulierten und unstimulierten Zellen wurde mittels T-Tests durchgeführt.

–Ins: nicht insulinstimuliert; ERK: Extrazellulärsignal regulierte Kinase; NFκB: nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet; p38: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; p: phosphoryliert

3.2.2 Einfluss von Afamin auf die Expression inflammatorischer Proteine in humanen Adipozyten

Die Zellkulturüberstände der afaminstimulierten Adipozyten ohne Insulinstimulus wurden mitsamt unstimulierter Kontrollen mit Proximity Extension Assay-Technologie auf 92 verschiedene Biomarker der Inflammation untersucht. Von den 92 gemessenen Biomarkern der Inflammation waren 36 nachweisbar (mindestens 40% der Messwerte über der Nachweisgrenze; dargestellt in Tabelle 9). Als Ausgangswert für die statistische Analyse der Konzentration der verschiedenen Marker im Zellkulturüberstand der jeweiligen stimulierten bzw. unstimulierten Adipozyten dienten deren *fold changes*, die wie in Kapitel 2.4 beschrieben berechnet wurden. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration von 25 Markern im Überstand der afaminstimulierten Zellen im Vergleich zum Überstand der unstimulierten Zellen. Zu den in ihrer Freisetzung gesteigerten Biomarkern gehörten vor allem Chemokine (CCL2, CCL8, CCL13, CXCL1,

CXCL5, CXCL6), Zytokine (IL-13, TWEAK), Wachstumsfaktoren (CSF-1, FGF-21, Flt3L, HGF, SCF, VEGF-A) und Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (CD40, OPG, TNFRSF9). Es zeigte sich keine signifikante Verringerung der Konzentration von inflammatorischen Markern. Eine Übersicht über alle gemessenen inflammatorischen Marker lässt sich im Anhang Tabelle 13 entnehmen.

Inflammatorischer Biomarker	Kontrolle	90mg/l Afamin	p
Chemokine			
CCL20	1,000 ± 0,000	17,62 ± 6,675	0,0675
CXCL1	1,000 ± 0,447	36,860 ± 8,703	0,0134
CXCL5	1,000 ± 0,372	30,430 ± 5,358	0,0050
CXCL6	1,000 ± 0,100	42,36 ± 8,088	0,0068
CXCL10	1,000 ± 0,000	1,168 ± 0,062	0,0541
IL-8	1,000 ± 0,640	19,39 ± 8,508	0,0820
MCP-1 (CCL2)	1,000 ± 0,482	11,900 ± 2,844	0,0178
MCP-2 (CCL8)	1,000 ± 0,081	7,707 ± 1,604	0,0126
MCP-3 (CCL7)	1,000 ± 0,000	1,626 ± 0,240	0,0594
MCP-4 (CCL13)	1,000 ± 0,541	18,010 ± 4,259	0,0154
TNF-Rezeptor-Superfamilie			
CD40	1,000 ± 0,267	2,511 ± 0,311	0,0009
OPG	1,000 ± 0,295	11,040 ± 3,293	0,0337
TNFRSF9	1,000 ± 0,000	21,41 ± 1,697	0,0003
Wachstumsfaktoren			
CSF-1	1,000 ± 0,376	3,105 ± 0,379	0,0090
FGF-5	1,000 ± 0,149	1,427 ± 0,267	0,0510
FGF-21	1,000 ± 0,000	19,82 ± 2,437	0,0015
Flt3L	1,000 ± 0,328	2,807 ± 0,503	0,0080
HGF	1,000 ± 0,272	22,070 ± 5,739	0,0197
SCF	1,000 ± 0,198	3,588 ± 0,554	0,0119
VEGFA	1,000 ± 0,601	5,736 ± 0,841	0,0029
Zytokine			
IL-6	1,000 ± 0,594	17,360 ± 7,846	0,0888
IL-12B	1,000 ± 0,079	0,989 ± 0,032	0,8836
IL-13	1,000 ± 0,000	3,831 ± 0,198	0,0001
LIF	1,000 ± 0,178	3,195 ± 1,562	0,1884
TWEAK	1,000 ± 0,532	15,04 ± 3,081	0,0113
Sonstige			
ADA	1,000 ± 0,486	4,072 ± 0,370	0,0025
CASP-8	1,000 ± 0,013	4,430 ± 0,957	0,0223
CST5	1,000 ± 0,193	1,670 ± 0,191	0,1003
IL-18R1	1,000 ± 0,276	4,539 ± 0,495	0,0010
LAP TGF-β	1,000 ± 0,082	3,561 ± 0,347	0,0020
MMP-1	1,000 ± 0,575	28,750 ± 9,876	0,0468
MMP-10	1,000 ± 0,000	1,687 ± 0,352	0,1229

STAMBP	1,000 ± 0,000	1,439 ± 0,140	0,0352
TRAIL	1,000 ± 0,000	1,188 ± 0,084	0,0878
uPA	1,000 ± 0,222	27,600 ± 6,345	0,0130
4E-BP1	1,000 ± 0,219	15,800 ± 4,051	0,0206

Tabelle 9: Einfluss von Afamin auf die Sekretion von Biomarkern der Inflammation durch Adipozyten
Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der nachweisbaren inflammatorischen Marker in den Überständen der mit Afamin stimulierten Adipozyten. Dargestellt sind deren *fold changes*. Kontrollen wurden im Mittel auf 1 gesetzt. Die Zellen wurden für jeweils 24 Stunden stimuliert. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt (n=5). Diese wurden als Mittelwert ± SEM zusammengefasst. Der Vergleich von afaminstimulierten und unstimulierten Zellen wurde mittels T-Tests durchgeführt. Statistisch signifikante p-Werte sind fett markiert.

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; ADA: Adenosin Deaminase; CASP: Caspase; CCL: Chemokin (C-C motif) Ligand; CD: Cluster of Differentiation; CSF: Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor; CST-5: Cystatin D; CXCL: Chemokin (C-X-C motif) Ligand; FGF: Fibroblasten-Wachstumsfaktor; *Flt3L*: Fms-related tyrosine kinase 3 ligand; HGF: Hepatozyten-Wachstumsfaktor; IL: Interleukin; IL-12B: Interleukin 12 Untereinheit beta; IL-18R1: Interleukin-18 Rezeptor 1; LAP TGF-β: latency-associated peptide transforming growth factor beta; LIF: leukämie-inhibierender Faktor; MCP: monozytenchemotaktisches Protein; MMP: Matrix-Metalloproteinase; OPG: Osteoprotegerin; SCF: Stammzellfaktor; STAMBP: STAM binding protein; TNFRSF: Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie; TRAIL: Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand; *TWEAK*: tumor necrosis factor related weak inducer of apoptosis; uPA: Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator; *VEGFA*: Vascular Endothelial Growth Factor A

3.3 Korrelationen von Afamin mit verschiedenen inflammatorischen Markern in der KORA F4 Studie

3.3.1 Beschreibung der Studienpopulation

Die untersuchte Studienpopulation besteht aus 1082 Probanden. Von diesen 1082 Probanden waren 48,5% weiblichen Geschlechts. Die Teilnehmer waren zwischen 62 und 81 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 70,2 Jahre. Die Probanden waren im Durchschnitt übergewichtig mit einem BMI von 28,3 kg/m² und hatten einen HbA1C von 5,6%. Der durchschnittliche Afaminspiegel lag bei 72,2 mg/dl. 20,6% der untersuchten Probanden hatten einen manifesten T2D, 39,9% einen Prädiabetes und 39,5% eine normale Glukosetoleranz. Bei den Blutfetten stellte sich die Kohorte durchschnittlich mit einem Gesamtcholesterin von 5,7 mmol/l und Triglyzeriden von 1,3 mmol/l dar. Weitere Informationen zu den Probanden lassen sich Tabelle 9 entnehmen.

Probandeneigenschaften	Mittelwert (SD)/ Median (Q1-Q3)/ Prozent
Weibliches Geschlecht	48,5%
Alter (Jahre)	70,2 (5,4)
BMI (kg/m ²)	28,3 (25,6-31,2)
HbA1C (%)	5,6 (5,4-5,9)
Glukosetoleranz Status	
NGT	39,5%
Prä-Diabetes ¹	39,9%
T2D	20,6%
Gesamtcholesterin (mmol/l)	5,7 (1,0)
Tryglyzeride (mmol/l)	1,3 (1,0-1,8)
eGFR (ml/min pro 1.73 m ²)	77,8 (67,2-87,7)
Bluthochdruck ²	62,4%
Myokardinfarktanamnese	6,0%
NSAIDs in Medikamentenanamnese	4,2%
Sportliche Aktivität	50,0%
Raucherstatus	
Aktiv (regelmäßig oder gelegentlich)	7,5%
Ehemaliger Raucher	43,7%
Niemals	48,7%
Alkoholkonsum	
Abstinenter (0 g/d)	32,2%
Moderat (♂ < 40g/d; ♀ < 20g/d)	51,0%
Hoch (♂ > 40g/d; ♀ > 20g/d)	16,8%
Afamin (mg/l)	72,2 (61,9-83,9)

Tabelle 10: Allgemeine Eigenschaften der Studienpopulation

Dargestellt sind allgemeine Eigenschaften der Studienpopulation. Messwerte sind als Mittelwert (Standardabweichung) oder Median (25. Perzentil/ 75. Perzentil) angegeben, kategoriale Variablen in Prozent (%).

¹: Prädiabetes: gestörte Glukosetoleranz oder abnorme Nüchtern glukose

²: definiert als $\geq 140/90$ mmHG oder Einnahme antihypertensiver Medikation

BMI: body mass index; d: Tag; eGFR: geschätzte glomeruläre Filtrationsrate; g: Gramm; kg: Kilogramm; l: Liter; m²: Quadratmeter; mg: Milligramm; μ kat: Mikrokatal; min: Minute; ml: Milliliter; mmol: Millimol; N: Anzahl Probanden; NGT: normale Glukosetoleranz; NSAID: nichtsteroidale Antiphlogistika; T2D: Typ 2 Diabetes; U: internationale Einheit

3.3.2 Korrelation von Afamin mit Biomarkern der Inflammation

Afamin zeigt in der Studienpopulation der KORA F4 Studie zahlreiche Assoziationen mit Biomarkern der Inflammation des OLINK Inflammation Panels. Die Berechnung wurde dabei für die Eigenschaften der Studienpopulation aus Tabelle 10 adjustiert. Von den 92 Biomarkern der Inflammation des Inflammation Panels waren 72 Marker nachweisbar (Ausschluss bei >25% der Messwerte fehlend oder unter der Nachweisgrenze). Insgesamt korreliert Afamin mit 26 der untersuchten Marker. Dabei zeigt sich eine positive

Korrelation mit 7 Markern ($\beta = 2,1$ bis $6,2$, $p = 0.0157$ bis $<0,0001$), eine negative mit 19 Markern ($\beta = -1,3$ bis $-6,6$, $p = 0.0435$ bis $<0,0001$). Die stärkste signifikante positive Assoziation findet sich mit dem Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor (DNER) ($\beta = 6,2$, $p < 0,0001$). Die stärkste signifikante negative Assoziation wurde für den Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor 1 (CSF-1) ($\beta = -6,6$, $p = 0,0007$) berechnet. Insgesamt korreliert Afamin dabei mit 5 verschiedenen Zytokinen, 5 Wachstumsfaktoren, 4 Chemokinen und 3 Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie (siehe Tabelle 11).

Inflammatorischer Biomarker	Abkürzung	β (95% CI)	p - Wert
Chemokine			
Chemokin (C-C Motif) Ligand 4	CCL4	-0.2 (-1.7, 1.3)	0.6030
Chemokin (C-C Motif) Ligand 19	CCL19	-0.9 (-1.9, 0.1)	0.0792
Chemokin (C-C Motif) Ligand 20	CCL20	0.1 (-0.8, 0.8)	0.8889
Chemokin (C-C Motif) Ligand 23	CCL23	-3.3 (-5.3, -1.3)	<0.0001
Chemokin (C-C Motif) Ligand 25	CCL25	-1.8 (-3.5, -0.2)	0.0511
Chemokin (C-C Motif) Ligand 28	CCL28	-1.2 (-3.4, 1.1)	0.3186
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 1	CXCL1	-1.3 (-3.1, 0.6)	0.0369
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 5	CXCL5	0.2 (-1.0, 1.4)	0.9097
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 6	CXCL6	-0.5 (-2.0, 1.0)	0.4559
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 9	CXCL9	-1.9 (-3.0, -0.7)	0.0009
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 10	CXCL10	-0.7 (-1.8, 0.3)	0.5466
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 11	CXCL11	-0.7 (-1.9, 0.5)	0.2993
Eotaxin	Eotaxin	0.6 (-1.4, 2.8)	0.9369
Fraktalkin	CX3CL1	-0.7 (-3.0, 1.5)	0.2883
Interleukin-8	IL-8	-0.1 (-1.7, 1.3)	0.8459
Monozyten Chemotaktisches Protein-1	MCP-1	3.2 (1.1, 5.3)	0.0035
Monozyten Chemotaktisches Protein-2	MCP-2	0.3 (-0.8, 1.5)	0.7689
Monozyten Chemotaktisches Protein-3	MCP-3	-0.7 (-2.3, 0.8)	0.2792
Monozyten Chemotaktisches Protein-4	MCP-4	0.3 (-1.2, 1.9)	0.9189
TNF-Rezeptor Superfamilie			
Osteoprotegerin	OPG	3.8 (0.9, 6.7)	0.0157
Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 5	CD40	-4.2 (-7.1, -1.4)	0.0048
Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 9	TNFRSF9	-3.8 (-5.8, -1.9)	<0.0001
Wachstumsfaktoren			
Endothelwachstumsfaktor-A	VEGF-A	-0.7 (-2.5, 1.1)	0.2683
Fibroblastenwachstumsfaktor 5	FGF-5	-2.0 (-5.3, 1.1)	0.1455
Fibroblastenwachstumsfaktor 19	FGF-19	-0.1 (-1.1, 0.9)	0.9242
Fibroblastenwachstumsfaktor 21	FGF-21	2.1 (1.2, 3.0)	<0.0001
Fibroblastenwachstumsfaktor 23	FGF-23	-3.9 (-5.5, -2.2)	<0.0001
<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>	Flt3L	4.6 (2.5, 6.6)	<0.0001
Hepatozyten-Wachstumsfaktor	HGF	1.9 (-0.6, 4.5)	0.0797
Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor 1	CSF-1	-6.6 (-10.7, -2.5)	0.0007
Stammzellfaktor	SCF	-0.9 (-3.5, 1.6)	0.0722
Transformierender Wachstumsfaktor α	TGF α	-1.9 (-3.6, -0.2)	0.0033

Zytokine			
Chemokine (C-C Motif) Ligand 3	MIP-1 α	-2.4 (-4.2, -0.6)	0.1609
Interleukin-1 α	IL-1 α	-0.7 (-3.4, 1.9)	0.3963
Interleukin-6	IL-6	-1.9 (-3.0, -0.6)	0.0004
Interleukin-7	IL-7	-2.0 (-3.9, -0.3)	0.0075
Interleukin-10	IL-10	-1.9 (-3.7, -0.1)	0.1045
Interleukin-12 Untereinheit β	IL-12B	-2.0 (-3.5, -0.6)	0.0084
Interleukin-17C	IL-17C	-1.7 (-3.3, -0.1)	0.0057
Interleukin-18	IL-18	0.1 (-1.5, 1.5)	0.4202
Onkostatin M	OSM	-1.4 (-2.8, -0.1)	0.0080
Tumornekrosefaktor β	TNF β	-1.4 (-3.3, 0.5)	0.4601
Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand	TRAIL	2.9 (-0.1, 5.8)	0.0654
<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 12</i>	TWEAK	-1.8 (-5.0, 1.4)	0.1514
<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14</i>	TNFSF14	-0.2 (-1.8, 1.5)	0.4431
<i>Tumor necrosis factor related activation-induced cytokine</i>	TRANCE	0.4 (-1.1, 1.8)	0.9411
Sonstige			
Adenosin-Desaminase	ADA	-0.1 (-2.4, 2.3)	0.4819
Axin-1	Axin-1	-1.6 (-3.4, 0.2)	0.1947
Beta-Nerv Wachstumsfaktor	Beta-NGF	0.5 (-2.3, 3.3)	0.5096
<i>CUB Domain Containing Protein 1</i>	CDCP1	-1.4 (-2.9, 0.1)	0.4692
Cystatin D	CST5	1.9 (0.1, 3.8)	0.1238
<i>Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor</i>	DNER	6.2 (2.7, 9.8)	<0.0001
<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	EIF4EBP1	-1.4 (-3.2, 0.2)	0.3773
<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	GDNF	2.9 (0.1, 5.8)	0.0090
Interleukin-10 Rezeptoruntereinheit β	IL-10RB	-2.4 (-5.5, 0.7)	0.0350
Interleukin-15 Rezeptoruntereinheit α	IL-15RA	-3.7 (-6.7, -0.5)	0.0240
Interleukin-18 Rezeptor 1	IL-18R1	2.5 (0.1, 4.9)	0.0054
<i>Latency-associated peptide transforming growth factor beta-1</i>	LAP TGF β 1	-0.1 (-2.1, 2.1)	0.9964
Leukämieinhibierender Faktor Rezeptor	LIF-R	-1.2 (-4.1, 1.7)	0.8379
Matrixmetalloproteinase 1	MMP-1	-0.8 (-2.0, 0.3)	0.0435
Matrixmetalloproteinase 10	MMP-10	-1.8 (-3.4, -0.2)	0.0115
Natürlicher Killerzellrezeptor 2B4	CD244	-1.3 (-3.8, 1.2)	0.5686
Neurotrophin-3	NT-3	1.0 (-1.3, 3.5)	0.3991
Programmierter Zelltod 1 Ligand 1	PD-L1	-1.9 (-4.0, 0.2)	0.0600
Protein S100-A12	EN-RAGE	-1.9 (-3.0, -0.7)	0.0007
<i>signaling lymphocytic activation molecule family member 1</i>	SLAMF1	-1.6 (-3.4, 0.1)	0.0637
<i>Signal transducing adapter molecule binding protein</i>	STAMPBP	-1.4 (-3.8, 1.0)	0.4283
<i>SIR2-like protein 2</i>	SIRT2	-2.3 (-4.0, -0.5)	0.0907
Sulfotransferase 1A1	ST1A1	-0.7 (-1.8, 0.4)	0.2923
<i>T-cell surface glycoprotein CD5</i>	CD5	-5.0 (-7.4, -2.7)	<0.0001
<i>T cell surface glycoprotein CD6 isoform</i>	CD6	-0.2 (-1.9, 1.6)	0.4429
Urokinasetyp Plasminogenaktivator	uPA	1.6 (-1.3, 4.5)	0.0579

Tabelle 11: Assoziation von Afamin mit verschiedenen inflammatorischen Markern

Die Tabelle zeigt Korrelationen von Afamin mit verschiedenen inflammatorischen Markern in der untersuchten Studienpopulation. Der Korrelationskoeffizient β , der für verschiedene Störfaktoren adjustiert

wurde, ist dabei inklusive 95% Konfidenzintervall angegeben. Zugehörige, signifikante p-Werte sind fett markiert.

Es wurde für folgende Variablen adjustiert: Geschlecht, Alter, BMI, HbA1C, Glukosetoleranz Status, Gesamtcholesterin, Triglyzeride, eGFR, Bluthochdruck, Myokardinfarktanamnese, NSAIDs in Medikamentenanamnese, sportliche Aktivität, Raucherstatus, Alkoholkonsum

4 Diskussion

4.1 Regulation der Afaminsekretion

In der vorliegenden Arbeit wurden HepaRG Zellen auf die Sekretion von Afamin nach 24-stündiger Stimulation mit verschiedenen inflammatorischen und metabolischen Mediatoren untersucht. Es zeigte sich eine verminderte Sekretion von Afamin nach Stimulation mit IL-6, IL-1 β , TNF α und Glukose und eine vermehrte Sekretion von Afamin nach Stimulation mit hohen Konzentrationen von Insulin. In den WST-8 Tests stellte sich kein signifikanter zytotoxischer Einfluss der untersuchten Substanzen auf HepaRG Zellen dar. Damit können die verschiedenen Messergebnisse als Veränderung der Afaminsekretion aus Leberzellen nach entsprechender Stimulation angenommen werden, da diese nicht aus einer Veränderung der lebensfähigen HepaRG Zellen durch die verschiedenen Stimulanzen herrühren.

Für die vorliegende Arbeit wurden HepaRG Zellen als Zellkulturmodell gewählt. HepaRG Zellen stammen aus einer immortalisierten Zelllinie, die, im Gegensatz zu anderen Zelllinien wie HepG2 Zellen, viele leberspezifische Funktionen und Proteine wie Cytochrom-P-Enzyme, Kernrezeptoren oder Membrantransporter vergleichbar mit primären Hepatozyten ausbilden (Tomida et al., 2017). Sie wurden ursprünglich aus einer Patientin isoliert, die an einem hepatozellulären Karzinom und an einer Hepatitis C Infektion litt (Gripon et al., 2002). HepaRG Zellen bilden unter geeigneten Bedingungen polarisierte und funktionelle Hepatozyten aus und entwickeln gallengangsähnliche Formationen. Sie stellen damit die erste bipotente humane hepatische Vorläuferzelllinie dar (Parent et al., 2004). Insgesamt sind HepaRG Zellen in ihren Eigenschaften und in ihrer Physiologie damit primären Hepatozyten sehr ähnlich. Inwieweit die Ergebnisse aber auch für primäre Hepatozyten *in vivo* gelten, bleibt in weiteren Studien zu klären.

Über die Regulation der Expression und Sekretion von Afamin in primären Leberzellen bzw. in einer Leberzelllinie ist bisher nichts bekannt. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, gibt es Assoziationen des Afaminplasmaspiegels mit verschiedenen Krankheiten wie der Pneumonie (Dieplinger et al., 2013), oder mit Blutparametern wie Triglyceriden (Kronenberg et al., 2014). Diese Assoziationen sagen aber wenig über einen kausalen Zusammenhang aus. So gibt es nur zwei Studien, die einen Zusammenhang zwischen Stimulus und Afaminkonzentration aufzeigen. In der ersten wird im Mausmodell gezeigt,

dass eine Überexpression des Inselzellfaktors Islet-1 in β -Zellen in genetisch modifizierten Mäusen zu einer Überexpression des Afamins in den β -Zellen führt (Liu et al., 2012). Ob Islet-1 einen ähnlichen Effekt auf Hepatozyten hat und ob sich diese Veränderung in den β -Zellen auf die Afaminplasmaspiegel auswirkt, bleibt ungeklärt. Islet-1 wird jedoch normalerweise nicht in Leberzellen exprimiert (GTEx Portal, 2019), weshalb es in der physiologischen Regulation von Afamin, das primär in der Leber gebildet wird, wahrscheinlich keine relevante Rolle spielen sollte. In der zweiten Studie wurden Patienten 8 Wochen mit rekombinantem Wachstumshormon behandelt, was zu erhöhten Afaminplasmaspiegeln führte (Tan et al., 2017). Ob dabei eine spezifische Hochregulation von Afamin erfolgt oder Afamin infolge der vermehrten Proteinbiosynthese durch das Wachstumshormon erfolgt (Bergan-Roller und Sheridan, 2018), bleibt ungeklärt.

In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass die Stimulation von HepaRG Zellen mit inflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-1 β und TNF α) zu einer geringeren Afaminmenge im Zellkulturüberstand führt. Da die Versuche an einer Zelllinie durchgeführt wurden, befand sich neben HepaRG Zellen keine andere Zellart in der Zellkultur. Deshalb müssen die untersuchten Mediatoren direkt auf HepaRG Zellen wirken. Sie führten zu einer verminderten Sekretion von Afamin. Da alle untersuchten proinflammatorischen Biomarker eine verminderte Afaminsekretion zur Folge hatten, führt ein proinflammatorischer Zustand wahrscheinlich im Allgemeinen zu einer verminderten Sekretion von Afamin aus Leberzellen. Damit reagieren Leberzellen auf inflammatorische Stimuli bei der Produktion von Afamin wie bei seinem Verwandten, dem Albumin, das ebenfalls nach Stimulation mit den untersuchten Substanzen in verringerter Menge gebildet wird (Tanaka et al., 2014; Brenner et al., 1990; Moshage et al., 1987). Afamin könnte also wie Albumin ein negatives Akute-Phase-Protein sein, also ein Protein, dessen Plasmaspiegel in Folge von Inflammation nach unten reguliert wird (Gruys et al., 2005).

Glukose hat, wie oben beschriebene inflammatorische Mediatoren, einen direkten Einfluss auf die Afaminsekretion aus HepaRG Zellen, indem es zu einer verminderten Sekretion führt. Ein Überangebot an Glukose als Energielieferant würde eher eine vermehrte Proteinbiosynthese und damit eine vermehrte Afaminproduktion nach sich ziehen. Somit scheint es einen Regulationsmechanismus zu geben, der, trotz eines Überangebots an Energie zu einer verminderten Afaminexpression bei erhöhtem Glukoseangebot führt. Damit liegt ein Zusammenhang abseits des Energieangebots zwischen Afamin und

Glukose nahe, der in einer regulatorischen Funktion von Afamin im Glukosestoffwechsel bestehen könnte.

Die Afaminmenge in den Überständen der insulinstimulierten HepaRG Zellen war nur bei sehr hohen, nicht physiologischen Insulinkonzentrationen, im Vergleich zu basal stimulierten HepaRG Zellen, signifikant erhöht. Ansonsten ließ sich kein signifikanter Unterschied zu basal stimulierten Zellen feststellen. Es gibt also einen Signalweg, der Insulin mit der Afaminexpression in Leberzellen verbindet, der allerdings unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf die Afaminsekretion aus Leberzellen hat.

4.2 Auswirkungen von Afamin auf die Insulinresistenz

In dieser Arbeit wurden primäre, humane Adipozyten mit einer physiologischen Afaminkonzentration von 90 mg/l behandelt. Anschließend wurde die Aktivierung von verschiedenen Schlüsselproteinen metabolischer Signalwege in den Lysaten der Zellen anhand ihrer Phosphorylierung untersucht. Dabei wurde Akt mit bzw. ohne Insulinstimulus an verschiedenen Aminosäuren vermehrt bzw. vermindert phosphoryliert.

Akt ist ein zentrales Protein in der Insulinsignalkaskade (Boucher et al., 2014). Es führt in Fett- und Muskelzellen zu einer vermehrten Translokation insulinsensitiver GLUT4 Transporter von intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran (Bryant et al., 2002) und damit zu einer vermehrten Glukoseaufnahme (Welsh et al., 2005).

Eine Stimulation mit Afamin kann zu einer Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung führen, was für eine Osteoblastenzelllinie bereits gezeigt wurde. Dabei wurden allerdings chemotaktische Eigenschaften von Afamin untersucht und nicht die Wirkung auf den Insulinsignalweg (Kim et al., 2012). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Afamin in Abwesenheit von Insulin eine vergleichbar aktivierende Wirkung auf Adipozyten hat.

Afamin führte zu einer vermehrten Aktivierung der Signalkaskade über die Phosphorylierung von Serin in Abwesenheit von Insulin. In Anwesenheit von Insulin folgte aus der Afaminstimulation jedoch eine verminderte Aktivierung über die Phosphorylierung von Threonin. Die Phosphorylierung von Threonin ist dem aktuellen Wissenstand nach dabei der wichtigere Aktivator für die Akt Wirkung (Jacinto et al., 2006; Sarbassov et al., 2005). Zudem ist unter physiologischen Bedingungen immer eine

mindestens geringe Insulinkonzentration vorhanden (Cherrington et al., 2002), weshalb die gesteigerte Aktivierung von Akt über Serin-Phosphorylierung in Abwesenheit von Insulin unter physiologischen Bedingungen weniger stark ausfallen sollte und die verminderte Aktivierung von Akt insgesamt der vorherrschende Effekt sein sollte.

Afamin führt also zu einer verminderten Aktivierung von Akt in Adipozyten nach Insulinstimulation und damit zu einer verminderten Wirkung von Insulin auf Adipozyten. Das könnte auch die in Studien nachgewiesene Assoziation von Afamin mit Insulinresistenz (Seeber et al., 2014; Kollerits et al., 2017) erklären, die eine verminderte Wirkung von Insulin auf das Zielgewebe beschreibt. Erhöhtes Afamin würde damit die Insulinresistenz über seine Wirkung auf Adipozyten direkt nach sich ziehen. Da Insulinresistenz ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von T2D ist (siehe Kapitel 1.1.1.2), könnte Afamin darüber an der Entstehung von T2D beteiligt sein.

Die von Afamin induzierte Insulinresistenz könnte die bereits erwähnte, in einer Studie beobachtete, positive Assoziation von Afamin zu Glukose (Kronenberg et al., 2014) erklären. Afamin könnte zu Insulinresistenz führen, die wiederum erhöhte Glukosespiegel nach sich ziehen würde (Tabák et al., 2012). Damit hätte Afamin die erhöhten Glukosespiegel kausal zur Folge. Dieser erhöhte Glukosespiegel könnte in einer negativen Rückkopplung zu einer geringeren Afaminmenge führen.

In Zusammenhang mit den in Kapitel 1.1 diskutierten Ergebnissen könnte für Afamin, in Zusammenhang mit Glukose, der in Abb. 18 dargestellte Regelkreis bestehen:

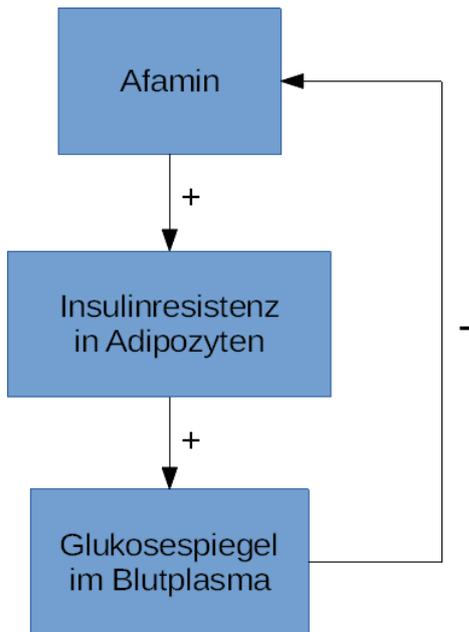


Abb. 18: Möglicher Afamin – Glukose Regelkreis

Die Abbildung zeigt schematisch einen möglichen Zusammenhang zwischen Afamin, Insulinresistenz in Adipozyten und dem Glukosespiegel im Plasma

4.3 Proinflammatorische Eigenschaften von Afamin

In den afaminstimulierten Adipozyten wurde neben der Aktivierung von metabolischen Schlüsselenzymen auch die Aktivierung von inflammatorischen Schlüsselproteinen untersucht. Dabei zeigte sich bei den untersuchten Proteinen (ERK, p38 und NFκB) keine signifikante Vermehrung oder Verminderung ihrer Aktivierung nach 24-stündiger Stimulation mit Afamin. Allerdings könnte Afamin nach einer kürzeren Stimulation die Aktivierung doch signifikant beeinflussen, der Zeitpunkt der Untersuchung könnte ungünstig gewählt sein. So zeigen andere Studien, die ebenfalls die Aktivierung von p38 und ERK in Zellkulturen untersuchten, dass die Aktivierung von einem Ausgangswert abnimmt, je länger die Zellen auf die untersuchte Methode hin stimuliert wurden (Schubert et al., 2009; Kayali et al., 2000). Der maximal beobachtete Zeitraum für ERK betrug 2 Stunden, also deutlich weniger als die hier angewandte Stimulationsdauer. Dabei war die Aktivierung von ERK deutlich zurückgegangen. Somit könnte Afamin inflammatorische Signalwege in Adipozyten beeinflussen, was durch die hier angewandte Methode allerdings nicht nachweisbar wäre.

Weiterhin wurde die Sekretion von inflammatorischen Biomarkern aus den Adipozyten untersucht. Dabei führte Afamin zu einer vermehrten Sekretion von 25 der 36 nachgewiesenen Marker im Zellkulturüberstand *in vitro*.

Die durch Afamin vermehrt ausgeschütteten Proteine lassen sich in mehrere Gruppen einteilen. Eine dieser Gruppen sind die Chemokine. Die Hauptaufgabe von Chemokinen ist es, Leukozyten an den Ort einer Verletzung oder Entzündung zu rekrutieren. Zusätzlich spielen Chemokine eine komplexe Rolle in der Homöostase, der Hämatopoese, dem Beginn einer Immunantwort und der Immunüberwachung (Turner et al., 2014). Durch die vermehrte Bildung von Chemokinen aus Adipozyten nach Afaminstimulation könnte dieses also an der komplexen, chronischen Entzündung, die bei der Entstehung von T2D im Fettgewebe zu beobachten ist, beteiligt sein, z.B. könnte die afaminvermittelte Chemokinausschüttung an der vermehrten Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe mitwirken, die man bei Patienten mit T2D beobachten kann (siehe Kapitel 1.2.2.1).

Ein weiterer Faktor, der an der chronischen Entzündung im Fettgewebe beteiligt sein könnte, ist der Wachstumsfaktor CSF-1. CSF-1 kontrolliert unter anderem das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Makrophagen (Stanley et al., 1997). Damit könnte er auch an der bei Patienten mit T2D beobachteten Differenzierung der Makrophagen in einen proinflammatorischen Zustand beteiligt sein (siehe Kapitel 1.2.2.1).

Weitere wichtige signifikant erhöhte Biomarker sind CXCL-1, MCP-1, CD40 und HGF, die alle mit Übergewicht assoziiert sind (Nunemaker et al., 2014; Panee, 2012; Denis et al., 2017; Rehman et al., 2003), dem eine wichtige Rolle bei der Entstehung der subklinischen Inflammation zukommt. Auch mit dem daraus resultierenden T2D bzw. der Insulinresistenz (HGF) sind einige der erhöhten Biomarker assoziiert (CXCL-6, OPG und ADA) (Tsukagawa et al., 2013; van Dyke et al., 2017; Knudsen et al., 2003; Sapkota et al., 2017). Damit könnte Afamin auch bei diesen Krankheitsbildern durch seine Wirkung auf Adipozyten eine Rolle spielen.

Afamin hat insgesamt also eine proinflammatorische Wirkung auf Adipozyten. Diese Erkenntnis würde die bisher kontrovers diskutierten pro- bzw. antiinflammatorischen Eigenschaften (siehe Kapitel 1.3.3) von Afamin als proinflammatorisch unterstützen. Der Effekt von Afamin auf IL-6 war nicht signifikant ($p=0,0888$), aber es kam bei jeder der untersuchten Proben zu einem Anstieg der IL-6 Konzentration nach Afaminstimulation, so

dass die statistische Power möglicherweise zu gering für diese Untersuchung war. Deshalb könnte Afamin trotzdem durch seine Wirkung auf Adipozyten auch eine Ursache für einen IL-6 Anstieg sein und eine Korrelation in den bereits erwähnten Studien erklären.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den Zellkulturversuchen mit einer Leberzelllinie, die eine verminderte Bildung von Afamin nach Stimulation mit inflammatorischen Biomarkern gezeigt hat, könnte hier ebenfalls ein Regelkreis aufgedeckt worden sein: Afamin würde zu einer vermehrten Ausschüttung inflammatorischer Biomarker aus Adipozyten führen, was ihrerseits wieder zu einer verminderten Afaminbildung führen würde.

Neben diesen vornehmlich inflammatorischen Eigenschaften der Biomarker haben einige auch direkte Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel. So führt FGF-21 zu einer vermehrten insulinunabhängigen Glukoseaufnahme über GLUT-1 Transporter (Kharitonov et al., 2005). HGF, dessen Plasmaspiegel wahrscheinlich maßgeblich durch Adipozyten beeinflusst wird, führt ebenfalls zu einer vermehrten Glukoseaufnahme in Adipozyten, allerdings ist diese GLUT-4 vermittelt (Bertola et al., 2007; Oliveira et al., 2018). Somit könnte Afamin über die vermehrte Ausschüttung inflammatorischer Biomarker nicht nur die Inflammation direkt beeinflussen, sondern ebenfalls den Glukosestoffwechsel.

4.4 Afamin und subklinische Inflammation in einer Querschnittsstudie

In die Analyse der Assoziationen von Afamin mit den untersuchten inflammatorischen Biomarkern wurden 1082 Probanden der KORA F4 Studie eingeschlossen. Die Analyse wurde für verschiedene Confounder wie Geschlecht, Alter und BMI, die einen Einfluss auf die Assoziation zwischen Afaminplasmakonzentration und Serumkonzentration von Biomarkern der subklinischen Inflammation haben können, adjustiert. Danach zeigten sich 7 positive und 19 negative Assoziationen der Afaminplasmakonzentration mit verschiedenen inflammatorischen Biomarkern.

Tabelle 12 zeigt alle untersuchten Mediatoren, bei denen sowohl eine signifikante Erhöhung der inflammatorischen Marker aus dem Adipozyten-Versuch als auch eine signifikante Assoziation mit Serumspiegeln der Biomarker in den Probanden der KORA

F4 Studie vorlag. Die positive Assoziation könnte daraus entstehen, dass Afamin kausal zu einer vermehrten Ausschüttung des entsprechenden Mediators aus dem Fettgewebe führt. Erhöhte Afaminspiegel könnten also *in vivo* zu erhöhten Serumkonzentrationen von OPG, MCP-1, FGF-21, IL-18R1 und Flt2L durch eine vermehrte Ausschüttung aus Adipozyten führen.

Inflammatorischer Biomarker	Zellkulturversuch		Assoziation von Afamin mit Serumspiegeln (KORA F4)	
	90 mg/l Afamin	p-Wert	β (95% CI)	p -Wert
OPG	11,040 \pm 3,293	0,0337	3.8 (0.9, 6.7)	0.0157
MCP-1	11,900 \pm 2,844	0,0178	3.2 (1.1, 5.3)	0.0035
FGF-21	19,82 \pm 2,437	0,0015	2.1 (1.2, 3.0)	<0.0001
IL-18R1	4,539 \pm 0,495	0,0010	2.5 (0.1, 4.9)	0.0054
Flt3L	2,807 \pm 0,503	0,0080	4.6 (2.5, 6.6)	<0.0001
CD40	2,511 \pm 0,311	0,0009	-4.2 (-7.1, -1.4)	0.0048
TNFRSF9	21,41 \pm 1,697	0,0003	-3.8 (-5.8, -1.9)	<0.0001
CSF-1	3,105 \pm 0,379	0,0090	-6.6 (-10.7, -2.5)	0.0007
CXCL1	36,860 \pm 8,703	0,0134	-1.3 (-3.1, 0.6)	0.0369
MMP-1	28,750 \pm 9,876	0,0468	-0.8 (-2.0, 0.3)	0.0435

Tabelle 12: Vergleich des Zellkulturversuchs mit den Daten aus der Querschnittsstudie

Die Tabelle zeigt die signifikant erhöhten inflammatorischen Biomarker aus dem Adipozyten-Zellkulturversuch, für die auch eine signifikante Korrelation in der Studienpopulation vorlag. Dargestellt sind im Zellkulturversuch die fold changes der afaminstimulierten Zellen bzw. der Korrelationskoeffizient zwischen Afamin mit dem jeweiligen inflammatorischen Biomarker und die dazugehörigen p-Werte.

CD: *Cluster of Differentiation*; CSF: Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor; CXCL: Chemokin (C-X-C motif) Ligand; FGF: Fibroblasten-Wachstumsfaktor; Flt3L: *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*; IL-18R1: Interleukin-18 Rezeptor 1; MCP: monozytenchemotaktisches Protein; MMP: Matrix-Metalloproteinase; OPG: Osteoprotegerin; TNFRSF: Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie

Das Fettgewebe könnte damit nicht nur einen Einfluss auf die Inflammation *in vitro* haben, auch *in vivo* könnte sich Afamin auf die Inflammation auswirken. Wieso Marker, die im Zellkulturversuch vermehrt gebildet werden, in der Querschnittsstudie negativ mit Afamin korrelieren, kann durch diese Arbeit nicht geklärt werden. So könnte der Effekt von Afamin auf Adipozyten durch weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Einflüsse abgeschwächt oder sogar umgekehrt werden. Möglich ist auch, dass das Fettgewebe nur zu einem geringen Anteil an der Produktion der Gesamtmenge des jeweils untersuchten Proteins beteiligt ist, so dass der Wirkung von Afamin auf Fettzellen anteilig kaum ins Gewicht fällt. Außerdem könnte Afamin auf andere Gewebe den Effekt haben, dass es die untersuchten Marker der Inflammation herunter reguliert.

Zu den wahrscheinlich kausal durch Afamin erhöhten inflammatorischen Biomarkern gehört OPG, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, das mit einem vermehrten

Auftreten von T2D assoziiert ist (Knudsen et al., 2003), was einer der Gründe für die positive Assoziation von Afamin mit T2D sein könnte. Durch Afamin kausal erhöht könnten außerdem Flt3L, ein Wachstumsfaktor, und IL-18R1, ein Zytokin, sein, die mit inflammatorischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis assoziiert sind (Takei et al., 2011; Nakamura et al., 2015), was einen weiteren Hinweis darauf liefert, dass Afamin proinflammatorische Eigenschaften besitzt.

Das Chemokin MCP-1 gehört ebenfalls zu den wahrscheinlich durch Afamin kausal erhöhten Biomarkern der Inflammation. Es gibt viele Hinweise darauf, dass MCP-1 ein Protein ist, das wichtig für die Monozyten-Rekrutierung am Ort einer Inflammation ist (Sica et al., 2000). Damit könnte auch MCP-1, das im Fettgewebe gebildet wird, die Einwanderung von Makrophagen, die im Zustand subklinischer Inflammation im Fettgewebe gefunden werden, unterstützen. Somit gibt es nicht nur einen Faktor, der *in vitro* vermehrt vom Fettgewebe gebildet wird und an der Einwanderung von Makrophagen beteiligt ist, sondern auch einen *in vivo*. Somit könnte Afamin über die Wirkung auf das Fettgewebe indirekt eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten (bzw. Makrophagen) haben. Chemotaktische Eigenschaften von Afamin sind bereits auf Prä-Osteoblasten festgestellt worden. Die chemotaktischen Eigenschaften wurden hierbei durch einen direkten Effekt von Afamin vermittelt (Kim et al., 2012). Afamin könnte also nicht nur auf Prä-Osteoblasten chemotaktisch wirken, sondern auch durch einen indirekten Effekt auf Makrophagen.

FGF-21, das ebenfalls hochreguliert wurde und positiv mit Afamin korreliert, führt zu einer vermehrten Hochregulation von GLUT-1 Transportern in Adipozyten (Kharitonkov et al., 2005). GLUT-1 Transporter sind insulinunabhängige Transporter (Kharitonkov et al., 2005), das heißt, sie ermöglichen Adipozyten, Glukose insulinunabhängig aufzunehmen. Somit könnte Afamin zwar, wie in Kapitel 4.2 ausgeführt, zu einer Insulinresistenz führen, also die Glukoseaufnahme durch GLUT-4 Transporter in Abhängigkeit von Insulin reduzieren, gleichzeitig aber eine basale Glukoseaufnahme der Adipozyten durch GLUT-1-Transporter sicherstellen.

Insgesamt zeigen die zahlreichen Korrelationen von Afamin mit inflammatorischen Biomarkern die komplexe Verflechtung von Afamin mit Inflammation, die in weiteren Studien genauer untersucht werden muss.

4.5 Zusammenfassung

Die Afaminsekretion aus HepaRG Zellen wird *in vitro* maßgeblich durch inflammatorische und metabolische Marker beeinflusst. Dabei führen inflammatorische Marker (IL-1 β , IL-6 und TNF α) und Glukose zu einer verminderten Afaminsekretion und hohe Konzentrationen von Insulin zu einer vermehrten Afaminsekretion. Für das antiinflammatorische Adiponektin konnte keine veränderte Afaminsekretion festgestellt werden.

Weiterhin zeigt diese Arbeit, dass Afamin einen Einfluss auf inflammatorische und metabolische Signalwege in humanen Adipozyten hat. So führte Afamin zu einer verminderten Aktivierung von Akt in Anwesenheit von Insulin, was wahrscheinlich zu einer verminderten Glukoseaufnahme in Adipozyten führt und damit die beobachtete Assoziation von Afamin mit Insulinresistenz erklären könnte. Afamin führte nicht zu einer Veränderung von inflammatorischen Signalwegen in humanen Adipozyten, allerdings führte es zu einer vermehrten Ausschüttung diverser inflammatorischer Biomarker. In der KORA F4 Studie korrelierten einige dieser Biomarker positiv mit Afamin, was für proinflammatorische Eigenschaften von Afamin spricht. Mit anderen inflammatorischen Biomarkern korreliert Afamin allerdings negativ.

Insgesamt liefert diese Arbeit erste Hinweise darauf, dass Afamin zu Insulinresistenz von Adipozyten führt und proinflammatorische Eigenschaften hat, was für eine Beteiligung in der Pathogenese des T2D sprechen könnte.

4.6 Stärken und Schwächen der Arbeit

Diese Arbeit hat verschiedene Stärken und Schwächen. Zunächst möchte ich mich den Schwächen zuwenden.

In der Zellkultur wurden jeweils nur wenige Versuche für jede Versuchsreihe durchgeführt. Eine größere Anzahl von Versuchen gäbe den Ergebnissen mehr Aussagekraft. Außerdem wurden in den Versuchen zu Leberzellen keine primären Zellen, sondern eine Zelllinie verwendet. Somit können die Ergebnisse nicht auf primäre Hepatozyten übertragen werden. Zusätzlich sind die beobachteten Effekte alle *in vitro*

aufgetreten. Ob Gleiches *in vivo* beobachtet werden kann, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Es könnte, wie bereits erläutert, nicht in jedem Zellkulturversuch die ideale Stimulationsdauer verwendet worden sein. So zeigt Afamin keinen Einfluss auf inflammatorische Signalwege in humanen Adipozyten, obwohl Afamin zu einer vermehrten Ausschüttung von inflammatorischen Biomarkern führt. Das könnte daher kommen, dass der Stimulationszeitpunkt mit 24 Stunden für die Messung einer signifikant veränderten Aktivierung von z.B. ERK zu lange gewählt sein könnte.

In der KORA F4 Studie kam es zu einer gewissen Vorauswahl an Probanden, da nur Daten für Probanden im Alter von 62-81 Jahren vorlagen. Somit sind die hier gewonnenen Erkenntnisse nicht auf die Allgemeinbevölkerung zu übertragen.

Folgend möchte ich mich den Stärken zuwenden. In dieser Arbeit werden neue Erkenntnisse über Afamin gewonnen. Es wurden bisher noch keine Zellkulturversuche durchgeführt, die die Afaminproduktion aus Leberzellen bzw. einer Leberzelllinie untersuchen. Damit stellen die Ergebnisse dieser Arbeit neue Erkenntnisse über Afamin dar. Es wurden erstmalig Faktoren identifiziert, die die Afaminproduktion auf zellulärer Ebene beeinflussen. Zusätzlich wurden erstmals Effekte von Afamin auf Fettzellen als Beteiligter an der T2D Entstehung untersucht. Dazu wurden die Adipozyten mit einer physiologischen Konzentration von Afamin stimuliert, was für eine physiologische Relevanz der *in vitro* Befunde spricht. Dabei wurden primäre Adipozyten von Spendern verwendet, was ebenfalls für ähnliche Effekte *in vivo* spricht. Die dabei beobachteten Effekte auf die Insulinwirkung und die Inflammation könnten damit die beobachtete Assoziation von Afamin mit Insulinresistenz erklären.

Auch die Auswertung der Daten aus der KORA F4 Studie geben weitere Erkenntnisse zu Afamin. Die KORA F4 Studie ist eine bevölkerungsbasierte Stichprobe mit einer hohen Fallzahl, weshalb die Ergebnisse, mit Berücksichtigung auf die entsprechende Altersgruppe, auf die Allgemeinbevölkerung übertragbar sind. Die vorher unklare positive bzw. negative Assoziation von Afamin zu Markern der Inflammation wird durch die hier ausgewerteten Daten differenziert ergänzt. Die statistische Analyse wurde für verschiedene Confounder angepasst, weshalb die beobachteten Assoziationen die unabhängige Beziehung von Afamin zu dem jeweiligen inflammatorischen Biomarker widerspiegeln.

4.7 Ausblick

Insgesamt stellt diese Arbeit neue Erkenntnisse zur Regulation und zum Effekt von Afamin dar. Allerdings sind diese teilweise an einer Zelllinie gewonnen worden. Die Ergebnisse sollten deshalb an primären Hepatozyten bestätigt werden.

Die Untersuchung der Wirkung von Afamin auf Adipozyten bezüglich Inflammation und Insulinwirkung sind in dieser Arbeit begonnen worden, allerdings sollten diese weiter vertieft werden. So ist beispielsweise noch unklar, über welche Rezeptoren Afamin auf Fettzellen wirkt.

Die Rolle von Afamin in der Entstehung von T2D sollte auch näher untersucht werden. So gibt es bereits Erkenntnisse aus Afamin überexprimierenden Mäusen, die erhöhte Glukosewerte entwickeln (Kronenberg et al., 2014), jedoch fehlen Untersuchungen bezüglich Insulinresistenz und inflammatorischen Biomarkern in solchen Mäusen. Damit könnte man noch stärkere Hinweise darauf finden, dass Afamin zentrale Punkte in der Entstehung von T2D beeinflusst.

Afamin ist bereits als Prädiktor für T2D beschrieben worden (Kollerits et al., 2017). Sollten sich noch weitere Hinweise dafür finden, dass Afamin kausal an der T2D Entstehung beteiligt ist, wäre Afamin eventuell ein neues Target in der Therapie von T2D. Die bisherigen Therapien des T2D haben keine krankheitsmodifizierenden Eigenschaften (Donath, 2014). Die Antagonisierung von IL-1 β , das an der Entstehung von T2D beteiligt ist, wird aktuell in Studien untersucht. Dabei zeigen sich positive Auswirkungen auf die Insulinresistenz und die Glukosekontrolle. Ebenso wird vermutet, dass die Antagonisierung das Auftreten von T2D verhindern bzw. verzögern kann (Donath, 2014). Sollte sich Afamin ähnlich an der T2D Entstehung beteiligt zeigen, könnte die Antagonisierung der Afaminwirkung ein weiterer Aspekt in der Therapie von T2D sein, der nicht nur rein symptomatisch wirken könnte, sondern das Auftreten von T2D ebenfalls verhindern bzw. verzögern könnte.

Literaturverzeichnis

- Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z. (1998): Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 15 (7), S. 539–553.
- American Diabetes Association (2018): 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. In: *Diabetes care* 41 (Suppl 1), S13-S27.
- Arkan, Melek C.; Hevener, Andrea L.; Greten, Florian R.; Maeda, Shin; Li, Zhi-Wei; Long, Jeffrey M. et al. (2005): IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. In: *Nature medicine* 11 (2), S. 191–198.
- Balkwill, Frances (2006): TNF-alpha in promotion and progression of cancer. In: *Cancer metastasis reviews* 25 (3), S. 409–416.
- Barnes, P. J.; Karin, M. (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. In: *The New England journal of medicine* 336 (15), S. 1066–1071.
- Barzilay, J. I.; Abraham, L.; Heckbert, S. R.; Cushman, M.; Kuller, L. H.; Resnick, H. E.; Tracy, R. P. (2001): The Relation of Markers of Inflammation to the Development of Glucose Disorders in the Elderly: The Cardiovascular Health Study. In: *Diabetes* 50 (10), S. 2384–2389.
- Baumann, H.; Gauldie, J. (1994): The acute phase response. In: *Immunology today* 15 (2), S. 74–80.
- Bélanger, L.; Roy, S.; Allard, D. (1994): New albumin gene 3' adjacent to the alpha 1-fetoprotein locus. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (8), S. 5481–5484.
- Benhalima, Katrien; Devlieger, Roland; van Assche, André (2015): Screening and management of gestational diabetes. In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 29 (3), S. 339–349.
- Bergan-Roller, Heather E.; Sheridan, Mark A. (2018): The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. In: *General and comparative endocrinology* 258, S. 119–133.
- Bertola, Adeline; Bonnafous, Stéphanie; Cormont, Mireille; Anty, Rodolphe; Tanti, Jean-François; Tran, Albert et al. (2007): Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (14), S. 10325–10332.

- Boucher, Jérémie; Kleinridders, André; Kahn, C. Ronald (2014): Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (1).
- Brenner, D. A.; Buck, M.; Feitelberg, S. P.; Chojkier, M. (1990): Tumor necrosis factor- α inhibits albumin gene expression in a murine model of cachexia. In: *The Journal of clinical investigation* 85 (1), S. 248–255.
- Brietz, Alexandra; Schuch, Kristin Verena; Wangorsch, Gaby; Lorenz, Kristina; Dandekar, Thomas (2016): Analyzing ERK $\frac{1}{2}$ signalling and targets. In: *Molecular bioSystems* 12 (8), S. 2436–2446.
- Bryant, Nia J.; Govers, Roland; James, David E. (2002): Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (4), S. 267–277.
- Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2013): Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes - Langfassung, 1. Auflage, 4. Version, zuletzt geändert November 2014. Zugegriffen über www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de am 02.11.2018.
- Cai, Dongsheng; Yuan, Minsheng; Frantz, Daniel F.; Melendez, Peter A.; Hansen, Lone; Lee, Jongsoon; Shoelson, Steven E. (2005): Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. In: *Nature medicine* 11 (2), S. 183–190.
- Ceciliani, Fabrizio; Giordano, Alessia; Spagnolo, Valentina (2002): The Systemic Reaction During Inflammation: The Acute-Phase Proteins. In: *Protein and Peptide Letters* 9 (3), S. 211–223.
- Cherrington, A. D.; Sindelar, D.; Edgerton D.; Steiner, K.; McGuinness, O. P. (2002): Physiological Consequences of Phasic Insulin Release in the Normal Animal. In: *Diabetes* 51 (Supplement 1), S103-S108.
- Chiefari, E.; Arcidiacono, B.; Foti, D.; Brunetti, A. (2017): Gestational diabetes mellitus: an updated overview. In: *Journal of endocrinological investigation* 40 (9), S. 899–909.
- Chousterman, Benjamin G.; Swirski, Filip K.; Weber, Georg F. (2017): Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. In: *Seminars in immunopathology* 39 (5), S. 517–528.
- Chung, Kian Fan (2009): Cytokines. In: Peter J. Barnes (Hg.): *Asthma and COPD. Basic mechanisms and clinical management*. 2nd ed. San Diego, Calif, London: Academic Press/Elsevier, S. 327–341.
- Cinti, Saverio; Mitchell, Grant; Barbatelli, Giorgio; Murano, Incoronata; Ceresi, Enzo; Faloi, Emanuela et al. (2005): Adipocyte death defines macrophage localization and

function in adipose tissue of obese mice and humans. In: *Journal of lipid research* 46 (11), S. 2347–2355.

Cone, J. B. (2001): Inflammation. In: *American journal of surgery* 182 (6), S. 558–562.

Cuadrado, Ana; Nebreda, Angel R. (2010): Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. In: *The Biochemical journal* 429 (3), S. 403–417.

Dean, John (2012): Organising care for people with diabetes and renal disease. In: *Journal of renal care* 38 Suppl 1, S. 23–29.

Denis, Gerald V.; Sebastiani, Paola; Andrieu, Guillaume; Tran, Anna H.; Strissel, Katherine J.; Lombardi, Frank L.; Palmer, Julie R. (2017): Relationships Among Obesity, Type 2 Diabetes, and Plasma Cytokines in African American Women. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 25 (11), S. 1916–1920.

Deutsche Diabetes Gesellschaft (2018): S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes. In: *Diabetologie und Stoffwechsel* 13 (S 03), S. 1–58.

Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe (2018): Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes. zugegriffen über www.diabetesde.org am 06.11.2018.

Dieplinger, Benjamin; Egger, Margot; Gabriel, Christian; Poelz, Werner; Morandell, Elisabeth; Seeber, Beata et al. (2013): Analytical characterization and clinical evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of afamin in human plasma. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 425, S. 236–241.

Dinarello, Charles A.; Donath, Marc Y.; Mandrup-Poulsen, Thomas (2010): Role of IL-1beta in type 2 diabetes. In: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 17 (4), S. 314–321.

Dinesh Shah, Anoop; Langenberg, Claudia; Rapsomaniki, Eleni; Denaxas, Spiros; Pujades-Rodriguez, Mar; Gale, Chris P. et al. (2015): Type 2 diabetes and incidence of a wide range of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. In: *The Lancet* 385, S86.

Donath, Marc Y. (2014): Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. In: *Nature reviews. Drug discovery* 13 (6), S. 465–476.

Donath, Marc Y.; Shoelson, Steven E. (2011): Type 2 diabetes as an inflammatory disease. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (2), S. 98–107.

Duncan, Bruce B.; Schmidt, Maria Inês; Pankow, James S.; Ballantyne, Christie M.; Couper, David; Vigo, Alvaro et al. (2003): Low-grade systemic inflammation and the

development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. In: *Diabetes* 52 (7), S. 1799–1805.

Duque-Guimarães, Daniella E.; Ozanne, Susan E. (2013): Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24 (10), S. 525–535.

Eknoyan, Garabed; Nagy, Judit (2005): A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. In: *Advances in chronic kidney disease* 12 (2), S. 223–229.

Enroth, Stefan; Johansson, Asa; Enroth, Sofia Bosdotter; Gyllensten, Ulf (2014): Strong effects of genetic and lifestyle factors on biomarker variation and use of personalized cutoffs. In: *Nature communications* 5, S. 4684.

Fayfman, Maya; Pasquel, Francisco J.; Umpierrez, Guillermo E. (2017): Management of Hyperglycemic Crises: Diabetic Ketoacidosis and Hyperglycemic Hyperosmolar State. In: *The Medical clinics of North America* 101 (3), S. 587–606.

Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O. H.; Andersen, P. S.; Girardin, S. E. (2007): Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. In: *Clinical and experimental immunology* 147 (2), S. 227–235.

Fletcher, Barbara; Gulanick, Meg; Lamendola, Cindy (2002): Risk factors for type 2 diabetes mellitus. In: *The Journal of cardiovascular nursing* 16 (2), S. 17–23.

Forbes, Josephine M.; Cooper, Mark E. (2013): Mechanisms of diabetic complications. In: *Physiological reviews* 93 (1), S. 137–188.

Frohlich, M.; Imhof, A.; Berg, G.; Hutchinson, W. L.; Pepys, M. B.; Boeing, H. et al. (2000): Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. In: *Diabetes care* 23 (12), S. 1835–1839.

Fusello, Angela M.; Mandik-Nayak, Laura; Shih, Fei; Lewis, Robert E.; Allen, Paul M.; Shaw, Andrey S. (2006): The MAPK scaffold kinase suppressor of Ras is involved in ERK activation by stress and proinflammatory cytokines and induction of arthritis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (9), S. 6152–6158.

Gripon, Philippe; Rumin, Sylvie; Urban, Stephan; Le Seyec, Jacques; Glaise, Denise; Cannie, Isabelle et al. (2002): Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), S. 15655–15660.

- Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. In: *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6 (11), S. 1045–1056.
- GTEEx (The Genotype-Tissue Expression) Portal. accession number: phs000424.v7.p2 (2019). Online verfügbar unter <https://gtexportal.org/home/gene/ISL1>, zuletzt aktualisiert am 13.06.2019, zuletzt geprüft am 24.07.2019.
- Guthrie, Richard A.; Guthrie, Diana W. (2004): Pathophysiology of diabetes mellitus. In: *Critical care nursing quarterly* 27 (2), S. 113–125.
- Haga, S.; Nakano, M.; Ishizaki, H.; Roh, S. G.; Katoh, K. (2015): Expression of α -tocopherol-associated genes and α -tocopherol accumulation in Japanese Black (Wagyu) calves with and without α -tocopherol supplementation. In: *Journal of animal science* 93 (8), S. 4048–4057.
- Hak, A. E.; Pols, H. A.; Stehouwer, C. D.; Meijer, J.; Kiliaan, A. J.; Hofman, A. et al. (2001): Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86 (9), S. 4398–4405.
- Haupt, H.; Heide, K. (1964): Isolierung eines in Spuren vorkommenden tryptophanarmen alpha 1-Glykoproteins aus Humanserum. Isolation of several tryptophan-poor alpha 1-glycoproteins occurring in traces from human serum. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 10, S. 555–558.
- Heinrich, P. C.; Castell, J. V.; Andus, T. (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. In: *Biochemical Journal* 265 (3), S. 621–636.
- Held, U. (2010): Welche Arten von Studiendesigns gibt es und wie werden sie korrekt eingesetzt? In: *Swiss Med Forum* 10 (41).
- Hendrick, Andrew M.; Gibson, Maria V.; Kulshreshtha, Ambar (2015): Diabetic Retinopathy. In: *Primary care* 42 (3), S. 451–464.
- Herder, C. (2011): Marker der subklinischen Inflammation als Risikofaktoren des Typ 2 Diabetes: Ergebnisse aus epidemiologischen Kohortenstudien. Habilitationsschrift. Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Herder, C.; Carstensen, M.; Ouwens, D. M. (2013a): Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 15 Suppl 3, S. 39–50.
- Herder, Christian; Bongaerts, Brenda W. C.; Rathmann, Wolfgang; Heier, Margit; Kowall, Bernd; Koenig, Wolfgang et al. (2013b): Association of subclinical inflammation with

polyneuropathy in the older population: KORA F4 study. In: *Diabetes care* 36 (11), S. 3663–3670.

Herder, Christian; Kannenberg, Julia M.; Carstensen-Kirberg, Maren; Strom, Alexander; Bönhof, Gidon J.; Rathmann, Wolfgang et al. (2018): A Systemic Inflammatory Signature Reflecting Cross Talk Between Innate and Adaptive Immunity Is Associated With Incident Polyneuropathy: KORA F4/FF4 Study. In: *Diabetes* 67 (11), S. 2434–2442.

Herder, Christian; Ouwens, D. Margriet; Carstensen, Maren; Kowall, Bernd; Huth, Cornelia; Meisinger, Christa et al. (2015): Adiponectin may mediate the association between omentin, circulating lipids and insulin sensitivity: results from the KORA F4 study. In: *European journal of endocrinology* 172 (4), S. 423–432.

Herold, Gerd (Hg.) (2015): Innere Medizin 2015. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverl., S. 719–732

Holle, R.; Happich, M.; Löwel, H.; Wichmann, H. E. (2005): KORA—a research platform for population based health research. In: *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 67 Suppl 1, S19-25.

Holt, Richard I. G.; Groot, Mary de; Golden, Sherita Hill (2014): Diabetes and depression. In: *Current diabetes reports* 14 (6), S. 491.

Hotamisligil, Gökhan S. (2010): Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. In: *Cell* 140 (6), S. 900–917.

Hotamisligil, Gökhan S. (2017): Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. In: *Nature* 542 (7640), S. 177–185.

Hsieh, Yi-Lin; Lee, Fang-Hsin; Chen, Chien-Liang; Chang, Ming-Fong; Han, Pei-Hsuan (2016): Factors Influencing Intention to Receive Examination of Diabetes Complications. In: *Asian nursing research* 10 (4), S. 289–294.

Hubalek, Michael; Buchner, Hannes; Mörtl, Manfred G.; Schlembach, Dietmar; Huppertz, Berthold; Firulovic, Branka et al. (2014): The vitamin E-binding protein afamin increases in maternal serum during pregnancy. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 434, S. 41–47.

Imamura, Fumiaki; O’Connor, Laura; Ye, Zheng; Mursu, Jaakko; Hayashino, Yasuaki; Bhupathiraju, Shilpa N.; Forouhi, Nita G. (2016): Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. In: *British Journal of Sports Medicine* 50 (8), S. 496–504.

International Diabetes Federation (2006): The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. Zugegriffen über www.idf.org am 13.11.2018.

International Diabetes Federation (2017): IDF DIABETES ATLAS. Eighth edition; zugegriffen über www.diabetesatlas.org am 06.03.2018.

Jacinto, Estela; Facchinetti, Valeria; Liu, Dou; Soto, Nelyn; Wei, Shiniu; Jung, Sung Yun et al. (2006): SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. In: *Cell* 127 (1), S. 125–137.

Jeong, Dae Hoon; Kim, Hyoung Kyu; Prince, Abd-Ei Bary; Lee, Dae Sim; Kim, Young Nam; Han, Jin; Kim, Ki Tae (2008): Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. In: *Journal of gynecologic oncology* 19 (3), S. 173–180.

Jerkovic, Lidija; Voegelé, Andreas F.; Chwatal, Sabine; Kronenberg, Florian; Radcliffe, Catherine M.; Wormald, Mark R. et al. (2005): Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression. In: *Journal of proteome research* 4 (3), S. 889–899.

Johnson, Gary L.; Lapadat, Razvan (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5600), S. 1911–1912.

Kayali, A. G.; Austin, D. A.; Webster, N. J. (2000): Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. In: *Diabetes* 49 (11), S. 1783–1793.

Kharitonov, Alexei; Shiyanova, Tatiyana L.; Koester, Anja; Ford, Amy M.; Micanovic, Radmila; Galbreath, Elizabeth J. et al. (2005): FGF-21 as a novel metabolic regulator. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (6), S. 1627–1635.

Kim, Beom-Jun; Lee, Young-Sun; Lee, Sun-Young; Park, Sook-Young; Dieplinger, Hans; Ryu, Sung Ho et al. (2012): Afamin secreted from nonresorbing osteoclasts acts as a chemokine for preosteoblasts via the Akt-signaling pathway. In: *Bone* 51 (3), S. 431–440.

Kleeff, Jorg; Whitcomb, David C.; Shimosegawa, Tooru; Esposito, Irene; Lerch, Markus M.; Gress, Thomas et al. (2017): Chronic pancreatitis. In: *Nature reviews. Disease primers* 3, S. 17060.

Kleinberger, Jeffrey W.; Pollin, Toni I. (2015): Undiagnosed MODY: Time for Action. In: *Current diabetes reports* 15 (12), S. 110.

Knudsen, S. T.; Foss, C. H.; Poulsen, P. L.; Andersen, N. H.; Mogensen, C. E.; Rasmussen, L. M. (2003): Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2

diabetic patients with microvascular complications. In: *European journal of endocrinology* 149 (1), S. 39–42.

Kolb, H.; Mandrup-Poulsen, T. (2005): An immune origin of type 2 diabetes? In: *Diabetologia* 48 (6), S. 1038–1050.

Kolb, H.; Mandrup-Poulsen, T. (2010): The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. In: *Diabetologia* 53 (1), S. 10–20.

Kollerits, Barbara; Lamina, Claudia; Huth, Cornelia; Marques-Vidal, Pedro; Kiechl, Stefan; Seppälä, Ilkka et al. (2017): Plasma Concentrations of Afamin Are Associated With Prevalent and Incident Type 2 Diabetes: A Pooled Analysis in More Than 20,000 Individuals. In: *Diabetes care* 40 (10), S. 1386–1393.

Kotas, Maya E.; Medzhitov, Ruslan (2015): Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. In: *Cell* 160 (5), S. 816–827.

Kratzer, Ingrid; Bernhart, Eva; Wintersperger, Andrea; Hammer, Astrid; Walzl, Sabine; Malle, Ernst et al. (2009): Afamin is synthesized by cerebrovascular endothelial cells and mediates alpha-tocopherol transport across an in vitro model of the blood-brain barrier. In: *Journal of neurochemistry* 108 (3), S. 707–718.

Kronenberg, Florian; Kollerits, Barbara; Kiechl, Stefan; Lamina, Claudia; Kedenko, Lyudmyla; Meisinger, Christa et al. (2014): Plasma concentrations of afamin are associated with the prevalence and development of metabolic syndrome. In: *Circulation. Cardiovascular genetics* 7 (6), S. 822–829.

Kyriakis, J. M.; Avruch, J. (1996): Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 18 (7), S. 567–577.

Lakhtakia, Ritu (2013): The history of diabetes mellitus. In: *Sultan Qaboos University medical journal* 13 (3), S. 368–370.

Lichenstein, H. S.; Lyons, D. E.; Wurfel, M. M.; Johnson, D. A.; McGinley, M. D.; Leidli, J. C. et al. (1994): Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (27), S. 18149–18154.

Lisi, Sabrina; Sisto, Margherita; Ribatti, Domenico; D'Amore, Massimo; Lucro, Raffella de; Frassanito, Maria Antonia et al. (2014): Chronic inflammation enhances NGF- β /TrkA system expression via EGFR/MEK/ERK pathway activation in Sjögren's syndrome. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 92 (5), S. 523–537.

- Liu, Jingxuan; Walp, Erik R.; May, Catherine Lee (2012): Elevation of transcription factor Islet-1 levels in vivo increases β -cell function but not β -cell mass. In: *Islets* 4 (3), S. 199–206.
- Maahs, David M.; West, Nancy A.; Lawrence, Jean M.; Mayer-Davis, Elizabeth J. (2010): Epidemiology of type 1 diabetes. In: *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39 (3), S. 481–497.
- Mahajan, Anubha; Taliun, Daniel; Thurner, Matthias; Robertson, Neil R.; Torres, Jason M.; Rayner, N. William et al. (2018): Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. In: *Nature genetics* 50 (11), S. 1505–1513.
- Mathis, Diane (2013): Immunological goings-on in visceral adipose tissue. In: *Cell metabolism* 17 (6), S. 851–859.
- Medzhitov, Ruslan (2010): Inflammation 2010: new adventures of an old flame. In: *Cell* 140 (6), S. 771–776.
- Mitchell, Simon; Vargas, Jesse; Hoffmann, Alexander (2016): Signaling via the NF κ B system. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 8 (3), S. 227–241.
- Moshage, H. J.; Janssen, J. A.; Franssen, J. H.; Hafkenscheid, J. C.; Yap, S. H. (1987): Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. In: *The Journal of clinical investigation* 79 (6), S. 1635–1641.
- Müller, S.; Martin, S.; Koenig, W.; Hanifi-Moghaddam, P.; Rathmann, W.; Haastert, B. et al. (2002): Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. In: *Diabetologia* 45 (6), S. 805–812.
- Nakamura, Kayo; Nakatsuka, Noriko; Jinnin, Masatoshi; Makino, Takamitsu; Kajihara, Ikko; Makino, Katsunari et al. (2015): Serum concentrations of Flt-3 ligand in rheumatic diseases. In: *Bioscience trends* 9 (5), S. 342–349.
- Nishio, H.; Dugaiczky, A. (1996): Complete structure of the human alpha-albumin gene, a new member of the serum albumin multigene family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15), S. 7557–7561.
- Nov, Ori; Kohl, Ayelet; Lewis, Eli C.; Bashan, Nava; Dvir, Irit; Ben-Shlomo, Shani et al. (2010): Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation. In: *Endocrinology* 151 (9), S. 4247–4256.

Nunemaker, Craig S.; Chung, H. Grace; Verrilli, Gretchen M.; Corbin, Kathryn L.; Upadhye, Aditi; Sharma, Poonam R. (2014): Increased serum CXCL1 and CXCL5 are linked to obesity, hyperglycemia, and impaired islet function. In: *The Journal of endocrinology* 222 (2), S. 267–276.

Oliveira, Alexandre G.; Araújo, Tiago G.; Carvalho, Bruno de Melo; Rocha, Guilherme Z.; Santos, Andrey; Saad, Mario J. A. (2018): The Role of Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Insulin Resistance and Diabetes. In: *Frontiers in endocrinology* 9, S. 503.

Opstal-van Winden, Annemieke W. J.; Krop, Esmeralda J. M.; Kåredal, Monica H.; Gast, Marie-Christine W.; Lindh, Christian H.; Jeppsson, Marina C. et al. (2011): Searching for early breast cancer biomarkers by serum protein profiling of pre-diagnostic serum; a nested case-control study. In: *BMC cancer* 11, S. 381.

Osborn, Olivia; Olefsky, Jerrold M. (2012): The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. In: *Nature medicine* 18 (3), S. 363–374.

Panee, Jun (2012): Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. In: *Cytokine* 60 (1), S. 1–12.

Parent, Romain; Marion, Marie-Jeanne; Furio, Laetitia; Trépo, Christian; Petit, Marie-Anne (2004): Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. In: *Gastroenterology* 126 (4), S. 1147–1156.

Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B. E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M. H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. In: *Endocrine reviews* 22 (2), S. 153–183.

Penno, Megan A. S.; Klingler-Hoffmann, Manuela; Brazzatti, Julie A.; Boussioutas, Alex; Putoczki, Tracy; Ernst, Matthias; Hoffmann, Peter (2012): 2D-DIGE analysis of sera from transgenic mouse models reveals novel candidate protein biomarkers for human gastric cancer. In: *Journal of proteomics* 77, S. 40–58.

Peral de Castro, Celia; Jones, Sarah A.; Harris, James (2015): Autophagy Controls the Production and Secretion of IL-1 β . In: *In M. A. Hayat (Ed.), Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging (Vol. 6)*, S. 201–209.

Polonsky, Kenneth S. (2012): The past 200 years in diabetes. In: *The New England journal of medicine* 367 (14), S. 1332–1340.

Pradhan, Aruna D. (2001): C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. In: *JAMA* 286 (3), S. 327.

Rathmann, W.; Haastert, B.; Icks, A.; Löwel, H.; Meisinger, C.; Holle, R.; Giani, G. (2003): High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target

populations for efficient screening. The KORA survey 2000. In: *Diabetologia* 46 (2), S. 182–189.

Rathmann, W.; Kowall, B.; Heier, M.; Herder, C.; Holle, R.; Thorand, B. et al. (2010): Prediction models for incident type 2 diabetes mellitus in the older population: KORA S4/F4 cohort study. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 27 (10), S. 1116–1123.

Rathmann, W.; Strassburger, K.; Heier, M.; Holle, R.; Thorand, B.; Giani, G.; Meisinger, C. (2009): Incidence of Type 2 diabetes in the elderly German population and the effect of clinical and lifestyle risk factors: KORA S4/F4 cohort study. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 26 (12), S. 1212–1219.

Rehman, Jalees; Considine, Robert v.; Bovenkerk, Jason E.; Li, Jingling; Slavens, Catharine A.; Jones, Rose Marie; March, Keith L. (2003): Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. In: *Journal of the American College of Cardiology* 41 (8), S. 1408–1413.

Ritorto, Maria Stella; Borlak, Jürgen (2011): Combined serum and tissue proteomic study applied to a c-Myc transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma identified novel disease regulated proteins suitable for diagnosis and therapeutic intervention strategies. In: *Journal of proteome research* 10 (7), S. 3012–3030.

Rivas, Fabiola (2010): In this Issue: Inflammation. In: *Cell* 140 (6), 755,757.

Rock, Kenneth L.; Latz, Eicke; Ontiveros, Fernando; Kono, Hajime (2010): The sterile inflammatory response. In: *Annual review of immunology* 28, S. 321–342.

Rodbard, D. (1974): Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. In: *Clinical chemistry* 20 (10), S. 1255–1270.

Saltiel, Alan R.; Olefsky, Jerrold M. (2017): Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (1), S. 1–4.

Sapkota, Lokendra Bahadur; Thapa, Sangita; Subedi, Nuwadatta (2017): Correlation study of adenosine deaminase and its isoenzymes in type 2 diabetes mellitus. In: *BMJ open diabetes research & care* 5 (1), e000357.

Sarbassov, D. D.; Guertin, David A.; Ali, Siraj M.; Sabatini, David M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712), S. 1098–1101.

Savant, Adrienne P.; McColley, Susanna A. (2017): Cystic fibrosis year in review 2016. In: *Pediatric pulmonology* 52 (8), S. 1092–1102.

- Sawatzky, Deborah A.; Willoughby, Derek A.; Colville-Nash, Paul R.; Rossi, Adriano G. (2006): The Involvement of the Apoptosis-Modulating Proteins ERK $\frac{1}{2}$, Bcl-xL and Bax in the Resolution of Acute Inflammation in Vivo. In: *The American Journal of Pathology* 168 (1), S. 33–41.
- Schubert, Ralf; Geiger, Helmut; Zielen, Stefan; Baer, Patrick C. (2009): Simultaneous detection of ERK-, p38-, and JNK-MAPK phosphorylation in human adipose-derived stem cells using the Cytometric Bead Array technology. In: *Journal of immunological methods* 350 (1-2), S. 200–204.
- Seeber, Beata; Morandell, Elisabeth; Lungert, Fabian; Wildt, Ludwig; Dieplinger, Hans (2014): Afamin serum concentrations are associated with insulin resistance and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. In: *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 12, S. 88.
- Seelaender, M.; Neto, J. C. Rosa; Pimentel, G. D.; Goldszmid, R. S.; Lira, F. S. (2015): Inflammation in the Disease: Mechanism and Therapies 2014. In: *Mediators of inflammation* 2015.
- Seres, Ildiko; Lorincz, Hajnalka; Varga, Viktoria E.; Szentpeteri, Anita; Somodi, Sandor; Harangi, Mariann et al. (2017): Serum afamin concentration positively correlates with the levels of pro-inflammatory adipokines in obesity. In: *Atherosclerosis* 263, e200.
- Serhan, Charles N. (2017): Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. In: *The FASEB Journal* 31 (4), S. 1273–1288.
- Sica, A.; Saccani, A.; Bottazzi, B.; Bernasconi, S.; Allavena, P.; Gaetano, B. et al. (2000): Defective Expression of the Monocyte Chemotactic Protein-1 Receptor CCR2 in Macrophages Associated with Human Ovarian Carcinoma. In: *The Journal of Immunology* 164 (2), S. 733–738.
- Spranger, J.; Kroke, A.; Mohlig, M.; Hoffmann, K.; Bergmann, M. M.; Ristow, M. et al. (2003): Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes: Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. In: *Diabetes* 52 (3), S. 812–817.
- Stanley, E. R.; Berg, K. L.; Einstein, D. B.; Lee, P. S.; Pixley, F. J.; Wang, Y.; Yeung, Y. G. (1997): Biology and action of colony—stimulating factor-1. In: *Molecular reproduction and development* 46 (1), S. 4–10.

Tabák, Adam G.; Herder, Christian; Rathmann, Wolfgang; Brunner, Eric J.; Kivimäki, Mika (2012): Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. In: *The Lancet* 379 (9833), S. 2279–2290.

Takei, Satoko; Hoshino, Tomoaki; Matsunaga, Kazuko; Sakazaki, Yuki; Sawada, Masanori; Oda, Hanako et al. (2011): Soluble interleukin-18 receptor complex is a novel biomarker in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 13 (2), R52.

Tan, Sock-Hwee; Lee, Albert; Pascovici, Dana; Care, Natasha; Birzniece, Vita; Ho, Ken et al. (2017): Plasma biomarker proteins for detection of human growth hormone administration in athletes. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 10039.

Tanaka, Toshio; Narazaki, Masashi; Kishimoto, Tadamitsu (2014): IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (10).

Thomas, Celeste C.; Philipson, Louis H. (2015): Update on diabetes classification. In: *The Medical clinics of North America* 99 (1), S. 1–16.

Thorand, B.; Kolb, H.; Baumert, J.; Koenig, W.; Chambless, L.; Meisinger, C. et al. (2005): Elevated Levels of Interleukin-18 Predict the Development of Type 2 Diabetes: Results From the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002. In: *Diabetes* 54 (10), S. 2932–2938.

Tolek, Arthit; Wongkham, Chaisiri; Prongvitaya, Siriporn; Silsirivanit, Atit; Roytrakul, Sittiruk; Khuntikeo, Narong; Wongkham, Sopit (2012): Serum $\alpha 1\beta$ -glycoprotein and afamin ratio as potential diagnostic and prognostic markers in cholangiocarcinoma. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 237 (10), S. 1142–1149.

Tomida, Takafumi; Ishimura, Masakazu; Iwaki, Masahiro (2017): A cell-based assay using HepaRG cells for predicting drug-induced phospholipidosis. In: *J. Toxicol. Sci.* 42 (5), S. 641–650.

Tracey, Kevin J. (2002): The inflammatory reflex. In: *Nature* 420 (6917), S. 853–859.

Tramontana, Alessandra; Dieplinger, Benjamin; Stangl, Gerhard; Hafner, Erich; Dieplinger, Hans (2018): First trimester serum afamin concentrations are associated with the development of pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus in pregnant women. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 476, S. 160–166.

Trayhurn, Paul (2013): Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. In: *Physiological reviews* 93 (1), S. 1–21.

Tsukagawa, Eri; Adachi, Hisashi; Hirai, Yuji; Enomoto, Mika; Fukami, Ako; Ogata, Kinuka et al. (2013): Independent association of elevated serum hepatocyte growth factor

levels with development of insulin resistance in a 10-year prospective study. In: *Clinical endocrinology* 79 (1), S. 43–48.

Turner, Mark D.; Nedjai, Belinda; Hurst, Tara; Pennington, Daniel J. (2014): Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1843 (11), S. 2563–2582.

Ünal, Evrim B.; Uhlitz, Florian; Blüthgen, Nils (2017): A compendium of ERK targets. In: *FEBS letters* 591 (17), S. 2607–2615.

Unnikrishnan, Ranjit; Anjana, Ranjit Mohan; Mohan, Viswanathan (2016): Diabetes mellitus and its complications in India. In: *Nature reviews. Endocrinology* 12 (6), S. 357–370.

van Dyke, Alison L.; Lang Kuhs, Krystle A.; Shiels, Meredith S.; Koshiol, Jill; Trabert, Britton; Loftfield, Erika et al. (2017): Associations between self-reported diabetes and 78 circulating markers of inflammation, immunity, and metabolism among adults in the United States. In: *PloS one* 12 (7), e0182359.

Voegelé, Andreas F.; Jerković, Lidija; Wellenzohn, Bernd; Eller, Patricia; Kronenberg, Florian; Liedl, Klaus R.; Dieplinger, Hans (2002): Characterization of the vitamin E-binding properties of human plasma afamin. In: *Biochemistry* 41 (49), S. 14532–14538.

Volmer-Thole, Maren; Lobmann, Ralf (2016): Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. In: *International Journal of Molecular Sciences* 17 (6).

Wang, Zhao V.; Scherer, Philipp E. (2016): Adiponectin, the past two decades. In: *Journal of Molecular Cell Biology* 8 (2), S. 93–100.

Wannamethee, S. Goya; Lowe, Gordon D. O.; Rumley, Ann; Cherry, Lynne; Whincup, Peter H.; Sattar, Naveed (2007): Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men. In: *Diabetes care* 30 (5), S. 1200–1205.

Weir, Gordon C.; Bonner-Weir, Susan (2004): Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. In: *Diabetes* 53 Suppl 3, S16-21.

Welsh, G. I.; Hers, I.; Berwick, D. C.; Dell, G.; Wherlock, M.; Birkin, R. et al. (2005): Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. In: *Biochemical Society transactions* 33 (Pt 2), S. 346–349.

Welters, Alena; Klüppel, Carina; Mrugala, Jessica; Wörmeyer, Laura; Meissner, Thomas; Mayatepek, Ertan et al. (2017): NMDAR antagonists for the treatment of diabetes mellitus- Current status and future directions. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 19 Suppl 1, S. 95–106.

- Wisse, Brent E. (2004): The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. In: *Journal of the American Society of Nephrology* : *JASN* 15 (11), S. 2792–2800.
- World Health Organization (2016): Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization
- Wu, G. X.; Lin, Y. M.; Zhou, T. H.; Gao, H.; Pei, G. (2000): Significant down-regulation of alpha-albumin in human hepatoma and its implication. In: *Cancer letters* 160 (2), S. 229–236.
- Ye, J. (2009): Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. In: *International journal of obesity (2005)* 33 (1), S. 54–66.
- You, Wen-Peng; Henneberg, Maciej (2016): Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. In: *BMJ open diabetes research & care* 4 (1), e000161.
- Yudkin, John S.; Stehouwer, C. D. A.; Emeis, J. J.; Coppack, S. W. (1999): C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (4), S. 972–978.
- Zelová, Hana; Hošek, Jan (2013): TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 62 (7), S. 641–651.

Anhang

Inflammatorischer Biomarker	Abkürzung
Chemokine (19)	
Chemokin (C-C Motif) Ligand 4	CCL4
Chemokin (C-C Motif) Ligand 19	CCL19
Chemokin (C-C Motif) Ligand 20	CCL20
Chemokin (C-C Motif) Ligand 23	CCL23
Chemokin (C-C Motif) Ligand 25	CCL25
Chemokin (C-C Motif) Ligand 28	CCL28
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 1	CXCL1
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 5	CXCL5
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 6	CXCL6
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 9	CXCL9
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 10	CXCL10
Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 11	CXCL11
Eotaxin	Eotaxin
Fraktalkin	CX3CL1
Interleukin-8	IL-8
Monozyten Chemotaktisches Protein-1	MCP-1
Monozyten Chemotaktisches Protein-2	MCP-2
Monozyten Chemotaktisches Protein-3	MCP-3
Monozyten Chemotaktisches Protein-4	MCP-4
TNF-Rezeptor Superfamilie (3)	
Osteoprotegerin	OPG
Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 5	CD40
Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 9	TNFRSF9
Wachstumsfaktoren (11)	
Endothelwachstumsfaktor-A	VEGF-A
Fibroblastenwachstumsfaktor 5	FGF-5
Fibroblastenwachstumsfaktor 19	FGF-19
Fibroblastenwachstumsfaktor 21	FGF-21
Fibroblastenwachstumsfaktor 23	FGF-23
<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>	Ft3L
Hepatozyten-Wachstumsfaktor	HGF
Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor 1	CSF-1
Stammzellfaktor	SCF
Transformierender Wachstumsfaktor α	TGF α
Zytokine (26)	
Chemokine (C-C Motif) Ligand 3	MIP-1 α (CCL3)
Interferon gamma	IFN-gamma
Interleukin-1 α	IL-1 α
Interleukin-2	IL-2
Interleukin-4	IL-4
Interleukin-5	IL-5
Interleukin-6	IL-6
Interleukin-7	IL-7
Interleukin-10	IL-10
Interleukin-12 Untereinheit β	IL-12B
Interleukin-13	IL-13
Interleukin-17A	IL-17A
Interleukin-17C	IL-17C
Interleukin-18	IL-18
Interleukin-20	IL-20
Interleukin-24	IL-24
Interleukin-33	IL-33

Leukämieinhibierender Faktor	LIF
Onkostatin M	OSM
<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>	TSLP
Tumornekrosefaktor α	TNF α
Tumornekrosefaktor β	TNF β
Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand	TRAIL
<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 12</i>	TWEAK
<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14</i>	TNFSF14
<i>Tumor necrosis factor related activation-induced cytokine</i>	TRANCE
Sonstige (34)	
Adenosin-Desaminase	ADA
Artemin	ARTN
Axin-1	Axin-1
Beta-Nerv Wachstumsfaktor	Beta-NGF
Caspase-8	CASP-8
<i>CUB Domain Containing Protein 1</i>	CDCP1
Cystatin D	CST5
<i>Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor</i>	DNER
<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	EIF4EBP1
<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	GDNF
Interleukin-2 Rezeptoruntereinheit β	IL-2RB
Interleukin-10 Rezeptoruntereinheit α	IL-10RA
Interleukin-10 Rezeptoruntereinheit β	IL-10RB
Interleukin-15 Rezeptoruntereinheit α	IL-15RA
Interleukin-18 Rezeptor 1	IL-18R1
Interleukin-20 Rezeptoruntereinheit α	IL-20RA
Interleukin-22 Rezeptoruntereinheit α 1	IL-22RA1
<i>Latency-associated peptide transforming growth factor beta-1</i>	LAP TGF β 1
Leukämieinhibierender Faktor Rezeptor	LIF-R
Matrixmetalloproteinase 1	MMP-1
Matrixmetalloproteinase 10	MMP-10
Natürlicher Killerzellrezeptor 2B4	CD244
Neurotrophin-3	NT-3
Neurturin	NRTN
Programmierter Zelltod 1 Ligand 1	PD-L1
Protein S100-A12	EN-RAGE
<i>signaling lymphocytic activation molecule family member 1</i>	SLAMF1
<i>Signal transducing adapter molecule binding protein</i>	STAMPB
<i>SIR2-like protein 2</i>	SIRT2
Sulfotransferase 1A1	ST1A1
<i>T-cell surface glycoprotein CD5</i>	CD5
<i>T cell surface glycoprotein CD6 isoform</i>	CD6
<i>T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain</i>	CD8A
Urokinasetyp Plasminogenaktivator	uPA

Tabelle 13: Biomarker der Inflammation des OLINK-Inflammation Panels

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Christian Herder für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Zudem möchte ich meinem Co-Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Thomas Meißner, der mit jederzeit für konstruktive Gespräche zur Verfügung stand, danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Carstensen-Kirberg bedanken, die durch die Planung und persönliche Betreuung diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Roden und dem Deutschen Diabetes Zentrum für die Unterstützung dieser Arbeit, die alle Materialien zur Verfügung gestellt und die Rahmenbedingungen für diese Arbeit geliefert haben.

Zudem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Inflammation des DDZ bedanken, insbesondere bei Frau Corinna Niersmann und Frau Karin Röhrig, die mir allzeit theoretische und praktische Hilfestellung leisteten, sowie bei Frau Dr. Haifa Maalmi, die mir bei der statistischen Auswertung der Arbeit eine große Hilfe war.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Florian Kronenberg an der Universität Innsbruck bedanken, der stets für Rückfragen zum Thema Afamin zur Verfügung stand und der den Afamin-Datensatz zur Verfügung stellte.

Mein Dank gilt weiterhin allem medizinischen Personal, das an der Erhebung der Daten der KORA F4 Studie beteiligt war, sowie allen Probanden, die an der Studie beteiligt waren. Zudem möchte ich mich bei Frau Prof. Annette Peters (Helmholtz Zentrum München), Herrn Prof. Wolfgang Koenig (Deutsches Herzzentrum München) und Herrn Prof. Wolfgang Rathmann (DDZ) bedanken, die KORA-Daten für die Auswertung zur Verfügung gestellt haben. Die Forschungsplattform KORA (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) wurde initiiert und finanziert vom Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie vom Freistaat Bayern gefördert wird.

Besonders möchte ich auch meiner Verlobten Marie und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die unermüdliche Stärkung und Motivierung danken.