

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Medizinische Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin

---

# **Einfluss von Kalorienrestriktion auf den Metabolismus**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**„doctor rerum naturalium“**

**(Dr. rer. nat.)**

**in der Wissenschaftsdisziplin „Experimentelle Ernährungsmedizin“**

**eingereicht an der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Universität Potsdam**

**von**

**Franziska Schwarz**

**Potsdam, den 27.10.2014**

Gutachter

Prof. Dr. Joachim Spranger

Prof. Dr. Florian J. Schweigert

Prof. Dr. Matthias Blüher

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-83147  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-83147>

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	4
Liste der Abkürzungen.....	6
1. Zielstellung .....	8
2. Hintergrund .....	10
2.1 Übergewicht und Adipositas .....	10
2.2 Diabetes mellitus.....	11
2.3 Regulation von Energiehomöostase und Körpergewicht.....	12
2.3.1 Endokrines System und Kontrolle des Körpergewichts.....	13
2.3.2 Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (FGF21) .....	14
2.3.3 Vaspin .....	15
2.4 Therapieoption Gewichtsreduktion .....	16
2.4.1 Kalorienrestriktion als Konzept der Krankheitsprävention .....	17
2.5. Abschätzung des Erkrankungsrisikos über Scores.....	19
2.6 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus.....	22
2.6.1 Lebenszyklus.....	23
2.6.2 Alterungsprozess .....	25
2.6.3 Kalorienrestriktion als Konzept zur Verlängerung der Lebensspanne in <i>C.elegans</i> .....	25
3. Methoden.....	28
3.1 Humane Studien.....	28
3.1.1 Studiendesign & Kohorte .....	28
3.1.2 Phänotypisierung.....	30
3.2 Handhabung des Nematoden <i>C.elegans</i> .....	33
3.2.1 Stämme.....	33
3.2.2 Haltung und Pflege von <i>C.elegans</i> .....	34
3.2.3 Dauerkulturen und gefrorene Stocks .....	35
3.2.4 Synchronisation .....	36
3.2.5 <i>Life Span Assay</i> .....	36
3.2.6 Untersuchung des Intermediärstoffwechsels mittels Metabolomics .....	38
3.2.7 RNA-Interferenz.....	40
3.2.8 RNA-Isolation und Expressionsanalyse.....	43
4. Statistik .....	46
4.1 Humane Studien.....	46

4.2 Analyse der Studien mit <i>C.elegans</i> .....	48
5. Ergebnisse.....	49
5.1 Etablierung einer Nachbeobachtung für die MeSyBePo Studie.....	49
5.1.1 Verteilung und prospektive Veränderungen der phänotypischen Charakteristika der Probanden .....	49
5.1.2 Aussagekraft von FGF21 für die Prädiktion von metabolischen Störungen.....	51
5.1.3 Aussagekraft von Vaspin für die Prädiktion von Störungen der Glukosehomöostase.....	54
5.2 Etablierung einer Langzeit-Nachbeobachtung der Gruppe von Patienten mit standardisierter Intervention.....	57
5.2.1 Inzidenz des T2DM und des Metabolischen Syndroms.....	61
5.2.2 Gewichtsverläufe unter Intervention .....	62
5.2.3 Validierung der Eigenangabe der Gewichtsentwicklung für die Gesamtkohorte .....	65
5.2.4 Schätzung des kardiovaskulären Risikos nach Eigenangabe des Gewichtsverlaufs .....	67
5.3 Analyse von verschiedenen Fütterungsregimen mit unterschiedlicher Nahrungsverfügbarkeit auf die Langlebigkeit in <i>C.elegans</i> .....	71
5.3.1 Etablierung: Einfluss exogener und endogener Faktoren auf die Lebensspanne .....	71
5.3.2 Einfluss variierender Restriktionsregime auf die Lebensspanne .....	73
5.4 Analyse von Metabolitenprofilen in unterschiedlichen Langlebigkeits-Modellen.....	77
5.4.1 Gezielte Hemmung ausgewählter Reaktionswege des Tryptophanstoffwechsels .....	79
6. Diskussion.....	82
6.1. Nachbeobachtung der MesyBepo Studie.....	82
6.2 Langzeit-Nachbeobachtung nach standardisierter Intervention .....	91
6.2.1 Validierung der Eigenangabe der Gewichtsentwicklung.....	95
6.2.2 T2DM, MetS und kardiovaskuläres Risiko .....	95
6.3 Analyse unterschiedlicher Faktoren auf die Langlebigkeit von <i>C.elegans</i> .....	101
6.3.1 Einfluss endo- und exogener Faktoren auf die Lebensspanne.....	101
6.3.2 Einfluss variierender Restriktionsregimes auf die Lebensspanne .....	102
6.3.3 Aufschluss metabolische Muster über Regelkreise der Lebensspanne .....	106
7. Zusammenfassung.....	109
Summary .....	112
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	114
Anhang .....	122
Selbständigkeitserklärung .....	127
Lebenslauf .....	128
Publikationen.....	129

Danksagung ..... 130

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung zur Unterscheidung von Störungen des Glukosestoffwechsels. ....	12
Tabelle 2: Klassifizierungskriterien des Glukosestoffwechsels .....	30
Tabelle 3: Verwendete <i>C. elegans</i> -Stämme, Genetik und dokumentierte Eigenschaften.....	33
Tabelle 4: NGM-Agar-Zusammensetzung .....	34
Tabelle 5: Kulturmedien für Bakterien .....	35
Tabelle 6: Lösungen Cryokonservation .....	36
Tabelle 7: Bleichlösung.....	36
Tabelle 8: Sequenznamen und Proteinbezeichnung der untersuchten siRNA-Stämme.....	41
Tabelle 9: Ansätze Mastermix (1) DNase Verdau, (2) cDNA-Synthese und (3) qRT-PCR .....	43
Tabelle 10: genspezifische Primerpaare.....	45
Tabelle 11: Parameterverteilung der Follow-up Kohorte .....	50
Tabelle 12: Parameterverteilung FGF-21 Kohorte .....	51
Tabelle 13: Parameterverteilung der Vaspin Kohorte.....	54
Tabelle 14: Parameterverteilung der Teilnehmer der Gewichtsreduktion .....	58
Tabelle 15: Parameterverteilung der Teilnehmer der Kontrollen.....	60
Tabelle 16: Fallzahlen für T2DM und MetS der Gewichtsreduktionsteilnehmer (1) .....	61
Tabelle 17: Fallzahlen für T2DM und MetS der Gewichtsreduktionsteilnehmer (2) .....	62
Tabelle 18: Zehnjähriges kardiovaskuläres Risiko (1).....	67
Tabelle 19: Zehnjähriges kardiovaskuläres Risiko (2).....	69
Tabelle 20: Deskriptive Statistik der <i>Life Span Assays</i> N2 .....	74
Tabelle 21: Deskriptive Statistik der <i>Life Span Assays</i> CB1370 .....	75
Tabelle 22: Deskriptive Statistik der <i>Life Span Assays</i> CB1038 .....	77
Tabelle 23: Metabolitenkandidaten aus GC -MS und UPLC-FT-ICR-MS .....	79
Abb. 1: Adulter Hermaphrodit. ....	22
Abb. 2: <i>C elegans</i> : Lebenszyklus eines Hermaphroditen.....	24
Abb. 3: Restriktionsregime und Langlebigkeit.....	26
Abb. 4: Entwicklung der Studienpopulation.....	29
Abb. 5: <i>Life Span</i> Schema . ....	37
Abb. 6: Endogene und exogene Einflussfaktoren auf die Lebensspanne. ....	38
Abb. 7: L4440 Vektor. ....	41
Abb. 8: Risikoabschätzungen in Abhängigkeit der FGF21-Spiegel .....	53
Abb. 9: Gewichtsverlauf nach Studienbeginn der Teilnehmer der Intervention und Kontrollen .....	63
Abb. 10: Individuelle Gewichtsverläufe nach Studienbeginn.....	64
Abb. 11: Validierung Gewichtsentwicklung.....	65
Abb. 12: relative Veränderung des kardiovaskulären Risikos pro Jahr, .....	68
Abb. 13: relative Veränderung des kardiovaskulären Risikos pro Jahr .....	70
Abb. 14: Kaplan-Meier Statistik - Effekt bakterieller Verdünnungen auf die Lebensspanne.....	72
Abb. 15: Kaplan-Meier Statistik verschiedener genetischer Modelle .....	73
Abb. 16: Kaplan-Meier Statistik variierender Restriktionsregimes (Wildtyp N2).....	74
Abb. 17: Kaplan-Meier Statistik variierender Restriktionsregimes (CB1370 daf-2(e1370)III) .....	75
Abb. 18: Kaplan-Meier Statistik variierender Restriktionsregimes (CF1038 daf-16(mu86)I).....	76
Abb. 19: Metabolitenprofile.....	78

Abb. 20: Überlebensfunktionen (*Life Span-Assay*) NL2099 mit siRNA,..... 81  
Abb. 21: *Life Span Assay* (T-2,3-DO, alh-7, ACSD, tph-1)..... 81

## Liste der Abkürzungen

ACSD	2-Amino-3-Carboxymuconat-6-Semialdehyd-Decarboxylase
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
<i>ad libitum</i>	nicht portioniert/ frei verfügbar
Alh-7	Aldehyd-Dehydrogenase
<i>baseline</i>	Eingangsuntersuchung
BMI	<i>Body Mass Index</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFU	Kolonie formende Einheiten ( <i>colony forming units</i> )
CGC	Genetisches Zentrum welches alle verfügbaren <i>C.elegans</i> Stämme sammelt, erhält und an Forschungseinrichtungen verteilt ( <i>Caenorhabditis Genetics Center</i> )
Cyc	Cytochrom C Reduktase
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DR	Diätetische Restriktion
EOD	gestaffelte Nahrungsaufnahme in 24h Intervallen ( <i>every other day feeding</i> )
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
Follow-up	Folgeuntersuchung
FUDR	Floxuridine /5-Fluorodeoxyuridin
GC-TOF-MS	kombinierte Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Analysesystem
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GW <sub>b,f</sub>	Gewichtsreduktion <sub>Baseline/ Follow-up</sub>
HDL	<i>high-density</i> Lipoprotein
IF	Intermittierendes Fasten
IFG	gestörte Nüchtern glukose
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor ( <i>insulin-like growth factor</i> )
IGT	gestörte Glukosetoleranz
Ins	Insulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kontrolle
LC-FT-MS	kombinierte Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Analysesystem
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
<i>Life Span Assay</i>	Lebenszeitanalyse
M	Molarität
MeSyBePo	Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam
MetS	Metabolisches Syndrom
MW	Mittelwert
NECP ATP	<i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel</i>
NGM	Nemathoden-Agar ( <i>nematode growth medium</i> )
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
OR	Chancenverhältnis ( <i>Odds Ratio</i> )
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR

R <sub>b,f</sub>	Recall <sub>Baseline/ Follow-up</sub>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA Interferenz ( <i>RNA interference</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
sDR	Diätetische Restriktion auf Agarplatten
SEM	Standardfehler
siRNA	kleine interferierende Ribonukleinsäure ( <i>small interfering ribonucleic acid</i> )
Stabw	Standardabweichung
T1DM	Typ-1-Diabetes, <i>Diabetes mellitus</i> Typ 1
T2DM	Typ-2-Diabetes, <i>Diabetes mellitus</i> Typ 2
T-2,3-DO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TBF	Gesamtkörperfett ( <i>total body fat</i> )
TG	Triglyzeride
Tph-1	Tryptophan-Hydroxylase
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
WT	Wildtyp

# 1. Zielstellung

Wir leben in einer ständig älter werdenden Gesellschaft, der es an Konsumgütern, vor allem Lebensmitteln, nicht mangelt. Inzwischen verursacht dieser Zustand erstzunehmende gesundheitliche Konsequenzen. Nicht nur steigt die altersbedingte Morbidität, ebenso häufen sich Erkrankungen deren Entstehung auf Übergewicht und Bewegungsmangel zurückzuführen sind. Somit ist nicht nur das Verständnis der pathologischen Mechanismen in Folge von Übergewicht und Bewegungsmangel von Bedeutung, sondern auch die Interaktion mit dem Alterungsprozess und den beeinflussenden Faktoren der Lebens- und Gesundheitsspanne.

Nach den aktuellen Leitlinien wird bei bestehender Adipositas eine Gewichtsreduktion empfohlen. Deren Effekte werden oft kurzfristig als positiv bewertet, die langfristigen Folgen sind aber unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde eine prospektive Nachbeobachtung der Studie Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam (MeSyBePo) realisiert. Diese Studie schließt insgesamt über 2000 Teilnehmer mit Querschnittsdaten ein. Verlaufsdaten anthropometrischer und metabolischer Parameter wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit von bisher 584 Teilnehmern mit einem mittleren Follow-up von 5,3 Jahren ausgewertet. Mit Hilfe dieser prospektiven Studie sollten Prädiktoren für die Diabetesentstehung und für metabolische Veränderungen identifiziert und untersucht werden. An eine Subkohorte von 60 Teilnehmern einer Interventionsstudie zur Gewichtsreduktion mit nicht-randomisierten Kontrollen, wurde eine separate Fragestellung adressiert. In Abhängigkeit des Gewichtsverlaufs sollte eine Abschätzung des langfristigen, anhand von Scores kalkulierten, kardiovaskulären Risikos erfolgen. Des Weiteren diene die Subkohorte der Validierung der Selbstangaben der Probanden zum Gewichtsverlauf und dem Vergleich der Veränderungen von metabolischen Parametern unter der Intervention im Langzeitverlauf.

In Anbetracht der epidemiologischen Hinweise, dass eine gewollte Gewichtsabnahme auf Dauer sogar die Lebenserwartung einschränken kann, wurde in einem zweiten Teil der Promotion ein experimenteller Ansatz gewählt, um die molekularen Mechanismen und das Zusammenspiel von Gewichtsreduktion und Alterungsprozess bzw. der Lebensspanne untersuchen zu können. Hier wurde der Nematode *C.elegans* als Modell etabliert und die Effekte kurzfristiger und repetitiver Kalorienrestriktion analysiert. Es ist bislang unklar, ob eine zeitlich begrenzte Gewichtsreduktion, die beim Menschen typischerweise von einer Gewichtszunahme abgelöst wird, tatsächlich einen Effekt auf die langfristige Morbidität und Mortalität hat. In *C.elegans* ist gezeigt, dass eine dauerhafte Kalorienrestriktion zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt. Vergleichbar führt eine dauerhafte Gewichtsabnahme, wie sie durch bariatrische Chirurgie erreicht wird, ebenfalls zu einer Lebensverlängerung bei morbid adipösen Menschen. Ob eine diätetisch induzierte

Gewichtsabnahme, die fast unweigerlich auf lange Sicht wieder von einer Gewichtszunahme begleitet wird, nicht sogar schädlich ist, ist völlig unklar. Wir haben hier untersucht, wie sich kurzfristige Kalorienrestriktion mit nachfolgender *ad-libitum* Fütterung auf die Lebensspanne bei *C.elegans* auswirkt. Zusätzlich haben wir versucht, mittels Metabolitenprofilen die Stoffwechselwege zu identifizieren, die genetische und diätetische Langlebighkeitsmodelle verbinden und damit zentral in der Regulation der Lebensspanne sind.

Damit ergaben sich zusammengefasst folgende Ziele dieser Arbeit:

1. Etablierung einer Nachbeobachtung für die MesyBepo Studie, um Prädiktoren für das metabolische Syndrom identifizieren zu können.
2. Etablierung eines Langzeit-Follow-up einer Gruppe von Patienten mit standardisierter Intervention und gewollter Gewichtsabnahme, um die Effekte einer kurzfristigen Gewichtsabnahme im Langzeitverlauf beurteilen zu können.
3. Analyse von verschiedenen Fütterungsregimen mit unterschiedlicher Nahrungsverfügbarkeit auf die Langlebighkeit bei *C.elegans*
4. Analyse von Metabolitenprofilen in unterschiedlichen genetischen und diätetischen Langlebighkeitsmodellen von *C.elegans*, um zentrale Stoffwechselwege in der Regulation der Lebensspanne zu identifizieren.

## 2. Hintergrund

### 2.1 Übergewicht und Adipositas

Übergewicht (BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) und Adipositas (BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) bezeichnen beide eine Vermehrung des Körpergewichts [1] mit unterschiedlichem Ausmaß, wobei Adipositas eine ausgeprägte Vermehrung des Körpergewichts beschreibt. Häufig geht Übergewicht im Verlauf mehrerer Jahre in eine manifeste Adipositas über [2]. Gut 50% aller Deutschen waren 2003 übergewichtig, 13% sogar adipös [2]. Neue Berechnungen zur Adipositasprävalenz gehen sogar von 30% bis zum Jahr 2015 aus [3].

Der steigende Anteil an Körperfett gilt als Folge eines überwiegend sitzenden Lebensstils in Kombination mit ungesunder Ernährung [1]. Übergewicht sowie Adipositas beeinträchtigen die Gesundheit, wobei Übergewicht u.a. das Risiko für chronische Erkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck oder Arteriosklerose erhöht [2, 3]. Allgemein gilt, dass mit fortschreitender Zunahme des Körperfetts das Risiko für assoziierte Erkrankungen und die Gesamtmortalität steigt [4, 5]. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Entstehung von Komplikationen ist die Körperfettverteilung. So wird zwischen einer abdominellen bzw. viszeralen Fettverteilung, welche die Bauchregion und damit die Eingeweide betrifft, und einer peripheren Fettverteilung, welche vorwiegend Beine und Hüfte aber auch die Arme betrifft, unterschieden. Insbesondere die viszerale Adipositas ist, im Vergleich zur peripheren Adipositas, mit gesundheitlichen Risiken verbunden [4, 5]. Als Ursache gilt dabei insbesondere das intraabdominale Fettgewebe, dessen hohe endokrine Aktivität zu Veränderungen intrazellulärer Signalwege sowie der Sekretion bedeutender Signalstoffe führt [6].

Mögliche Folgeerkrankungen können Störungen des Kohlehydratstoffwechsels wie Insulinresistenz und *Diabetes mellitus* Typ 2, Fettstoffwechselstörungen, wie Hyper- oder Dyslipidämien aber auch arterielle Hypertonie sein. Je nach Schweregrad und Kombination der einzelnen Symptome und Erkrankungen spricht man vom Metabolischen Syndrom [6, 7]. Dieser Symptomenkomplex weist ein hohes atherogenes Potential auf und gilt als wesentlicher Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz und Schlaganfall [2, 3]. Als präventive Maßnahme zur Vorbeugung von Übergewicht gelten laut WHO - ein geringer Verzehr von Fett dafür ein erhöhter Verzehr von Früchten und Gemüse, die eingeschränkte Aufnahme von Zuckern, viel Bewegung mit dem Ziel einer ausgeglichenen Energiebilanz und einem Normalgewicht [1]. Präventive und therapeutische Maßnahmen werden jedoch häufig aufgrund psychischer und soziokultureller Ursachen (z.B. fehlenden

Willen zur Veränderung) [2, 8], aber auch aufgrund von vielfältigen und komplexen genetischen Prädispositionen erschwert [9]. So ist der Bedarf an erfolgreichen individuellen als auch an populationsbasierten Ansätzen sehr hoch [2].

## 2.2 Diabetes mellitus

*Diabetes mellitus* bezeichnet eine chronische Stoffwechselerkrankung, gekennzeichnet durch erhöhte Blutglukosewerte. Der *Diabetes mellitus* wird in zwei Hauptformen unterschieden: dem Typ-1-Diabetes (T1DM) und dem Typ-2-Diabetes (T2DM) [10].

Etwa 10% der Diabetiker leiden an T1DM. Dieser betrifft meist Kinder und Jugendliche, die unter einer verminderten Insulinabgabe bzw. an einem vollständigen Insulinmangel leiden. Begründet ist dies durch eine Autoimmunreaktion des Körpers gegen die Langerhansschen Inselzellen des Pankreas. Die Behandlung des T1DM erfolgt durch Zufuhr von Insulin. Der Großteil der Diabetiker (90%) ist vom Typ 2 betroffen. Es handelt sich dabei meist um Erwachsene mittleren bis höheren Alters, jedoch steigt auch die Zahl der betroffenen Kinder und Jugendlichen stetig an. Der T2DM ist stark von genetischen als auch von Umweltfaktoren abhängig. So produziert das Pankreas zunächst nur relativ zu wenig Insulin, zudem ist dessen Sekretion verzögert und die Wirkung am Zielgewebe reduziert. In Folge einer unzureichenden Kompensationsreaktion kommt es zur Manifestation des T2DM. Mit dem T2DM sind zahlreiche mikrovaskuläre und makrovaskuläre Komplikationen assoziiert: Als mikrovaskulären Schäden treten Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie auf, die makrovaskulären Schäden beziehen sich auf große Arterien (Makroangiopathie), wodurch kardiovaskuläre Erkrankungen auftreten können (Schlaganfall und Herzinfarkt). Im Gegensatz zum T1DM manifestiert sich der T2DM meist langsam und unbemerkt. Die Entwicklung von T2DM ist stark mit Übergewicht und Adipositas assoziiert [10].

Der T1DM wird über den Nachweis der entsprechenden Autoantikörper diagnostiziert. Der T2DM kann in mehreren Stufen auf Grundlage der Diagnostik (Nüchternglukose, oraler Glukosetoleranztest – oGTT oder HbA1c) eingeteilt werden. So erfolgt eine Unterscheidung zwischen einer gestörten Nüchternglukose (*impaired fasting glukose* = IFG) und einer gestörten Glukosetoleranz (*impaired glukose tolerance* = IGT) an Hand von Grenzwerten der Blutglukosekonzentration [10, 11] (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Einteilung zur Unterscheidung von Störungen des Glukosestoffwechsels.**

Gestörte Nüchtern glukose (*impaired fasting glucose* = IFG), gestörte Glukosetoleranz (*impaired glucose tolerance* = IGT), Typ 2 *Diabetes mellitus* = T2DM, Einteilung ADA 2004 [10]

	Nüchtern- blutzucker (mg/dl)	Blutzucker 120 Min (mg/dl)	HbA1c (%)
Gesund	<100	<140	<5,7
IFG	100-109,99	>140	
IGT	<100	140-199,99	
IFG/IGT	100-109,99	140-199,99	5,7-6,5
T2DM	≥110	≥200	≥6,5

### 2.3 Regulation von Energiehomöostase und Körpergewicht

Über die Nahrung erhalten wir Stoffe für den Aufbau und die Erneuerung von Körpersubstanz. Ebenso dienen sie durch die Gewinnung der dafür notwendigen Energie der Aufrechterhaltung physiologischer Körperfunktionen. Die Regulation der Nahrungszufuhr und somit der Energiebilanz des Körpers erfolgt durch ein neurohumorales System [12], welches unter anderem im Hypothalamus reguliert wird. Hier wird durch sensorische, neuroendokrine und metabolische Signale die Energiehomöostase reguliert [13]. Die zentralnervöse Verarbeitung dieser Signale wirkt sich auf die Energiezufuhr und den Energieverbrauch aus z.B. durch Hunger, Sättigungsverhalten oder körperliche Aktivität, die auch rückwirkend wieder als Modulatoren des System wirken [8, 14]. Diese Regulation trägt zur Aufrechterhaltung eines relativ konstanten Körpergewichts bei [14]. Sie ist Teil physiologischer Mechanismen, die nur unter extremen Bedingungen Abweichungen eines individuell festgelegten Körpergewichts zulassen [8, 15]. So wurde aus Daten von Tiermodellen die *Set-Point*-Hypothese abgeleitet [14]. Diese besagt, dass das individuelle Körpergewicht unter bestimmten Umweltbedingungen determiniert ist und bei diesem Gewicht die Energieaufnahme dem Verbrauch entspricht. Wenn dies nicht der Fall ist, könnte einerseits bei einem zu hohen oder gar zu niedrigen Körpergewicht relativ zum individuellen Setpoint die Nahrungsaufnahme, Energieverbrauch bzw. körperliche Aktivität angeglichen werden [8, 14].

Diese Mechanismen scheinen sich jedoch nicht exakt auf den Menschen übertragen zu lassen. So wird der Effekt einer erzwungenen Gewichtsreduktion aufgehoben, sobald die Individuen wieder uneingeschränkten Zugang zu Nahrung haben [8, 14]. Das Ausgangsgewicht wird sehr schnell wieder erreicht und häufig sogar deutlich

überschritten [8], welches dann auf diesem neuen Niveau gehalten wird. Die Regulation ist demnach asymmetrisch, eine Gewichtsabnahme wird weniger toleriert als eine Zunahme. Die Zunahme wird demnach begünstigt bzw. zeitweise, insbesondere altersabhängig, nicht ausreichend kompensiert [14]. Diese mangelnde Kompensation einer adipogenen Umwelt bedingt eines der größten gesundheitlichen Probleme industrieller Staaten: einen überproportionalen Anstieg von Übergewicht und Adipositas.

### **2.3.1 Endokrines System und Kontrolle des Körpergewichts**

Das Endokrine System und das Nervensystem sind wichtige Kontroll- und Kommunikationssysteme des Organismus. Sie steuern die Körperfunktionen, von Wachstum über die Fortpflanzung bis zur Verdauung. Als Mediatoren zur Signalvermittlung des endokrinen Systems dienen Hormone, die in endokrinen Drüsen oder in Einzelzellen verschiedener Organe gebildet werden. Zu den klassischen Synthesorten gehören die Adenohypophyse, die Schilddrüse, die Nebenschilddrüse, die Nebennierenrinde, das endokrine Pankreas, sowie die Gonaden. Von dort aus gelangen die Hormone über den Blutkreislauf (endokrin) zu ihren Zielzellen, wirken direkt auf Nachbarzellen (parakrin), oder direkt am Synthesort (autokrin). Die jeweilige Wirkung wird über Hormonrezeptoren, die an der Plasmamembran, im Zytosol oder Zellkern lokalisiert sind, vermittelt. Die Hormonwirkung wird endogenen Rhythmen (u.a. Alterungsprozess, Menstruationszyklus, zirkadianer Tagesrhythmus) und akuten Anforderungen angepasst. Dies geschieht auf allen Ebenen, von Synthese, über Sekretion und Transport bis hin zur Wirkung am Rezeptor.

Auch der Gastrointestinaltrakt ist als ein Gewebe bekannt, das große Mengen von Hormonen produzieren kann. Zu den sekretorisch wirksamen Geweben mit zunehmender Bedeutung zählen seit kurzem Fett, Muskel als auch die Leber. Sowohl der Gastrointestinaltrakt als auch das Fettgewebe sind in der Lage, die Verdauung bzw. die Speicherung und Verfügbarkeit von Nährstoffen wesentlich zu beeinflussen. Besonders dem Fettgewebe kam in den letzten Jahren eine besondere Bedeutung als hormonell aktives Gewebe zu. Es sezerniert ‚Adipokine‘ und hat damit wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese von Adipositas und Diabetes. Die vom Muskelgewebe abgegebenen ‚Myokine‘, sowie die von der Leber als ‚Hepatokine‘ bezeichneten Hormone und hormonähnlichen Stoffe scheinen ebenfalls eine bedeutende Rolle in Bezug auf Adipositas [16, 17], Diabetes [17-19] und körperlicher Aktivität [20] einzunehmen und sind daher im Fokus aktueller Studien. Ebenso können die Vorhöfe des Herzens (Natriumhomöostase) sowie die Niere (Wasser- und Ionenhaushalt) neben anderen Geweben wie die Haut Hormone produzieren.

### 2.3.2 Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (FGF21)

Hormone sind körpereigene Substanzen, die nach der klassischen Definition aus endokrinen Drüsen in den Blutkreislauf abgegeben werden, um spezifisch an Zielorganen zu wirken. Inzwischen ist diese Definition um hormonähnliche Stoffe, wie zum Beispiel Neurotransmitter erweitert, ebenso können sowohl Proteine als auch Peptide, Aminosäureanaloga und Aminosäurederivate, Steroide, Lipide oder Fettsäurederivate, Eicosanoide und Vitamine als Hormone oder hormonähnliche Stoffe klassifiziert werden.

Hormone wie Insulin und Glucagon wirken regulatorisch im Stoffwechsel indem sie die Bereitstellung von Substraten regulieren und damit Einfluss auf die Energiehomöostase je nach Nährstoffversorgung nehmen. Ein hormonähnliches Peptid der Leber, ein Hepatokin, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (FGF21) scheint ebenfalls metabolisch aktiv zu sein [21].

FGF21 gehört zu einer Familie von Genen, die 23 Proteine codiert. Sie lassen sich in 3 Gruppen einteilen von denen die erste, die kanonischen FGFs, extrazellulär vorkommen und über Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, um intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren. Diese erste Gruppe der FGFs wirkt ausschließlich autokrin bzw. parakrin. Die FGFs der zweiten Gruppe agieren als intrazelluläre Signalmoleküle ähnlich ihren extrazellulären Vertretern [21, 22]. Zur dritten Gruppe, den hormonähnlichen FGFs, gehört auch FGF21. Hormonähnliche FGFs agieren hauptsächlich über die FGF-Rezeptorbindung und verlangen alpha- oder beta-Klotho also Cofaktoren [22]. Interessanterweise lassen sich kanonische und intrazelluläre FGFs in Vertebraten als auch in Invertebraten finden, hormonähnliche FGFs ließen sich bisher jedoch nur in Vertebraten nachweisen.

FGFs haben diverse Funktionen in der Entwicklung, Reparatur und im Stoffwechsel von Organismen. Ihnen kommt eine große Bedeutung in der Organdifferenzierung während der Embryonalzeit zu. Ohne FGFs wäre die Zell- und Gewebisdifferenzierung nicht möglich [22]. In die Gruppe der hormonähnlichen FGFs gehören FGF15 und FGF19, sowie FGF21 und FGF23. FGF15 hat bedeutenden Anteil an der Entwicklung des Nervensystems [22]. FGF19 kommt eine Bedeutung im Wachstum und der Differenzierung von Herz und Nervensystem in den frühen Entwicklungsstadien zu [23]. FGF15 als auch FGF19 haben zudem Anteil an der Regulation des Gallensäurestoffwechsels [22]. FGF23 wiederum ist ein physiologischer Regulator des Serumphosphatspiegels sowie des aktiven Vitamin D Spiegels.

Die Hauptfunktionen von FGF21 sind bisher noch nicht im Detail geklärt, man vermutet diese aber im Stoffwechsel [21, 22]. So ist bereits aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien bekannt, dass FGF21 in den Kohlehydrat- als auch in den Lipidstoffwechsel eingreifen kann [21, 22], indem es die Insulinsensitivität steigert, den Triglyceridspiegel senkt [24], die Lipolyse und Ketogenese in der Leber stimuliert [21, 25], sowie die Glukoseaufnahme in den Fettzellen

verbessert [24]. Insbesondere scheint FGF21 erst im Fall einer andauernden Hungerphase anzusteigen und unter diesen Umständen, in den Stoffwechsel einzugreifen.

### 2.3.3 Vaspin

Das Fettgewebe erfüllt viele lebensnotwendige Funktionen, darunter die Thermoregulation, der Schutz der inneren Organe, sowie Produktion von Steroidhormonen [17, 26]. Es besitzt zudem eine sekretorische Kapazität, die abhängig von der Masse des Fettgewebes ist [26]. Zu den vom Fettgewebe sezernierten Adipokinen zählt unter anderem Vaspin [27]. Vaspin ist zusätzlich den Serpinen zuzuzordnen [28, 29], einer Proteinklasse die Serinproteasen hemmt. Sie kommen in allen Lebewesen ubiquitär vor, mit der Hauptaufgabe der Regulation der Proteaseaktivität. Humanes Vaspin setzt sich aus 415 Aminosäuren zusammen. Auch wenn Vaspin den Serpinen zuzuordnen ist, konnte bisher keine Serinprotease identifiziert werden, die von Vaspin gehemmt wird. Ebenso konnte bisher nicht gezeigt werden, dass rekombinantes Vaspin die Proteaseaktivität von Trypsin und anderen Proteasen hemmen kann [30].

Die Adipositas geht mit einer Fehlfunktion bzw. einer Entzündung des Fettgewebes einher, welche mit breitgefächerten Gesundheitsproblemen verbunden ist [31, 32]. Dabei kommt es zu einer Verschiebung der ausgesendeten Signale in die proinflammatorische, atherogene und diabetogene Richtung [27, 31-33]. Großen Anteil daran hat die erhöhte Produktion proinflammatorischer Adipokine [34, 35]. Welche Rolle Vaspin innerhalb dieser Mechanismen hat, und ob es pro- oder antiinflammatorisch wirkt, kann bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden. Entdeckt wurde es im Tiermodell für Adipositas und T2DM [30] und wird dort hauptsächlich vom viszeralen Fettgewebe sezerniert [30, 36]. Exprimiert wird es vorwiegend in Haut, Hypothalamus, Pankreas und Magen [30].

In übergewichtigen Mäusen verbesserte es die Glukosetoleranz, Insulin-Sensitivität und verminderte die Nahrungsaufnahme [37]. Auch Daten humaner Studien lassen den Rückschluss auf Zusammenhänge zwischen hohen Vaspin-Spiegeln und erhöhtem Körpergewicht sowie erhöhten Vaspin-Spiegeln und der Regulation des Blutzuckers zu [27, 37, 38]. Bisher ist unklar, wie die Sekretion von Vaspin mit der Insulin-Sensitivität und dem Glukose-Stoffwechsel verbunden sein könnte [37].

## 2.4 Therapieoption Gewichtsreduktion

Mit fortschreitendem Übergewicht steigt das Gesundheitsrisiko für chronische Erkrankungen sowie die Gesamtmortalität [2-5]. Ziel jeder Adipositas-therapie ist daher eine Gewichtsreduktion zur Verbesserung der Adipositas-assoziierten Risikofaktoren und Erkrankungen. Je nach Schweregrad der vorliegenden Adipositas wird eine Gewichtsabnahme von mindestens 5% bis maximal 30% des Ausgangskörpergewicht angesetzt [39]. Dabei soll das Gesundheitsverhalten langfristig verbessert werden, um damit die Lebensqualität zu verbessern und dauerhaft das Gewicht zu halten [39]. Entsprechend der Leitlinie zur Prävention und Therapie von Adipositas [39] setzt sich eine mögliche Therapie aus drei Komponenten wie folgt zusammen: (1) Die Ernährungstherapie sieht eine verminderte Kalorienaufnahme täglich vor, welche über eine konsequente Fettreduktion, eine mäßig energiereduzierte Mischkost oder auch über den Mahlzeitenersatz mit Formula-Produkten erfolgen kann. (2) Zusätzlich soll im Rahmen der Bewegungstherapie die durchschnittliche Zeit für körperliche Aktivitäten auf drei bis fünf Stunden pro Woche erhöht werden. (3) Die Verhaltenstherapie dient der Unterstützung der erstgenannten, vor allem muss die Motivation an der Therapie erhalten bleiben, so dass die Betroffenen u.a. ein kontrolliertes Essverhalten und Bewegungsverhalten erlernen. Nicht zu vergessen ist die Vermeidung von Rückfällen innerhalb der Interventionszeit als auch nach Abschluss der Therapie [39].

Kommerzielle Gewichtsreduktionsprogramme kombinieren häufig eine niedrig kalorische Kost mit Formula-Produkten und möchten eine Bewegungssteigerung sowie eine langfristige Verhaltensumstellung bewirken. Bei deutlich übergewichtigen Patienten (ab BMI 30) zeigt das 6-monatige 'Optifast'-Programm eine gute anfängliche Gewichtsabnahme von 15-25% an. Allerdings nimmt die Mehrzahl der Teilnehmer mehr als 50% des verlorenen Gewichts innerhalb von 1-2 Jahren wieder zu. Aus diesem Grund wird in Deutschland eine Weiterentwicklung, das 'Optifast®52'-Programm angeboten. Das bekannteste und am weitesten verbreitetste Programm der 'Weight Watchers' ermöglicht bei mäßig adipösen Personen eine mittlere Gewichtsreduktion von 3-4,5 kg [40] innerhalb eines Jahres. Weiter Programme sind u.a. 'ICH nehme ab' [41] 'Bodymed' sowie 'Kinderleicht' und das 'Obeldicks'-Programm [42, 43] für adipöse Kinder. Das DGE-Programm 'Ich nehme ab', ist ein stark verhaltenstherapeutisch ausgerichtetes Selbstmanagementprogramm, um eine mäßige Senkung des Körpergewichts zu erreichen und eine ausgewogene Ernährungsweise zu etablieren. Es wurde für mäßig übergewichtige Personen ohne Komorbiditäten konzipiert. In einer beratergestützten Anwendung führte das Programm nach einem Jahr zu einem mittleren Gewichtsverlust von 2,3 kg (Frauen) und 4,1 kg (Männer) bei gleichzeitiger Verbesserung der Nährstoffzusammensetzung [44].

Die mittlere Gewichtsreduktion dieser Programme variiert in Abhängigkeit der Art der Intervention, aber auch abhängig vom Ausgangs-BMI sehr stark [41, 43, 45, 46]. Ein direkter Vergleich der Programme ist daher kaum möglich und wenig sinnvoll. Von größerer Bedeutung ist daher, dass die Daten verfügbar sind, um den Betroffenen das jeweils passende Programm zuordnen zu können. Langzeitergebnisse, die den weiteren Verlauf dokumentieren, sind bisher kaum verfügbar, u.a. weil die Teilnehmerzahl über die Zeit stark abnimmt. Die Dropout-Rate liegt bei den einjährigen Programmen bereits zwischen 15 und 40% [44]. Besonders bei diesen Dropouts geht man von einem Rückfall in die alten Verhaltensmuster aus. Die verfügbaren Daten zeigen meist nur einen geringen langfristigen Gewichtserfolg von etwa zwei Kilogramm im Vergleich zum Startgewicht. Als Ausnahme wurden für 'Optifast®52'-Programm bessere Langzeiterfolge dokumentiert [44].

Neben den Programmen zur Gewichtsreduktion gibt es unterstützende medikamentöse Therapien ebenso sind chirurgische Eingriffe möglich.

#### **2.4.1 Kalorienrestriktion als Konzept der Krankheitsprävention**

Die konsequente Umstellung der Ernährung, insbesondere die Reduktion der Kalorien ist der entscheidende Faktor für die Gewichtsabnahme und weitere metabolische Effekte [40, 47]. Versuchsansätze mit Tiermodellen zeigen, dass eine Kalorienrestriktion die mittlere als auch die maximale Lebensspanne in vielen Spezies von der Hefe bis hin zu Primaten verlängern kann und die Annahme konservierter Regulationsmechanismen zulässt [48-50]. Allgemein versteht man unter der Restriktion eine um 10-50% verminderte Zufuhr von Nährstoffen und/ oder Kalorien ausgehend vom *ad libitum* Verzehr ohne eine Malnutrition zu verursachen [49, 51]. Im Fall von Nematoden und Hefen ist es jedoch möglich auch über eine vollständige Restriktion lebensverlängernde Effekte zu zeigen [49]. Die bisher dokumentierten Effekte solch einer vollständigen Restriktion belaufen sich auf das Zwei- bis Dreifache der durchschnittlichen Lebensspanne beider Spezies. Des Weiteren verlängert sich die reproduktive Phase und Resistenz gegenüber toxischen Substanzen, ähnliches gilt für Fliegen [49]. Auch in Nagern ist eine Verdopplung der Lebensspanne unter Restriktion dokumentiert, wobei sich durch die Intervention das Auftreten altersbedingter Symptome und Krankheiten wie Diabetes, Krebs oder Neurodegeneration vermindern lässt [49]. Nicht-humane Primaten zeigten eine verminderte Mortalität unter einer 20%igen Restriktion. Die Intervention wirkte sich positiv auf die Erhaltung des Gesundheitszustandes aus, insbesondere auf Parameter des Glukosestoffwechsels [52]. Daten humaner Studien belegen inzwischen auch, dass sich eine Kalorienrestriktion positiv auf die Blutglukosehomöostase [50], die zirkulierenden Lipide [50], den Blutdruck sowie auf Marker chronischer Entzündungen auswirken. Dabei ändern sich die Parameter der Morbidität in Abhängigkeit

vom Ausgangswert, bei einem hohen Ausgangsgewicht sind die größten Veränderungen zu erwarten [39]. Interventionen zur Gewichtsreduktion zielen nach den Leitlinien eine Gewichtssenkung von 5-20% an, die über wenige Wochen im Rahmen einer begleiteten Intervention erreicht werden soll [39]. Während die Motivation und Adhäsion in der intensiven Phase sehr hoch ist, fällt diese nach Beendigung der Programme oft stark ab [53, 54] und die dauerhafte Umsetzung der Maßnahmen zur Umstellung der Lebensstilfaktoren ist den Patienten bzw. Probanden selbst überlassen und resultiert in einer Wiedezunahme des verlorenen Gewichts [55, 56]. Welche langfristigen Folgen eine kurzfristige Restriktion mit nachfolgender Gewichtszunahme bewirkt ist bisher nicht eindeutig abzuschätzen. So gibt es Hinweise, dass insbesondere Schwankungen des Gewichts das Mortalitätsrisiko deutlich erhöhen kann [57]. Bisher ist als Nachteil einer Restriktion nur ein erhöhtes Risiko für Gallensteinerkrankungen bekannt. Daten weniger langwieriger Studien mit Freiwilligen unter einer 25%igen Restriktion decken sich mit den Primatendaten zum Einfluss auf den Stoffwechsel, lassen jedoch noch kaum eine Aussage zur Lebenserwartung zu [52]. Selbst wenn eine fortlaufende Kalorienrestriktion nicht in der Lage sein sollte die Lebenserwartung des Menschen zu verlängern, so scheint mindestens eine Verlängerung der Gesundheitsspanne [50] realistisch.

Dass eine langfristige Kalorienrestriktion mit Gewichtserhalt in der Lage sein kann, die menschliche Lebenserwartung zu verlängern [49, 50, 52] ist bisher für stark adipöse Patienten beschrieben, die sich chirurgischen Maßnahmen aus der Bariatrie unterzogen [58]. Um für diese Operation in Frage zu kommen, müssen die Patienten die notwendigen Kriterien erfüllen darunter u.a. ein BMI über 40 oder ein BMI über 35 mit begleitenden Erkrankungen, Schlafapnoe und mehrere vorherige erfolglose Ansätze einer Verhaltenstherapie zur Gewichtsreduktion [59, 60]. Es wird von zwei grundlegenden Ansätzen ausgegangen: dem restriktiven und malabsorptiven Verfahren, diese können auch kombiniert werden [59]. Während die restriktiven Verfahren das Ziel verfolgen die Menge aufgenommener Nahrung physikalisch einzuschränken (Magenballon, Magenband) erreichen malabsorptive Verfahren (Magenbypass) ihr Ziel, in dem ein Teil des Dünndarms umgangen wird und damit nicht vollständig verdaut und weniger absorbiert wird [59]. Je nach Verfahren verlieren die Patienten in den ersten zwei Jahren bis zu 70% des überschüssigen Gewichts [61], bei einer Kombination beider Ansätze bis zu 82% [59, 62]. Retrospektive als auch prospektive Studien decken sich in ihren Beobachtungen und Risikoberechnungen zu den positiven langfristigen Effekte auf die Gesundheit und die Überlebensraten im Vergleich zu nichtoperierten Kontrollen. Retrospektive Daten zeigen eine verminderte Mortalität für kardiovaskuläre Erkrankung postoperativ, sowie eine verminderte Gesamtmortalität [58, 63]. Durch Gewichtsreduktion zeigen sich wiederholt negative Assoziationen zwischen dem erniedrigtem Gewicht bzw. dem BMI und Parametern der Blutglukosehomöostase, des

Blutdruck als auch der Lipidparameter. Auch in prospektiven Studien wirkt sich die deutliche Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren auf das berechnete 10 Jahres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Framingham Score) [64], die Inzidenz von Diabetes [65], Myokardinfarkten, Schlaganfällen und Krebs aus [58]. Das Risiko sinkt, da die Patienten in den ersten Jahren der Nachuntersuchung aufgrund von Kontrolluntersuchungen öfter unter ärztlicher Aufsicht sind oder in Behandlung [66]. Die Nachteile aller bariatrischen Eingriffe besteht zum einen im OP-bedingten Risiko, zum anderen in der regelmäßige Kontrolle der Versorgung mit Vitaminen, Mineralstoffen und Proteinen, da diese durch den Eingriff oft eingeschränkt ist und einer lebenslangen Supplementierung bedarf [60].

## 2.5. Abschätzung des Erkrankungsrisikos über Scores

Mit einer Häufung der bereits erwähnten Symptome und Folgeerkrankungen von Übergewicht und Adipositas steigt das atherogene Potenzial [6, 7] und damit das Risiko für koronare Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz und Schlaganfall [2, 3]. Eine Intervention strebt die Verbesserung der verschiedenen Risikofaktoren wie Rauchen, Blutdruck, Blutlipide, Blutzuckerregulation an. Die Risikoabschätzung erfolgt über verschiedene *Scores*. Je nach *Score* gehen teilweise unterschiedliche Risikofaktoren ein bzw. werden diese unterschiedlich gewichtet.

Die am häufigsten verwendeten *Scores* für die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos sind der Framingham Score [67] und der PROCAM *Score* [68]. Ersterer wurde im Rahmen einer prospektiven Studie mit 5345 Personen und einem 12 Jahres Follow-up entwickelt. Neben dem Geschlecht gehen Alter, Blutlipidwerte (LDL-Cholesterin, Cholesterin, HDL-Cholesterin), Blutdruck, Diabetesstatus und Rauchen in die Berechnung ein [67]. Ausgegeben wird das prozentuale 10 jährige Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [67]. Im Vergleich dazu berücksichtigt der PROCAM *Score* zusätzlich nur den systolischen Blutdruck, sowie eine positive Familienanamnese [68], wobei die Daten an 5389 Personen mit einem 10 Jahres Follow-up erhoben wurden. Allerdings entspricht die für den Score verwendete Altersgruppe nicht der hier untersuchten, ebenso wenig wird zwischen den Geschlechtern differenziert. Ausgegeben wird hier das prozentuale Herzinfarkttrisiko in 10 Jahren [68].

Ebenso wird die Klassifizierung des Metabolischen Syndroms für die Abschätzung des Risikos einer koronaren Herzkrankheit [6, 7] genutzt. Das Metabolische Syndrom als Ansammlung mehrerer Risikofaktoren, darunter Adipositas, Bluthochdruck, Hyperglykämie und Dyslipidämie ist bereits mehrmals definiert worden. Erstmals 1988 von Reaven als Syndrom X betitelt, wurde es von der WHO 1998 als Krankheit definiert und als Metabolisches Syndrom namentlich benannt [7]. Laut WHO-Definition leiden die Patienten an dem Metabolischen Syndrom, wenn neben einer Insulinresistenz zwei weitere Bedingungen, darunter

Bluthochdruck, erhöhte Triglyceridspiegel, verringertes HDL-Cholesterin, ein erhöhter BMI oder einer erhöhte Ausscheidung von Albumin, erfüllt sind. Der Nachweis der unterschiedlichen Parameter, insbesondere der Insulinresistenz, erwies sich in der täglichen Praxis als schwierig und so wurde die Klassifizierung für den klinischen Alltag vereinfacht [7]. Diese modifizierte Variante des NECP ATP III (National Cholesterol Program's Adult Treatment Panel III) [69] sieht vor, dass drei von fünf Kriterien für die Klassifizierung erfüllt sein müssen: Nüchternblutzuckerwert ab 110 mg/dl, Triglyceridspiegel von 150 mg/dl oder höher, HDL-Cholesterin-Spiegel unter 40 mg/dl, Blutdruck ab 130/85 mm Hg und ein Taillenumfang von mindestens 102 cm [69]. Der Score legt den Schwerpunkt auf der Bemessung des kardiovaskulären Risikos, weniger Gewicht liegt dabei auf der Berücksichtigung der Blutglukose, welche die WHO stärker berücksichtigt. Ebenso existiert eine weitere Klassifizierung der *International Diabetes Federation (IDF)* von 2005, die sich besonders gut auf unterschiedliche ethnische Gruppen anwenden lässt. Ausgangspunkt der Klassifizierung ist die Zuordnung einer Adipositas gemessen am Taillenumfang (je nach Ethnie spezifiziert), sowie zwei weitere Merkmale der Folgenden: Erhöhte Triglyceride über 150 mg/dl oder eine bestehende Behandlung dessen; erniedrigtes HDL-Cholesterin bei Männern unter 40 mg/dl, bei Frauen unter 50 mg/dl oder eine bestehende Behandlung; gleiches gilt für erhöhte Blutdruckparameter (Systole von 130 mm Hg oder höher; Diastole von 85 mm Hg oder höher; erhöhte Nüchtern Blutzuckerwerte ab 100 mg/dl oder ein bereits diagnostizierter T2DM [70].

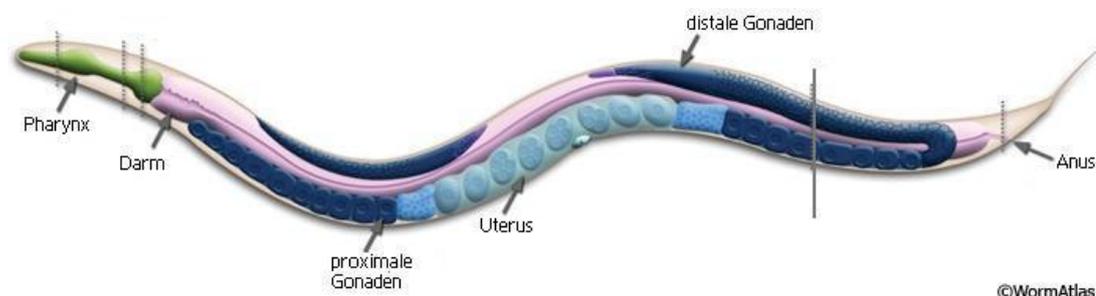
Diabetes geht in die genannten Scores mit in die Berechnung ein, die Unterscheidung erfolgt jedoch zumindest für den Framingham und PROCAM Score nur auf das Vorkommen oder das Nichtvorkommen eines diagnostizierten Diabetes. Störungen des Glukosestoffwechsels, die jedoch noch keine Diagnose eines Diabetes erlauben, sind somit nicht berücksichtigt.

Eine Klassifizierung der Blutzuckerhomöostase kann nach den Kriterien der ADA von 2004 [10, 70] erfolgen, eine Zuordnung erfolgt hier anhand eines Nüchternblutzuckerwertes sowie einem Wert nach 120 min. Daneben besteht bereits die Möglichkeit das Risiko ebenso in Form des Deutschen Diabetes Risiko Scores zu bestimmen [71]. In die Berechnung gehen Alter, Blutdruck, Körpergröße, Bewegung, Ernährungsgewohnheiten, Rauchen sowie der Taillenumfang ein.

Im Überblick kann man sagen, dass Übergewicht und Adipositas die Gesundheit beeinträchtigen und das Risiko für eine breite Spanne von chronischen Erkrankungen erhöhen [1, 2]. Als Hauptursache gilt ein ungesunder Lebensstil, der die fortschreitende Zunahme an Körperfett bedingt [1]. Entsprechend ist primäres Ziel jeder Therapie der kontrollierte Abbau dieser überschüssigen Fettmasse, wesentlicher Faktor dabei: eine reduzierte Gesamtkalorienzufuhr und eine Gewichtsabnahme [39]. Die Art der Umsetzung kann allein durch Umstellung des Lebensstils sowie in Kombination mit operativen Verfahren, oder medikamentös erfolgen [39, 56, 57, 60] - und scheitert doch in vielen Fällen aufgrund mangelnder Adhärenz zu den angestrebten Veränderungen im Lebensstils [40-45]. Studien an Modellorganismen weisen bisher der Reduktion der Gesamtkalorienzufuhr ein großes Potenzial nach, langfristig positiv auf die Gesundheit und Lebensdauer Einfluss zu nehmen [47-51]. So gilt es in der Praxis die Umsetzbarkeit der Therapie allgemein zu verbessern [53, 72, 73], sie aber auch dem Patienten entsprechend seiner physiologischen Voraussetzungen und potentieller Risiken anzupassen. Im Gegenzug sind es die Modellsysteme, welche Aufschluss über die Netzwerke und Mechanismen geben können, die Einfluss auf Vitalität und Lebensdauer nehmen, und es erlauben die Relevanz einzelner Modifikationen auf das System zu untersuchen [48, 49, 74].

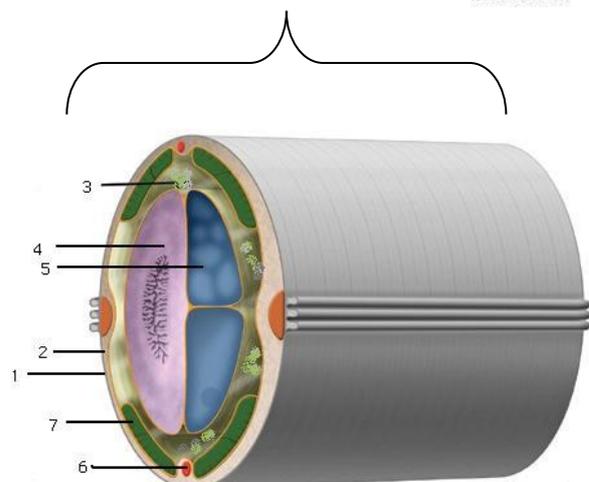
## 2.6 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) ist ein weit verbreiteter Modellorganismus auch in der Adipositas-Forschung [75, 76]. *C.elegans* ist ein bodenbewohnender Nematode gemäßigter Breiten, der sich vorwiegend von Bakterien ernährt [77, 78]. Der adulte Wurm (Abb. 1) ist etwa einen Millimeter lang, hat einen Durchmesser von ca. 65  $\mu\text{m}$  und ist transparent. Der zylindrische unsegmentierte Wurm besitzt exkretorische Systeme, Neuronen (6) und einen Muskelapparat (7). Die ektodermale Körperhülle besteht aus einer sehr stabilen Cuticula (1) und einer Hypodermis (2). Ein Pseudocoelom (3) trennt ektodermale von entodermaler Körperhülle. Der entodermalen Körperhülle gehören pharyngale und intestinale Zellen (4) an, bei adulten Tieren zusätzlich die Gonaden (5) [74]. *C.elegans* weist zwei Geschlechter auf: Selbstbefruchtende Hermaphroditen (XX), die den überwiegenden Anteil der Populationen ausmachen und männliche Nematoden (X0), die mit einer Häufigkeit von ca. 0,05 % auftreten [71]. Der Nematode zeichnet sich durch Eutelie aus. Sinngemäß bedeutet es den programmierten Zelltod einer definierten Zellzahl über die Larvenentwicklung bis zum adulten Nematoden. Hermaphroditen weisen durch diesen Prozess 959 und adulte Männchen 1031 somatische Nuclei auf [79].



### Abb. 1: Adulter Hermaphrodit.

Strukturen lichtmikroskopisch sichtbar markiert, rechts: Querschnitt durch den Nematoden, 1 Cuticula, 2 Hypodermis, 3 Pseudocoelom, 4 intestinale Zellen, 5 die Gonaden, 6 Nervenstrang, 7 Muskel [71]



Sydney Brenner führte den Nematoden als Erster in den 1960er Jahren als Modell in die wissenschaftliche Forschung ein. Ergebnisse aus der Grundlagenforschung an *C.elegans* lassen sich auf ein breites Organismenspektrum beispielhaft anwenden. So war *C.elegans* der erste vollständig sequenzierte Vielzeller, an ihm wurde die Methodik der RNA-Interferenz etabliert, wie auch die des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) [74].

Für eine Reihe von Vertebratengenomen existiert ein direktes Homolog in *C.elegans* [74]. Für jene Gene, die bisher für die Pathogenese humaner Erkrankungen ermittelt werden konnten, sind ca. 65% auch als Homolog im Nematoden bekannt [76, 80]. Der Nematode wird aufgrund dessen als Modell zur Betrachtung konservierter Signalwege des Alterungsprozesses und der Entwicklung altersbedingter Erkrankungen genutzt [80, 81]. Ebenso besteht großes Interesse ihn als Modell für die Adipositas-Forschung zu nutzen. Die Kongruenz von Enzymen im Fettstoffwechsel von Wirbeltieren und Nematoden ist sehr hoch. Mittels RNA-Interferenz wurde gezielt nach Genen gesucht, die für die Einlagerung von Fett und dessen Mobilisierung verantwortlich sind. Daraus ergab sich, dass mindestens 400 Gene an diesem Prozess Anteil haben [76]. Ebenso lässt sich über *E.coli* als Nahrungsquelle gezielt der Effekt verschiedenster Diäten, angereichert mit ausgewählten Fettsäuren untersuchen [76]. Die Möglichkeiten sind zahlreich und die Umsetzung realistisch.

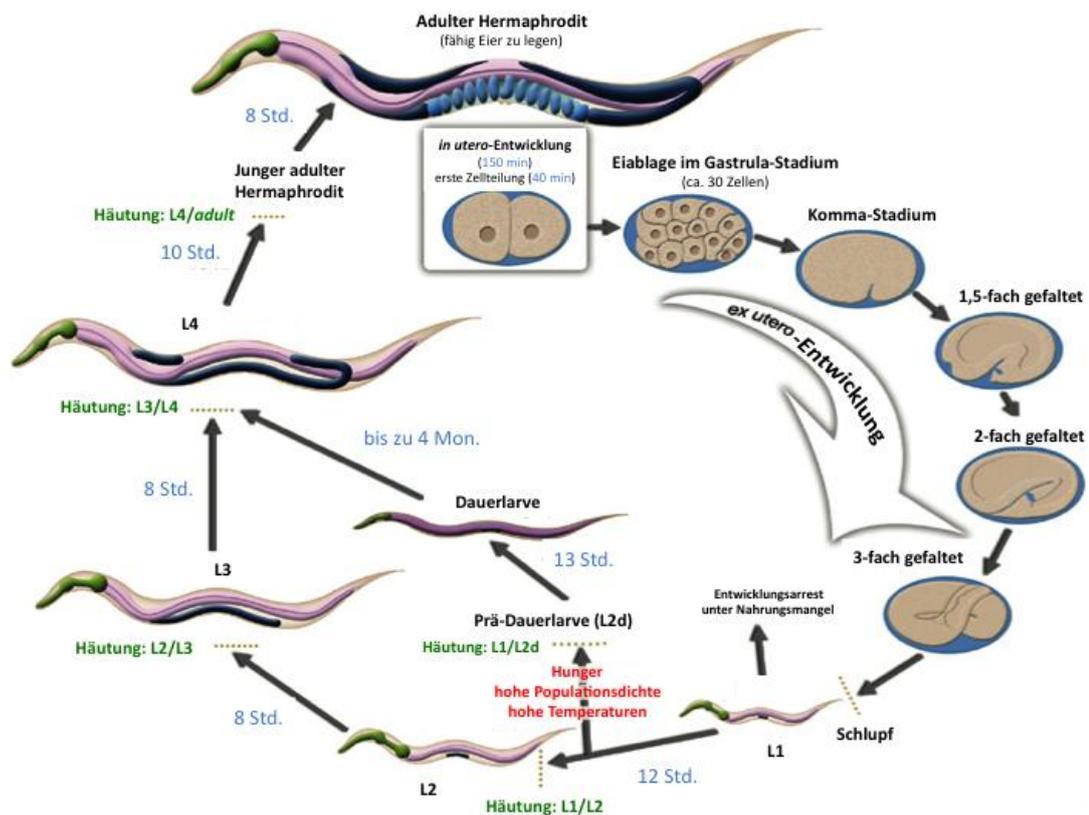
Verglichen mit anderen eukaryotischen Modellen ist der Nematode aufgrund der geringen Größe, der kurzen Lebensspanne und kurzer Reproduktionszeiten ein beliebtes Modell. Die Vielzahl von Mutanten erlaubt es, Funktionen von Genen zu überprüfen. Insbesondere die Möglichkeit, die Expression von Genen gezielt über siRNA zu reduzieren erlaubt es Hypothesen zu testen, die nur unter größtem Aufwand in komplexeren Modellen möglich wären. Die vollständige Transparenz des Wurms ermöglicht zudem zusätzliche mikroskopische Untersuchungen [76] u.a. mit fluoreszenz-markierten Proteinen.

### **2.6.1 Lebenszyklus**

Ein adulter Hermaphrodit produziert in den 25-30 Tagen seines Lebens rund 300 Eier [82, 83]. Der Embryonalentwicklung (Abb. 2) folgen nach dem Schlupf vier Larvenstadien (L1-L4). Das Ende jedes Larvenstadiums ist durch eine Häutung und die Bildung einer larvenspezifischen *Cuticula* gekennzeichnet [79, 84]. Nach Beendigung des L4 Stadium geht der Wurm in das junge adulte, dann in das reife adulte Stadium über. Der Beginn der Eiablage markiert die vollständige Reifung.

Sind unmittelbar nach dem Schlüpfen keine Nährstoffe verfügbar, arretiert die Larve im L1-Stadium, in dem sie wenige Tage überleben kann. Tritt ein Nährstoffmangel während des Übergangs von der L1- zu L2-Larve auf oder steigt die Populationsdichte zu stark an, wird die Larvenentwicklung unterbrochen und L1-Larven sind in der Lage in das alternative

L2d-Stadium überzugehen. Bei anhaltend ungünstigen Bedingungen entwickelt sich hieraus die Dauerlarve, die mehr als 4 Monate überleben kann. Steigt die Nährstoffkonzentration wieder an, entwickelt sich aus der Dauerlarve das L4-Stadium und letztendlich ein fortpflanzungsfähiges adultes Tier [71, 82].



**Abb. 2: *C. elegans*: Lebenszyklus eines Hermaphroditen**

Die Entwicklung vom Ei zum adulten Tier ist bei 22°C innerhalb weniger Tage abgeschlossen (modifiziert nach Altun, Z. F. & Hall, D. H.). Diese erfolgt über vier Larvenstadien (L1-L4), deren Übergang jeweils durch eine Häutung markiert ist und der die Ausbildung einer neuen *Cuticula* folgt. Unter mangelhaften Bedingungen (geringe Nahrung, hohe Populationsdichte) kommt es zum Arrest und damit zum Übergang in das Dauerlarvenstadium. Steigt die Nährstoffkonzentration wiederum an wird die Entwicklung fortgesetzt. Grün: Pharynx, Dunkelblau: Gonaden, Rosa: Darm, Hellblau: Uterus

### 2.6.2 Alterungsprozess

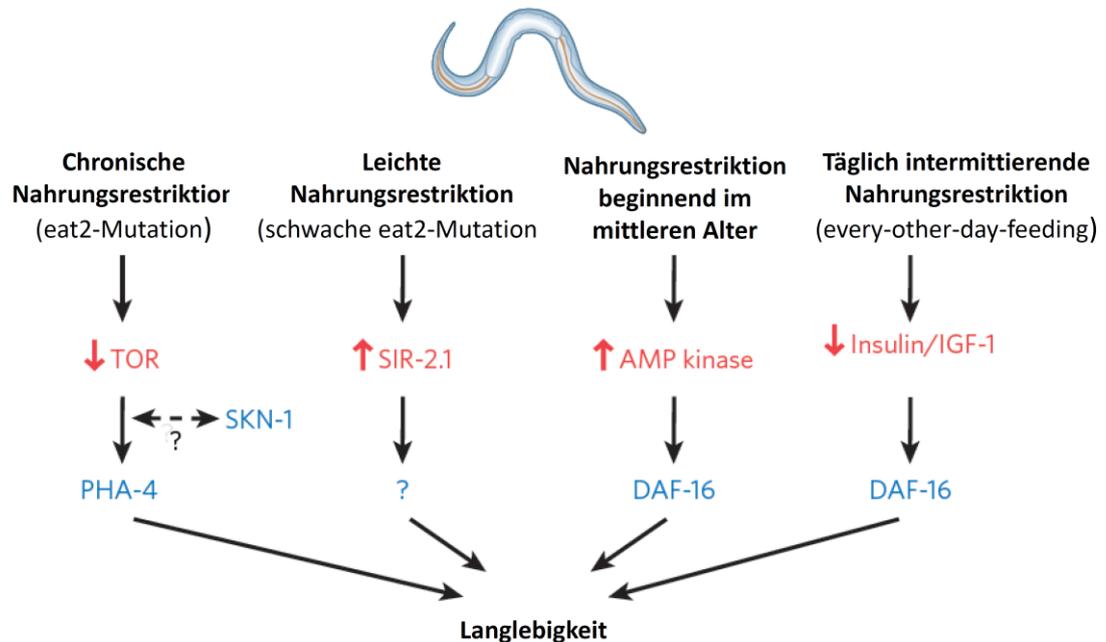
Besonders juvenile Tiere zeichnen sich durch eine hohe Motilität aus. Als Folge fortschreitender Muskeldegeneration, nimmt diese merklich nach den ersten zwei Wochen im adulten Stadium ab [80]. Zusätzlich ist der Grad an Motilität abhängig von Faktoren wie der Populationsdichte und somit auch von der Nährstoffkonzentration und deren Qualität [85, 86]. Im weiteren Verlauf des Alterungsprozesses lassen sich unkoordinierte Bewegungen beobachten bis eben diese auch eingestellt werden [80]. Des Weiteren sammeln sich mit fortschreitendem Alter Lipofuscin, dunkle Pigmente, Vakuolen-ähnliche Strukturen sowie vermehrt oxidierte Proteine in den Nematoden an. Aufgrund seiner Eigenschaften wird der Nematode vielseitig in der Altersforschung eingesetzt. So wird die Lebensspanne der Nematoden von Genen beeinflusst, die in Mechanismen der Kalorienrestriktion, mitochondrialer Funktionen und hormoneller Signalwege involviert sind, worauf später noch einmal genauer eingegangen wird [87, 88].

### 2.6.3 Kalorienrestriktion als Konzept zur Verlängerung der Lebensspanne in *C.elegans*

Eine Restriktion von Nährstoffen und/ oder Kalorien wirkt sich lebensverlängernd auf *C.elegans* aus [89-92], und kann auf verschiedenste Arten appliziert werden. Einer der ersten Ansätze war die Verwendung der eat-2-Mutante, deren pharyngaler Pumpmechanismus zum Einstrudeln von Nahrung aufgrund einer Mutation gestört ist. Diese Dauerrestriktion bedingt eine Verlängerung der Lebensspanne um bis zu 57% [89, 91-95]. Da die Möglichkeit besteht, die Nematoden sowohl in Flüssig- (*liquid*) als auch Fest- (*solid*) Kultur über geringe Gaben von *E.coli* mit Nahrung zu versorgen, bietet sich hier eine weitere Methodik zur Limitation von Nahrung und Nährstoffen. Entsprechende Interventionen an adulten Tieren können die Lebensspanne je nach Methode um 20% bis 73% verlängern [87, 95-98]. Einen weiteren Ansatz stellt der vollständige Verzicht auf Bakterien als Nahrungsquelle dar. Das entsprechende AX-Medium ist definiert und soll den Nematoden als alleinige Nährstoffquelle dienen können [90, 93, 97]. Die Verdünnung des Pepton im Agar führt auf andere Art zu einer Restriktion von Nährstoffen, indirekt über die Bakterienquelle [97] (peptonreiche Medien erhöhen die Teilungsrate der Bakterien) und wird ab dem Schlupf der Larven appliziert. Weiterhin besteht die Möglichkeit über den Zusatz von Resveratrol, als Mimetikum einer Restriktion, eine Verlängerung der Lebensspanne zu bewirken [99-101].

Restriktionen und lebensverlängernde Mutationen verzögern gleichsam das Auftreten altersbedingter Krankheiten [49]. Der lebensverlängernde Effekt ist dabei keine Folge reduzierter Zellschädigungen, sondern wird aktiv über nährstoffabhängige Signalwege reguliert (Abb. 3) [87]. Welcher Signalweg jedoch eingeschlagen wird, hängt bei *C.elegans* von unterschiedlichen Faktoren ab. Bisher ist bekannt, dass zum einen die Art und Dauer der

Applikation, die Entwicklungsstufe der Nematoden, als auch der Genotyp den Hauptregulationsweg zu beeinflussen scheinen [87]. Beteiligt an der Regulation sind demnach die Kinase TOR [102] (*target of rapamycin*), die AMP-Kinase (Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase [103], Sirtuine [88] und der Insulin/IGF-1 (*insulin like growth factor*)-ähnliche-Signalweg [103].



**Abb. 3: Restriktionsregime und Langlebigkeit**

Verstärkte $\uparrow$  oder verminderte $\downarrow$  Expression verschiedener Nahrungssensoren (rot), vermitteln über Transkriptionsfaktoren (blau) bei *C. elegans* lebensverlängernde Effekte als Antwort auf unterschiedliche Arten der Nahrungsrestriktion [87, 88].

Um die Auswirkungen der zyklischen Gewichtsveränderungen, wie sie beim Menschen beobachtet werden, zu imitieren, applizierten wir unser eigenes Restriktionsregime mit kurzfristig wechselnden Bakterienkonzentrationen. Unter der Berücksichtigung, dass in Nematoden kein (mit höheren Lebewesen ausreichend vergleichbares) Belohnungssystem [104, 105] nachzuweisen ist, wird der Effekt einer Restriktion von uns nicht am Verhalten untersucht. Es galt daher die Effekte auf die Lebensspanne und im weiteren Verlauf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu ergründen, die eventuell Anteil an der Regulation haben. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Effekte gradueller/ gestufter Restriktionen mittels Bakterienverdünnungen auf Agarplatten untersucht. Diese Methodik ist in die Kategorie der sogenannten *solid DR* (feste Restriktion) einzuordnen. Bisher wurden unter dieser Applikationsmethode Verlängerungen der Lebensspanne von bis zu 35% dokumentiert [87]. Im Vergleich zum flüssigen Milieu entspricht die *solid DR* am ehesten dem natürlichen Habitat der Nematoden. Ein flüssiges Medium zwingt die

Nematoden zu schwimmen und sich damit vermehrt zu bewegen, ein ungewollter Einfluss auf den Stoffwechsel ist hierbei zu erwarten.

Untersuchungen die über den Vergleich von Nahrungskarenz versus *ad libitum*-Fütterung hinausgehen, z.B. ein mehrfacher Wechsel der Bakterien-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum, zeigten auf Agarplatten bereits erfolgreich [50] die Verlängerung der Lebensspanne. Insbesondere *aak2* (AMPK) und *daf-16* (FOXO) scheinen hier für den unter diesen Bedingungen beobachteten Effekt im Sinne einer Lebensverlängerung notwendig zu sein [87].

## 3. Methoden

### 3.1 Humane Studien

#### 3.1.1 Studiendesign & Kohorte

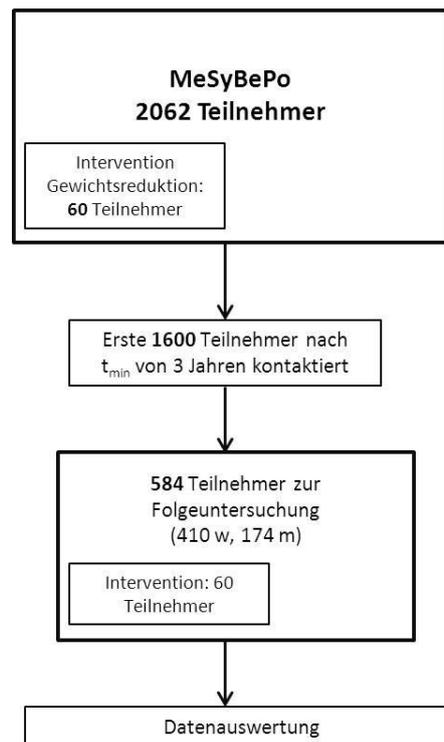
##### *MeSyBePo Follow-up Studie*

In der Querschnittsstudie Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam (MeSyBePo) wurden seit 2002 bis zum Zeitpunkt dieser Auswertung, insgesamt 2062 Personen eingeschlossen (Abb. 4). Ziel der Studie ist es, Zusammenhänge von Charakteristika des metabolischen Syndroms sowie Adipositas-assoziiierter Erkrankungen zu evaluieren. Besonderes Interesse gilt dem T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen als Folge der Adipositas [106]. Im Abstand von mindestens drei Jahren war eine erste Nachuntersuchung vorgesehen. Dieses Kriterium erfüllten zum Zeitpunkt der Kontaktaufnahme für die Nachuntersuchung bereits die ersten 1600 Teilnehmer, von denen 584 Personen (174 Männer, 410 Frauen) untersucht werden konnten. Die durchschnittliche Zeit bis zur Nachuntersuchung beläuft sich für diese Teilnehmer auf 5,3 Jahre.

##### *Substudie Gewichtsreduktion*

Initial nahm eine Teilgruppe von 60 Personen (6 Männer, 54 Frauen) an einer begleiteten einjährigen Gewichtsreduktion teil (Abb. 4). Unter den 584 Personen, die zur Nachuntersuchung eingeladen wurden, waren auch die 60 Teilnehmer der Intervention. Zu Beginn erhielten die Teilnehmer eine individuelle Beratung und Betreuung für die Gewichtsreduktionsphase. Zu diesem Zweck wurde auch der Ruheumsatz bestimmt (Resting Energy Expenditure REE) (Care Fusion, San Diego, CA) und ein 3-Tages-Ernährungsprotokoll aufgenommen. Den Teilnehmern wurde empfohlen 400 – 600 Kilokalorien unter ihrem jeweiligen Tagesbedarf zu verzehren. Als Reduktionskost wurde eine eiweißreiche Mischkost empfohlen (50% Kohlehydrate, 30% Fett und 20% Protein).

Über die gesamte Zeit der zwölfmonatigen Intervention sollten sich die Teilnehmer an diese Vorgaben halten. Während der ersten sechs Monate erfolgte in wöchentlichen Gruppensitzungen eine engmaschige Kontrolle. Inhalte dieser Treffen waren u.a. gesunde Ernährung und Aufklärung zu Lebensstilveränderung sowie Kochkurse. Nach jeder Sitzung nahmen die Teilnehmer an einem 45-minütigen Sportkurs (Aquagymnastik) teil. Nach weiteren sechs Monaten wurden die Teilnehmer erneut eingeladen, um das Körpergewicht objektiv zu bestimmen. Der Verlauf des Körpergewichts wurde aus zwei Werten (Studienbeginn und Folgeuntersuchung) ermittelt. Eine weitere Gewichtsbestimmung wurde nach zwölf Monaten durchgeführt.



#### Abb. 4: Entwicklung der Studienpopulation

Von den 2062 Teilnehmern der MeSyBePo-Studie nahmen zu Studienbeginn 60 Personen kontrolliert an einer einjährigen Gewichtsreduktion teil. Nach mindestens 3 Jahren war eine Folgeuntersuchung vorgesehen. Zum Zeitpunkt dieser Auswertung erfüllten 1600 Personen dieses Kriterium, von denen 584 erschienen, unter ihnen 60 Teilnehmer der einjährigen Intervention.  $t_{\min}$  Mindestabstand bis zur Folgeuntersuchung. Aus den 584 Personen, die wieder erschienen, wurden den 60 Teilnehmern der Intervention 90 Personen als Match zugeordnet.

Aus den restlichen 524 Personen wurden 90 Personen nach Geschlecht, Ausgangsalter und initialem BMI als nicht-randomisierte Kontrollen den Teilnehmern der Intervention zugeordnet. Der maximal geduldete Altersunterschied zu den jeweiligen Personen betrug  $\pm 5$  Jahre, der BMI durfte nicht mehr als  $\pm 3$  BMI Punkte abweichen. Jedem Teilnehmer der Gewichtsreduktion wurden somit Kontrollen im Verhältnis 1:1,5 zugeordnet. Von den Kontrollen war bekannt, dass sie laut eigener Angabe über die gesamte Zeit der Studie keine Gewichtsveränderungen hatten und nicht an Gewichtsreduktionskursen teilnahmen. Diese Angaben wurden mit dem initial ermittelten BMI abgeglichen.

Des Weiteren wurden unabhängig von der Zuordnung von allen 584 Personen der individuelle Gewichtsverlauf über die Beobachtungszeit erfragt. Sechs Antwortmöglichkeiten waren gegeben: stabiler Verlauf (Schwankungen von 2-3 kg), kontinuierlicher Gewichtsverlust bzw. -zunahme, moderates Ab- und Zunehmen (weniger als 5 kg), starkes Ab- und Zunehmen (mehr als 5 kg) und unbekannter Gewichtsverlauf. Eine Validierung des erfragten Gewichtsverlaufs im Vergleich zur tatsächlichen Gewichtsabnahme wurde anhand der Daten der 60 Gewichtsreduktionsteilnehmer vorgenommen.

### 3.1.2 Phänotypisierung

Von allen Teilnehmern (MeSyBePo Follow-up Studie & Substudie Gewichtsreduktion) wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten neben ihren Angaben zur Person (Geburtsdatum, Geschlecht) der Lebensstil erfragt (Rauchstatus, Alkoholkonsum, Ernährungsfragebogen, Aktivitätsfragebogen) und anthropometrische Parameter aufgenommen. Die Teilnehmer wurden nach ihren bisherigen Erkrankungen und Erkrankungen Verwandter ersten Grades befragt. Personen mit akuten metabolischen Störungen, akuten Infektionen, Leber- oder Nierenerkrankungen oder Krebs wurden von der Studie initial ausgeschlossen.

Die Teilnehmer gaben sowohl Urin als auch Blutproben ab. Alle Blutparameter wurden über den ABX Pentra 400 (ABX Diagnostics, Montpellier, Frankreich) bestimmt, sofern nicht anders angegeben. Des Weiteren wurde zum Untersuchungsstart mit allen Probanden, ohne Diabetes und einem Nüchternblutzucker im physiologischen Bereich ein oGTT (oraler Glukosetoleranztest) durchgeführt. In 30min Intervallen über 180min wurden Blutzucker und Insulin bestimmt. Die Einteilung entsprechend des Glukosestoffwechsels ist in Tabelle 2 dargestellt [1, 10]. Die Probanden der MeSyBePo-Studie wurden nach den geltenden Richtlinien zum Zeitpunkt des Beginns der Studie eingestuft, d.h. auf der Grundlage der folgenden Kriterien von 2004 [10] .

**Tabelle 2: Klassifizierungskriterien des Glukosestoffwechsels**

Klassifizierungskriterien für die Einstufung des individuellen Status des Glukosestoffwechsels nach Daten von MeSyBePo. NG- normaler Glukosestoffwechsel, IFG- *impaired fasting glukose* (gestörte Nüchternblutglukose), IGT- *impaired glukose tolerance* (gestörte Glukosetoleranz), T2DM- Typ 2 *Diabetes mellitus*; T1DM- Typ 1 *Diabetes mellitus*

	Eigenanamnese	Nüchternblutzucker (mg/dl)	Blutzucker 120 Min (mg/dl)
NG= Kontrollen	Angabe von keinem oder unbekanntem Diabetes	<100	<140
IFG	--	100-109,99	<140
IGT	--	<100	140-199,99
IFG+IGT	--	100-109,99	140-199,99
T2DM	bekannter T2DM	≥110	≥200
T1DM	bekannter T1DM		
keine Aussage			
IFG möglich	nur Nüchternblutglukosemessung verwendet, kein oGTT		
T2DM möglich	nur Nüchternblutglukosemessung verwendet, kein oGTT		

Die Aufnahme weiterer Parameter umfasste die Bestimmung von Größe, Gewicht, Blutdruck, Hüftumfang, Bauchumfang und Hautfaltendickemessungen (*Biceps*, *Trizeps*, *Scapula*, *Christa iliaca*). Anhand der aufgenommenen Daten wurden BMI, WHR und Gesamtkörperfett berechnet.

BMI (body mass index):

$$BMI [kg / m^2] = \frac{\text{Körpermasse} [kg]}{\text{Körpergröße} [m^2]}$$

WHR (waist to hip ratio):

$$WHR = \frac{\text{Tailenumfang} [cm]}{\text{Hüftumfang} [cm]}$$

TBF (total body fat) [107]:

$$TBF = \left( \frac{4,95}{a - (b \cdot \log_{10} (d_{Biceps} + d_{Trizeps} + d_{Rücken} + d_{Hüfte}))} - 4,5 \right) \cdot 100 \quad \%$$

$$d = \text{Dicke in mm}; a_{\sigma} = 1176,5; b_{\sigma} = 74,4; a_{\text{♀}} = 1156,7; b_{\text{♀}} = 71,7$$

#### Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)

Die Charakterisierung des Glukosestoffwechsels jedes Probanden erfolgte mittels oGTT. Der Test wurde ursprünglich entwickelt, um einen *Diabetes mellitus* klassifizieren zu können. Der Verlauf des Plasmaglukosespiegels und der jeweiligen Insulinantwort reflektieren das Vermögen der pankreatischen  $\beta$ -Zellen Insulin zu sezernieren ( $\beta$ -Zellfunktion). Der Test liefert damit eine Aussage zur Sensitivität der Gewebe gegenüber Insulin [107-109]. Für den Test mussten die Probanden eine Nahrungskarenz von 10-12h eingehalten haben. Die erste Probe (20  $\mu$ l Vollblut) wurde über eine Kapillare aus dem Ohrläppchen entnommen, um den Nüchternglukosespiegel zu bestimmen (Super GL. HITADO GmbH, Möhnesee). Im Falle eines Spiegels über 110 mg/dl wurde kein oGTT durchgeführt. Die Probanden erhielten im Folgenden eine 300 ml Accu-Check® Dextro® O.G.-T. Lösung, die vollständig getrunken werden sollte. Der Inhalt entsprach einer Menge von 75 g wasserfreier Glukose. Ab diesem Zeitpunkt 0 erfolgten jeweils weitere Blutentnahmen nach 30, 60, 90, 120 und 180min. Gleichzeitig wurde die kapillare Blutglukose bestimmt.

Die entnommenen Blutproben dienten der späteren Bestimmung des Insulinspiegels im Serum. Im Rahmen der Eingangsuntersuchung wurden bei Probanden mit einem diagnostizierten Diabetes oder einem zu hohen Nüchternblutglukosespiegel (>110 mg/dl) lediglich die Nüchternblutglukose- und der Nüchterninsulinspiegel bestimmt, ebenso Glutaminsäure-Decarboxylase Antikörper (GAD) und Insulinantikörper (IA) zur Unterscheidung zwischen T2DM und T1DM.

Aus den Messungen von Blutzucker und Insulinspiegeln des oGTT wurden Indizes zur Charakterisierung der Insulinsensitivität und Insulinsekretion berechnet:

Insulinsensitivität aus Nüchternwerten: *Homeostasis Model Assessment (HOMA<sub>IR</sub>)*:

Berechnet nach Matthews *et al.* als Verfahren zur Abschätzung der Insulinresistenz und  $\beta$ -Zellfunktion aus dem basalen Plasmaspiegel von Insulin und Glukose [110]. Er dient der Evaluierung der hepatischen Insulinsensitivität und der basalen hepatischen Glukoseproduktion [111].

$$HOMA_{IR} = \frac{c(I)_0 \cdot c(G)_0}{18,02 \cdot 22,5}$$

#### *Blutbild*

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten wurde den Probanden Vollblut entnommen, ein kleines Blutbild ergab Aussagen zu Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten und Leukozyten. Der Gehalt an HbA1c wurde mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) ermittelt.

Die Analyse weiterer Blutparameter, wie den Blutfetten, erfolgte im durch Zentrifugation (1000 x g bei 4°C für 10Min) abgetrennten Serum bzw. Plasma, welches in Aliquots bei -80°C aufbewahrt wurde.

$$LDL[mmol/l] = Chol[mmol/l] - \frac{TG[mmol/l]}{2,2} - HDL[mmol/l]$$

#### *Kardiovaskuläres Risiko*

Die Abschätzung des Kardiovaskulären Risikos erfolgte über den Framingham Score [67]. Der Score wurde 1998 im Rahmen der Framingham Heart Study aus Daten von 5345 Personendaten mit einem Follow-up von zwölf Jahren zur Abschätzung des Kardiovaskulären Risikos entwickelt [67]. In die Berechnung gehen Geschlecht, Alter, LDL-Cholesterin, Gesamt-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Blutdruck, Diabetes und Raucherstatus ein. Der Score gibt Auskunft über das Risiko einer kardiovaskulären Komplikation innerhalb der nächsten zehn Jahre.

*FGF21*

Die Bestimmung von FGF21 im Serum erfolgte über einen Radioimmunoassay (Phoenix Europe GmbH) unter Verwendung von Iod 125 markiertem FGF21. Der vom Hersteller angegebene Detektionsbereich belief sich auf 0,5-8,5 ng/ml, der Normalbereich von FGF21 liegt bei 0,234 -30 ng/ml. Der Koeffizient der Intraassayvarianz belief sich auf 6,6%.

*Vaspin*

Die Bestimmung von Vaspin im Serum erfolgte über einen Sandwich ELISA mit Biotin markierten Antikörpern (Biovendor, R&D, Heidelberg). Der vom Hersteller angegebene Kalibrationsbereich belief sich auf 0.031 - 2 ng/ml. Der Dektionsbereich liegt bei 0.01-2 ng/ml. Der Koeffizient der Intraassayvarianz belief sich auf 6,5% (Kooperation mit der Universität Leipzig).

### 3.2 Handhabung des Nematoden *C.elegans*

#### 3.2.1 Stämme

Alle verwendeten Nematodenstämme und die Bakterienstämme *E.coli* OP50 und GC363 wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), der Universität von Minnesota, bezogen[112] [71] (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Verwendete *C. elegans*-Stämme, Genetik und dokumentierte Eigenschaften**

Stamm	Genetik	Eigenschaften
N2	Wildtyp	Referenzstamm
CB 1370	Punktmutation (c→t) des <i>daf-2-Gens</i> (Insulin/IGF-1-Rezeptor-Homolog) betroffenes Allel: <i>daf-2</i> (e1370) III	langlebig; temperaturabhängige Bildung des Dauerstadiums
CF 1038	10980 bp Deletion des <i>daf-16-Gens</i> (FOXO1A-Homolog) betroffenes Allel: <i>daf-16</i> (mu86) I	kurzlebig; gestörte Bildung des Dauerstadiums
NL 2099	Deletion des <i>rrf-3-Gens</i> . betroffenes Allel: <i>rrf-3</i> (pk1426) II	Erhöhte Sensitivität gegenüber RNAi im Vergleich zum Wildtyp Keine bekannten morphologischen Defekte

### 3.2.2 Haltung und Pflege von *C.elegans*

Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Standard-Methoden von Brenner [77, 112]. Die Kultivierung der Nematoden fand, sofern nicht anders beschrieben, auf NGM-Agar-Platten (*nematode growth medium*) (Tabelle 4) bei 22°C (Vinothek, Liebherr-International Deutschland GmbH) statt.

**Tabelle 4: NGM-Agar-Zusammensetzung**

Standard NGM-Agar ( <i>ad</i> 1000ml H <sub>2</sub> O reinst)	
Agar	20,0 g
Pepton	2,5 g
NaCl	3,0 g
Autoklavieren, Lagerung bei 4°C, bei unmittelbarer Verwendung abkühlen lassen auf 55°C, danach Zugabe von:	
CaCl <sub>2</sub> (1M)	500 µl
Cholesterin in Ethanol (5mg/ ml)	1000 µl
MgSO <sub>4</sub> (1M)	1000 µl
Kalium-Phosphat-Puffer (1M, pH 6)	25 ml
Nystatin (10mg/ ml)	5 ml
Zusätzlich: Um weiteres Wachstum der Bakterien zu inhibieren und konstante Bakterienkonzentrationen zu gewährleisten, wurde bei spezifischen Fütterungsregimen dem Agar Ampicillin zugesetzt.	
Ampicillin (100mg/ ml)	1000 µl
Nach Bedarf: Um die somatische Zellteilung und somit die Vermehrung der Nematoden zu verhindern, wurde dem Agar zusätzlich FUDR (2'-Deoxy-5-Fluorouridine) zugegeben.	
FUDR (25mg/ ml)	1000 µl
Nach Bedarf: NGM-Agar-Platten, die für die Dauerkulturen gedacht waren, enthielten Streptomycin anstatt Ampicillin.	
Streptomycin ( 20 mg/ ml)	10 ml

Je nach Versuchsdesign und der Anzahl der benötigten Nematoden wurden Kulturplatten unterschiedlicher Größe benutzt. Als Standard eigneten sich Platten von ca. 10 cm Durchmesser.

*C.elegans* ernährt sich allgemein von im Boden lebenden Bakterien. Unter Laborbedingungen werden die Nematoden jedoch mit Darmbakterien kultiviert, die eine vergleichbare Nährstoffquelle [86] darstellen. Als Standardnährstoffquelle dienen den Nematoden uridin-auxotrophe *E.coli* OP50 in einer Flüssigkultur Vollmediums (DYT-Medium) (Tabelle 5), die über Nacht bei 37°C und 170rpm kultiviert wurden. Die Bakterienlösungen wurden bei Bedarf der Wachstumshemmung im Nachhinein für 5h (37°C, 170rpm) mit Ampicillin inkubiert; je 1 ml Bakterienlösung der Konzentration 10<sup>10</sup> CFUs wurden 1 mg des Antibiotikums zugesetzt.

Die Bakterienkonzentration, bzw. die Anzahl der CFU (*colony forming units*) wurde jeweils über die optische Dichte bei 600nm (Gene Quant 1300, GE Healthcare, CT, USA) bestimmt. Der gemessene Wert ist mit dem Faktor acht zu multiplizieren und entspricht dann einer Konzentration von Wert\*10<sup>8</sup> CFU.

**Tabelle 5: Kulturmedien für Bakterien**

2YT-Medium/ auch DYT ( <i>ad</i> 1000ml H <sub>2</sub> O reinst)		
Bactotrypton		16,0 g
Hefe-Extrakt		10,0 g
NaCl		5,0 g
LB-Medium ( <i>ad</i> 1000ml H <sub>2</sub> O reinst)		
Bactotrypton		10,0 g
Hefe-Extrakt		5,0 g
NaCl		5,0 g

Die Medien wurden autoklaviert und bei 4°C gelagert.

### 3.2.3 Dauerkulturen und gefrorene Stocks

Das Dauerstadium ermöglicht es, die Nematoden über 2-4 Monate bei 4°C zu halten. Es gewährleistet das Arbeiten mit Nematoden eines konstanten Genpools über längere Zeit, da die Tiere je nach Bedarf innerhalb kurzer Zeit regeneriert werden können [112].

Die jeweilige Population wurde dafür vermindert gefüttert um den Übergang ins Dauerstadium zu erzwingen. Sobald sich überwiegend Dauerlarven in der Population befanden, wurde diese auf streptomycinhaltige NGM-Agarplatten, beimpft mit einem dünnen *E.coli* (OP50i)-Rasen, übertragen. Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und bei 4°C gelagert [112].

Des Weiteren wurden gefrorene Stocks angelegt. Gehungerte L1, L2 und Dauer-Larven wurden in eine Soft Agar Freezing Solution (SAFS) und S-Puffer (Tabelle 6) übertragen und darin langsam bis auf -80°C gekühlt. Sie können darin mehrere Monate gelagert werden. Je nach Bedarf können Aliquots der gefrorenen Masse auf frisch beimpften OP50-Platten übertragen und weiter kultiviert werden [112].

**Tabelle 6: Lösungen Cryokonservierung**

S-Puffer (1000ml)		Soft Agar ( <i>ad</i> 100ml)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,05M	129,0 ml	NaCl	0,58 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M	871,0 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68 g
NaCl	5,85 g	Glycerol	30,0 ml
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,87 g
		Agar	0,40 g
	auf pH 6		auf pH 6
autoklavieren		autoklavieren	

**Soft Agar Freezing Solution**

S-Puffer &amp; Soft Agar; 1:1

**3.2.4 Synchronisation**

Die Synchronisation der Nematoden [112] geht mit einer Dekontamination einher. Unter Verwendung der Bleichlösung werden sowohl Nematoden als auch Bakterien abgetötet, lediglich die Wurmeier bleiben unversehrt und der Schlupf der Larven erfolgt synchron.

Die Nematoden wurden von den Platten gewaschen, auf ein Volumen von 3,5 - 4,0 ml eingengt und mit 1,5 ml einer frisch angesetzten Bleichlösung (Tabelle 7) versetzt. Nach zehninütiger Inkubation, mehrmaligem Waschen und Pelletieren wurde das Pellet auf ein neues Nährmedium übertragen, innerhalb von drei bis fünf Stunden schlüpfen die ersten Larven.

**Tabelle 7: Bleichlösung**

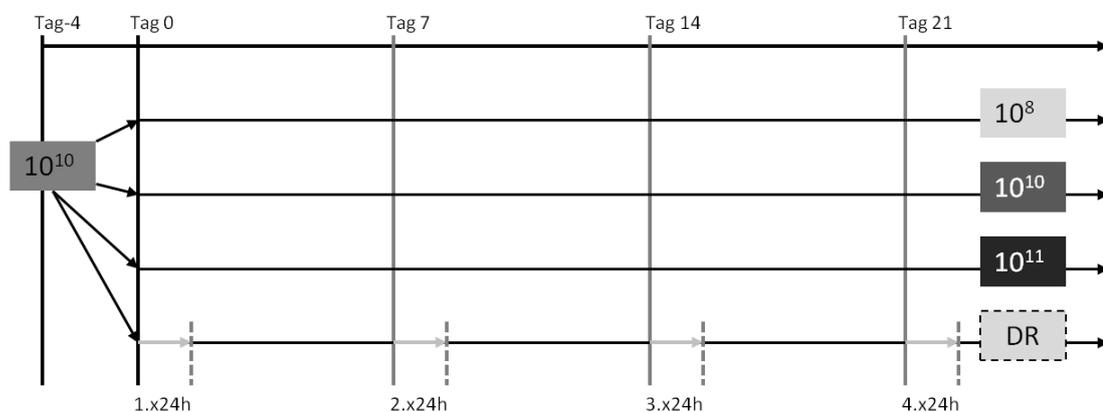
Bleichlösung	
Reinstwasser	830 µl
10N NaOH	250 µl
12%ige NaOCl	420 µl
	1500 µl

**3.2.5 Life Span Assay**

Der *Life Span Assay* ermöglicht, den Einfluss einer Substanz, Behandlung oder auch Mutation auf die Lebensspanne zu untersuchen. In der Vorbereitung wurden synchronisierte Nematoden (L1-Larven) auf frisch beimpfte Standard-NGM-Agar-Platten überführt und für drei Tage bei 22°C *ad libitum* (OP50 1x10<sup>10</sup> CFU) gefüttert. Nach drei Tagen erreichten die Tiere das adulte Stadium, dies galt als Versuchsstart (Versuchsstart t=0) für jeden *Life Span Assay*.

Je Gruppe wurde die gleiche Anzahl an Tieren (60) verwendet. Als Kontrolle galten *ad libitum* (OP50  $1 \times 10^{10}$  CFU) gefütterte Nematoden (Abb. 5), zusätzlich wurde eine dauerhaft restrikt gefütterte Gruppe (OP50  $1 \times 10^8$  CFU) mitgeführt. Entsprechend der Hypothese wurden parallel intermittierende Fütterungsregime, die 24-stündige Restriktionsphasen (DR) mit OP50  $1 \times 10^8$  CFU vorsahen, mitgeführt. Dieser Wechsel erfolgte ein- bis viermal in den jeweiligen Gruppen: 1xDR (Tag 0), 2xDR (Tag 0, Tag 7), 3xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14) und 4xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21). Um die starke Vermehrung der Tiere in der fertigen Phase einzuschränken, war dem Agar über die ersten 14 Tage FUDR zugesetzt.

Ab Assay-Start wurden alle Nematoden alle zwei Tage auf neue Platten umgesetzt und dabei gezählt. Dabei wurden lebende, tote und zensierte Tiere vermerkt. Als zensiert galten Tiere, die nicht auffindbar waren, zum Beispiel von der Platte abgewandert sind oder durch ein fehlerhaftes Umsetzen verletzt wurden. Dies galt auch für Tiere, die eine *Endotokia matricida* (Tod durch intrauterinen Schlupf) erfahren haben, ein Phänomen, dass bei starkem Nährstoffmangel und auch bei sehr geringen Bakterienkonzentrationen zu beobachten war. Tote Tiere wurden vermerkt aber nicht weiter umgesetzt.



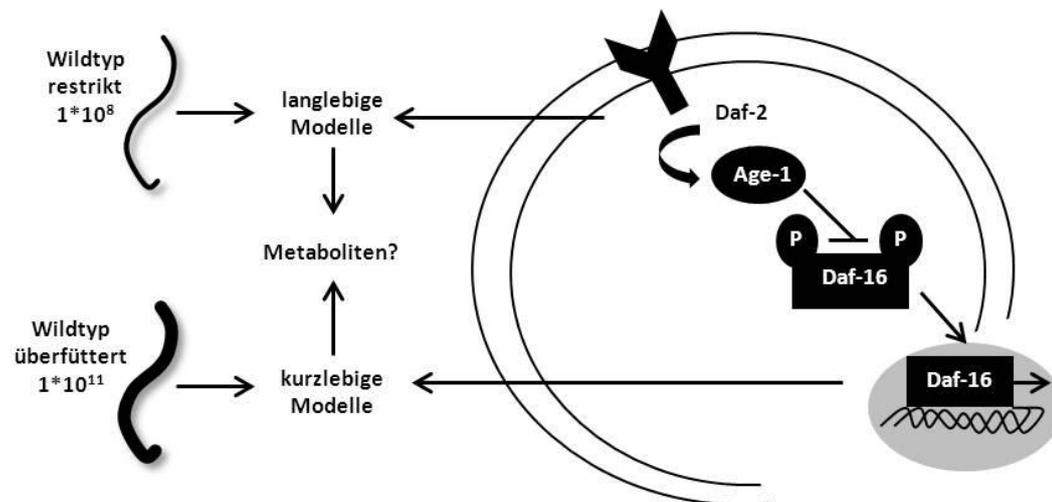
**Abb. 5: Life Span Schema .**

**Schema eines Versuchsablaufes mit konstanten und restriktiven Regimes (OP50).**

Am Tag -4 wurden synchronisierte Nematoden (L1) auf frisch beimpfte ( $10^{10}$ ) Standard-NGM-Agar-Platten überführt; innerhalb von 4 Tagen wachsen diese zu adulten Tieren heran: *Assaystart* Tag0. Die Kontrollgruppen/ Referenzgruppen werden kontinuierlich mit konstanten Bakterienkonzentrationen (CFU:  $1 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^{10}$ ,  $1 \cdot 10^{11}$ ) gefüttert. Im Gegensatz dazu erfolgen intermittierende Fütterungen mit 24-stündigen Restriktionsphasen auf  $1 \cdot 10^8$  CFU Bakterien im Abstand von 7 Tagen. Dieser Wechsel erfolge ein- bis viermal in den jeweiligen Gruppen: 1xDR (Tag 0), 2xDR (Tag 0, Tag 7), 3xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14) und 4xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21).

### 3.2.6 Untersuchung des Intermediärstoffwechsels mittels Metabolomics

Endogene als auch exogene Faktoren sind in der Lage, das Altern zu beeinflussen (Abb. 6). Effekte endogener Faktoren wie z.B. genetischer Faktoren wurden mit den Stämmen CB1370 (langlebige *daf-2*-Mutante) sowie CF1038 (kurzlebige *daf-16*-Mutante) auf einer Standarddiät (*E.coli* OP50  $10^{10}$  CFU/ml) verwandt. Als exogener Faktor wurde ein diätetisches Modell gewählt. Es wurde der diätetische Effekt einer Standarddiät (OP50  $10^{10}$  CFU/ml), einer restrikten Diät (OP50  $10^8$  CFU/ml) und einer hochkonzentrierten Diät (OP50  $10^{11}$  CFU/ml) bei Tieren des Wildtyps (N2) untersucht.



**Abb. 6: Endogene und exogene Einflussfaktoren auf die Lebensspanne.**

Unter einer Restriktion weisen Wildtypen eine verlängerte Lebensspanne auf, ebenso ist dieser Phänotyp bei Stämmen mit Defekten des Insulinrezeptorhomologs *Daf-2* zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist die Lebensspanne bei überfütterten Tieren des Wildtyps verkürzt, ebenso wie im genetischen Modell mit Defekten im Transkriptionsfaktorhomolog von FOXO *Daf-16*. Ein Vergleich der metabolischen Muster aller vier Modelle soll über mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede Aufschluss geben.

Eine Lebensverlängerung in Folge einer kontinuierlichen Restriktion oder eine Verkürzung der Lebensspanne durch eine kontinuierliche Überfütterung konnten wir für den Wildtyp (N2) bestätigen (diätetische Modelle) [49, 87]. Dieser Einfluss der Nahrungsquelle ähnelt den Phänotypen der verwendeten genetischer Modelle (CB1370 & CF1038) [49, 87]. Sind *daf-2* bzw. *daf-16* in ihrer Funktion eingeschränkt, können analoge Effekte beobachtet werden, zum einen Langlebigkeit und zum anderen eine verkürzte Lebensspanne [87, 113].

Die beobachteten analogen Effekte aus diätetischem und genetischem Modelle nutzten wir um Überschneidungen der Metabolitenflüsse unter den jeweiligen Bedingungen zu untersuchen. Dies erfolgte mit dem Ziel, neue potentielle Regulationswege, die ebenso zum Effekt des Einflusses auf die Lebensspanne beitragen, aufzudecken. Entsprechend wurden Nematoden des Wildtyps N2 und der Stämme CB1370 und CF1038 kultiviert, synchronisiert

und nach Erreichen des adulten Stadiums auf die oben beschriebenen Nahrungsregimes übertragen und für drei Tage unter diesen Bedingungen bis zur Probennahme kontrolliert gehalten. Von jeder Probe wurden sechs technische Replikate hergestellt. Als Kontrollen dienten sowohl Reinstwasser als auch die Bakteriensuspension.

#### Metabolitenextraktion

Jeder Ansatz belief sich auf eine Probe von 6ml einer Wurmsuspension. Für jede Probe wurde über ein Aliquot die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt. Anhand der Probe mit der niedrigsten Proteinkonzentration als Richtwert wurden die Volumina der restlichen Proben für die Extraktion angeglichen, um mit den gleichen biologischen Probenmengen zu arbeiten.

Zu der jeweiligen Wurmprobe wurden 500 µl eiskalter (-20°C) Extraktionspuffer aus Methanol:H<sub>2</sub>O:Chloroform (2,5:1:1) gegeben. Um die technisch bedingte Varianz in der Probenbestimmung zu kontrollieren, wurde dem Extraktionsgemisch C<sup>13</sup>markiertes Sorbitol (0,1 mg/ 500 µl) für die GC-Messung zugegeben, für die FT-Messung diente 1 µg/ 500 µl Kortikosteron. Die Suspension wurde vermischt und mittels Ultraschallstab zweimal für 30 Sekunden aufgeschlossen. Im Folgenden wurden die Proben für zwei Stunden auf Eis geschüttelt, für vier Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere polare Phase wurde geteilt in 2x180 µl Aliquots für die GC-TOF-MS sowie die LC-FT-MS. 80 µl der unteren unpolaren Phase wurden für die LC-FT-MS zur Bestimmung der Lipidfraktion aliquotiert. Im Folgenden wurden die Proben vacuumgetrocknet.

#### Derivatisierung

Die Methoximierung der Carbonylgruppen (40 mg/ml Methoxyamin in Pyridin) erfolgte mit 5 µl des Gemisches je Aliquot für 90min bei 30°C unter Schütteln. Die Proben wurden daraufhin für 30 Sekunden bei 14000g zentrifugiert um kondensierte Tröpfchen wieder zu sammeln.

Die Silylierung der Hydroxygruppen erfolgte mit Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoroacetamid (MSTFA) inklusive des enthaltenen FAME-Standards. Der Standard enthält eine Mischung von festgelegten Fettsäuren und Fettsäuremethylestern. 45 µl der gebrauchsfertigen Lösung (MSTFA + FAME) wurden je Probe hinzugegeben und für 30min bei 37°C geschüttelt.

Die weitere Analyse erfolgte mittels GC-TOF-MS sowie UPLC-FT-ICR-MS am MPI in Potsdam-Golm-AG Wollmetzer.

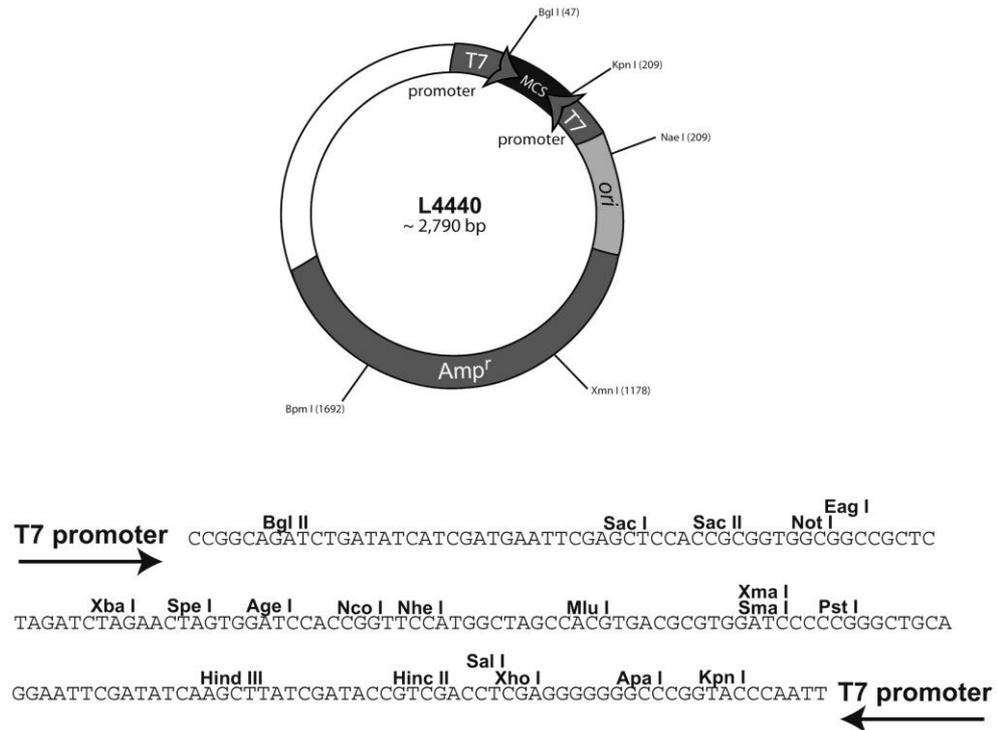
### 3.2.7 RNA-Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter Mechanismus der zu posttranskriptionalem Abschalten eines Genes, *post-transcriptional gene silencing* (PTGS oder *RNA silencing*) führt. Ausgelöst wird der Mechanismus durch externe doppelsträngige RNA (dsRNA) oder kleine interferierende dsRNA, die *small interfering RNA* (siRNA) [114]. In *C.elegans* wird die doppelsträngige RNA durch einen Enzymkomplex aus DICER, mehreren Bindeproteinen, sowie einer Helikase in doppelsträngige Fragmente von 21-23 Nukleotiden Länge geschnitten sowie entwunden [114]. Die entstandenen siRNAs binden an ihre Ziel-mRNA, werden über den RISC-Enzymkomplex aufgenommen und mit Hilfe von Endo- und Exonukleasen abgebaut [114]. Alternativ dazu kann die siRNA auch als Primer für eine dsRNA abhängigen RNA-Polymerase dienen (*dsRNA-dependent RNA polymerase RdRP*). *C.elegans* besitzt vier Homologe für RdRP, eines davon ist rrf-3. Diese rrf-3 Mutanten sind hypersensitiv gegenüber RNAi [115]. Aus diesem Grund wird der Stamm NL2099, welcher für das Gen rrf-3, Allel pk1426 eine homozygote Deletion vorweist, für dieses Experiment verwendet [71]. siRNA kann auch im Wildtyp appliziert werden, jedoch ist der Effekt abhängig vom betroffenen Gen, im Phänotyp sehr schwach [115].

Derzeit kommen vier Methoden zur Anwendung wie dsRNA in *C.elegans* eingebracht werden kann: (1) Injektion [116], (2) Fütterung über dsRNA produzierenden Bakterien [117], (3) Eintauchen in dsRNA [118] und (4) in vivo Produktion durch einen transgenen Promotor [119].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fütterung mit dsRNA gewählt. Es ist eine der praktikabelsten Methoden, der Erfolg der Methodik ist vergleichbar mit der Injektion und hat dazu einige methodische Vorteile [120]. Die Fütterung mit dsRNA produzierenden Bakterien garantiert die Aufnahme der jeweiligen Sequenz in den Wurm. Entsprechend ist es möglich auch Titrationseffekte über Bakterienlösungen zu untersuchen [120]. Jedes beliebige Gen lässt sich über diese Methodik innerhalb kurzer Zeit untersuchen [120]. Die Methodik der RNA-Interferenz über eine Fütterung mit Bakterien verlangt Bakterienstämme, die in der Lage sind, die dsRNA zu exprimieren sowie eine vergleichbare Kontrolle. Aus diesem Grund wird der *E.coli* Stamm HT115 (DS) GC363 als Leervektor-Kontrolle verwandt. Er enthält den Vektor L4440, in den je nach Bedarf die gewünscht dsRNA kloniert werden kann (Abb. 7). Im Vektor liegt die Sequenz der jeweiligen dsRNA zwischen zwei T7-Promotoren [121], die durch IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induzierbar sind [122]. Die dsRNA enthaltenen *E.coli*-Stämme sind kommerziell erhältlich und wurden für diese Arbeit von Source BioScience [98] bezogen.

In Tabelle 8 sind die siRNA-Stämme, welche für diese Arbeit relevant waren, aufgelistet.



#### Abb. 7: L4440 Vektor.

Der Kontrollstamm *E. coli* HT115 (DE3) GC363 enthält den L4440 Vektor ohne dsRNA-Sequenz. Auf dem Vektor befindet sich eine Ampicillinresistenz sowie zwei entgegengesetzt ausgerichtete T7-Polymerase-Promotoren. Für die jeweiligen RNAi wurden die entsprechenden Sequenzen zwischen den Promotoren hineincloniert [121].

**Tabelle 8: Sequenznamen und Proteinbezeichnung der untersuchten siRNA-Stämme**

Sequenzname	Proteinname (zugeordnete Abkürzung)
C28H8.11	Tryptophan-2,3-Dioxygenase (T-2,3-DO)
ZK1290.2	Tryptophan-Hydroxylase (tph-1)
F45H10.1	Aldehyd-Dehydrogenase (alh-7)
Y71D11A.3	2-Amino-3-Carboxymuconat-6-Semialdehyd-Decarboxylase (ACSD)

Zur Kontrolle der hineinklonierten Fragmente und deren Sequenzspezifität wurden Proben jedes siRNA-exprimierenden Bakterienstammes nochmals analysiert. Die entsprechenden Fragmentgrößen wurden nach DNA-Isolation unter Verwendung des QuickLyse MiniPrep Kits (Quiagen, Hilden, Deutschland), Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese (1%iges Ethidiumbromid-Gel) bestätigt. Die Sequenz wurde durch einen externen Service (Sequenzierservice SMB Services in Molecular Biology GmbH, Rüdersdorf, Deutschland) bestätigt.

In der Literatur lassen sich mehrere Protokolle zur RNA Interferenz via Fütterung mit dsRNA produzierenden Bakterien finden, die sich im Wesentlichen in den Konzentrationen von

Antibiotika, dem verwendeten Kulturmedium oder der Induktion durch IPTG unterscheiden. In dieser Arbeit wurden die Methodenprotokolle nach Ahringer [120] und Timmons [117] getestet um die optimalste Applikation für unsere Zielgene zu ermitteln. Den Effekt des Knockdowns analysierten wir mittels qRT-PCR der entsprechenden Zielgene. Die Methode nach Ahringer wies den zuverlässigsten Effekt nach. Zur weiteren Untersuchung des RNAi-Effektes wurde das Protokoll ebenso im Rahmen des *Life Span Assays* und der Untersuchung des Metabolitenprofils beibehalten.

In der Methode nach Ahringer [120] werden die Bakterien mit dem Plasmid zunächst bei 37°C unter Schütteln für 6h in LB-Medium angezogen und mit Ampicillin (50 µg/ ml) versetzt. Die Bakterien werden in dieser Zeit auf eine OD von ca. 0,4-0,6 angezogen bzw. mittels Zentrifugation auf diese OD eingengt. Die jeweilige Bakterienlösung wird auf IPTG und Ampicillin enthaltende NGM-Agarplatten (50 µg/ ml Ampicillin, 1 mM IPTG) ausgestrichen. Für jede Methode wurden die Agarplatten jeweils eine Woche vor Versuchsstart gegossen. Die Bakterien wiederum wurden einen Tag vor Versuchsstart angezogen und am selben Tag noch auf den Agarplatten ausgestrichen. Parallel dazu erfolgte die Synchronisation der Nematoden. Am nächsten Tag, dem Versuchsstart (t=0), wurden die über Nacht geschlüpften L1-Larven für drei Tage auf die beimpften Agarplatten gegeben. Das Ausmaß des Bakterienrasens wurde täglich kontrolliert. Nach 24h wurden alle Nematoden nachgefüttert um den RNAi-Effekt optimal aufrechtzuerhalten [114].

#### Life Span Assay unter RNA-Interferenz

Für den Assay unter dem Einfluss der siRNAs wurden in der Vorbereitung synchronisierte Nematoden (L1-Larven) auf frisch beimpfte Agar-Platten mit den jeweiligen siRNA exprimierenden *E.coli* Stamm überführt und für die drei Tage bei 22°C *ad libitum* mit den jeweiligen RNAi exprimierenden *E.coli* Stamm gefüttert. Aus eigenen Vorversuchen war bereits bekannt, dass diese frühzeitige Aufnahme der RNAi nicht in die Entwicklung der siRNA-sensitiven Mutante eingreift. Nach drei Tagen waren die Nematoden adult und konnten in den Assay aufgenommen werden (Versuchsstart t=0).

Je Gruppe wurden 90 Tiere in die Versuche eingeschlossen (Kontrollgruppe des Leervektors *E.coli* HT115(DE3) GC363). Alle Bakterienstämme wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^{10}$  CFU auf die Platten ausgestrichen. Um die starke Vermehrung der Tiere in den ersten Tagen einzuschränken, war dem Agar über die ersten 14 Tage FUDR zugesetzt.

Mit dem Einschluss der Tiere in den Assay werden sie alle zwei Tage auf neue Platten umgesetzt. Dabei werden lebende, tote und zensierte Tiere vermerkt. Als zensiert galten Tiere die nicht auffindbar waren, zum Beispiel von der Platte abgewandert sind oder durch ein fehlerhaftes Umsetzen verletzt wurden. Tote Tiere wurden nicht weiter umgesetzt.

### 3.2.8 RNA-Isolation und Expressionsanalyse

#### RNA-Isolation und DNase-Verdau

Die Nematoden wurden mit destilliertem  $H_2O$  von den Platten gewaschen und auf ein Vollumen von 100  $\mu$ l eingengt. Je Probe wurden 1000  $\mu$ l TRIZOL dazugegeben und 2x30 Sekunden mittels Speed Mill (JenaAnalytik, Jena, Deutschland) aufgeschlossen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand in ein neues Probengefäß überführt und mit je 200  $\mu$ l Chloroform vermischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Von den sich ausbildenden Phasen wurde die obere (polare) Phase abgenommen und in ein neues Probengefäß überführt. Für die Fällung der RNA wurde der Probe im Folgenden Isopropanol im Verhältnis 1:1 zugegeben, vermischt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Für weitere zehn Minuten wurden die Proben bei 4°C und 12000g zentrifugiert, der Überstand wurde daraufhin bestmöglich abgenommen. Die gefällte RNA wird mit 1000  $\mu$ l Ethanol (75%) gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 4°C und 7500g zentrifugiert. Der Überstand wurde maximal abgenommen, das verbliebene Pellet getrocknet und erneut in nukleasefreiem Wasser aufgenommen und gelöst.

Im Anschluss wurden die Proben durch Degradation der DNA-Anteile entsprechend der Herstellerbeschreibung aufgereinigt (*Ambion DNA-free Kit, DNase Treatment and Removal Reagents*, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Zusammensetzung pro Ansatz ist in Tabelle 9 zu finden.

**Tabelle 9: Ansätze Mastermix (1) DNase Verdau, (2) cDNA-Synthese und (3) qRT-PCR**

<b>(1) Mastermix DNase-Verdau für 15<math>\mu</math>l isolierte RNA</b>	
	Volumen
DNase 1-Puffer	1,5 $\mu$ l
rDNase 1	1,0 $\mu$ l
RNA	15,0 $\mu$ l

## cDNA-Synthese und qRT-PCR

Die isolierte RNA wurde mittels Reverse Transkriptase-Reaktion (*High-Capacity-cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*) in cDNA umgeschrieben. Alle vorbereitenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

cDNA-Syntheseprotokoll: Schritt 1: 25°C 10min, Schritt 2: 37°C 60min, Schritt 3: 85°C 5min, Schritt 4: Kühlung auf 4°C.

**(2) Mastermix cDNA-Synthese**

	Volumen
RT-Puffer (10x)	2,0 µl
dNTP-Mix (25x)	0,8 µl
<i>Random Primer</i> (10x)	2,0 µl
<i>Multiscribe Reverse Transkriptase</i>	1,0 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	4,2 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>10,0 µl</b>
RNA-Lösung	10,0 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>20,0 µl</b>

Die cDNA-Proben wurden 1:10 verdünnt so für die qRT-PCR eingesetzt. Expressionsanalyse erfolge im 96-*well*-PCR-Platten-Format über das SYBR Green I –System\*.

**(3) Mastermix qRT-PCR**

	Volumen
Power SybrGreen	5,0 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	2,4 µl
Genspezifische Primer	0,6 µl
F & R	
cDNA (1:10)	2,0 µl
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>10,0 µl</b>

Die entsprechenden Sequenzen der verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 10 gelistet und das Temperaturprogramm in der qRT-PCR in Tabelle 9.

\*qRT-PCR-Protokoll (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems-Applera Deutschland GmbH, D-64293 Darmstadt):

Schritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1:	1	95 °C	10:00 min
2:	45	95 °C	00:15 min
		56 °C	01:00 min
3:	1	95 °C	00:15 min
		60 °C	01:00 min
		95 °C	00:15 min
		60 °C	00:15 min

**Tabelle 10: genspezifische Primerpaare**

Genspezifische Primerpaare des Haushaltsgens *cyc* sowie der ausgewählten Enzyme des Tryptophanstoffwechsels

Primerpaare	Sequenz: 5'→3'
<i>cyc fwd</i>	TGAGGAAGAAGCTAAAGCCGAG
<i>rev</i>	AGCTCCGTTGTTGGCAGC
siRNA	
t-2,3-do <i>fwd</i>	CGGGATTCCAGAGTCTTCAG
<i>rev</i>	TGAGGTCTGTGTCGTTGAAAA
alh-7 <i>fwd</i>	ATCGTTTTTCGATGATGCTGA
<i>rev</i>	AGATTTCGATTGGCAGAGACG
acds <i>fwd</i>	GAGCCCAACTGCTTCGATAC
<i>rev</i>	TTTCGGTGTGTCAGCAGGTTTA
tph-1 <i>fwd</i>	ACTCGAAGAAAGCTGCTGGA
<i>rev</i>	GATCCACTTCGACGAAAACG

## 4. Statistik

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels SPSS 20 (Inc. SPSS, Chicago, IL, USA) und GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler. Unterschiede zwischen verglichenen Gruppen wurden ab einem p-Wert von  $p \leq 0.05$  als signifikant gewertet, insofern nicht anders vermerkt. Zur Adjustierung des globalen  $\alpha$ -Niveaus wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt. Die jeweiligen adjustierten Signifikanzniveaus sind an entsprechender Stelle vermerkt. Falls nicht für Bonferroni korrigiert wurde, wurde die Analyse als explorativ gewertet.

### 4.1 Humane Studien

Für die in den Tabellen aufgeführten Vergleiche der Verteilung der gemessenen Parameter sowie deren prospektiver Veränderungen wurde wie folgt verfahren. Alle Werte eines Messzeitpunktes wurden hinsichtlich ihrer Normalverteilung getestet. Weitere Vergleiche der gleichen Parameter zwischen verschiedenen Zeitpunkten erfolgten (I) bei vorliegender Normalverteilung mittels parametrischer Tests (t-Test, ANOVA) und (II) bei nicht normalverteilten Daten mittels nicht-parametrischer Tests (Rangvarianzanalyse, Mann-Whitney-U-Test, Kolmogorov-Smirnov Test). Nominalskalierte Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. In den Tabellen wurden jeweils die absolute Zahl vorliegender Messwerte und die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen aufgeführt. Paarweise Vergleiche erfolgten nur mit Probanden, die zu beiden Zeitpunkten erschienen. Der aus diesen Vergleichen resultierende p-Wert wurde aufgeführt. Unterschiede in den Parametern wurden ab einem p-Wert von  $p \leq 0.05$  als signifikant gewertet.

Bei vorliegender Normalverteilung erfolgten Korrelationsanalysen nach Pearson. Die FGF21-Messwerte wurden aufgrund fehlender Normalverteilung logarithmiert.

Die Schätzung des Risikos für Störungen im Glukosestoffwechsel sowie für das Metabolische Syndrom erfolgte in Terzilen der logarithmierten FGF21-Konzentrationen mittels logistischer Regressionsanalysen. Berechnet wurden zwei Modelle. Im ersten Modell erfolgte eine Adjustierung für die Größen Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up-Zeit, im zweiten Modell zusätzlich für WHR, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, den systolischen Blutdruck und die Nüchtern-Glukose. Angegeben wurden das relative Risiko (OR) sowie das 95%ige Konfidenzintervall.

In den Regressionsanalysen zur Ermittlung des Risikos für einen inzidenten T2DM sowie Störungen im Glukosestoffwechsel unter Berücksichtigung der Serum-Vaspin-Spiegel wurden folgende Modelle verwendet. Im ersten Modell erfolgte eine Adjustierung für die Größen Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up-Zeit. Dieses Modell wurde erweitert um (i) die Nüchtern glukose, die Blutglukose nach 120min und den HbA1c, (ii) LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und die Triglyzeride und (iii) den systolischen und diastolischen Blutdruck. Im zweiten Modell erfolgte die Adjustierung für die Größen Hüftumfang, HbA1c, leichte körperliche Aktivität und Leukozyten. Angegeben wurden das relative Risiko (OR) sowie das 95%ige Konfidenzintervall.

Bei der Auswertung der Gewichtsverläufe standen Daten von 60 Probanden und 90 gematchten Kontrollen zur Verfügung. Das Matching erfolgte nach Geschlecht, BMI und Alter. Die Zuordnung und Klassifizierung für Störungen im Glukosestoffwechsel (IGT, IFG) sowie die Zuordnung eines *Diabetes mellitus* erfolgte anhand der ADA-Klassifizierung [10]. Bezüglich des Gewichtsverlaufs wurden zwei Unterteilungen vorgenommen. Eine beruhte auf einer von uns validiert, abgefragten Eigenangabe des Gewichtsverlaufs (Unterteilung in fünf Kategorien), die andere nach der tatsächlichen Gewichtsentwicklung (drei Kategorien). Die Kategorien nach Eigenangabe des Gewichtsverlaufs lauteten wie folgt: stabiler Verlauf (maximale Veränderungen des Gewichts von 2-3 kg), kontinuierliche Abnahme, kontinuierliche Zunahme, leicht schwankender ( $\pm 5$ kg) oder stark schwankender ( $> \pm 5$ kg) Verlauf ausgehend vom initialen Gewicht. Die Unterteilung in drei Gruppen anhand einer 3% Grenze (Veränderung zum Ausgangsgewicht  $> 3,1\%$ ,  $\pm 3,0\%$  oder  $< 3,1\%$ ) wurde mit dem Ziel, die Gruppen etwa gleich groß zu halten, vorgenommen.

Die Berechnung des kardiovaskulären Risikos erfolgte über den Framingham-Score [67]. Die absoluten Risiken für die jeweiligen Gruppen als Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen wurden tabellarisch für zwei Zeitpunkte aufgeführt. Paarweise Vergleiche erfolgten nur mit Probanden, die zu beiden Zeitpunkten erschienen. Der aus diesen Vergleichen resultierende p-Wert wurde aufgeführt. Die relative Veränderung des Risikos pro Jahr wurde für das 5.-95. Perzentil dargestellt. Insofern die Analyse auf Unterschiede in den Varianzen über alle Gruppen (ANOVA, Rangvarianzanalyse) signifikant war, wurde mittels Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. Zur Adjustierung des globalen  $\alpha$ -Niveaus wurde die Bonferroni Korrektur angewandt. Das adjustierte  $\alpha$ -Niveau belief sich auf  $p \leq 0.005$ .

## 4.2 Analyse der Studien mit *C.elegans*

Für die Datenerfassung wurde Microsoft-® Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) verwendet, für die statistische Auswertung der Daten wurde SPSS 18 (Inc. SPSS, Chicago, IL, USA) verwendet. Die Überlebenszeit-Analyse erfolgte mittels Kaplan Meier. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Log-Rank Tests ermittelt. Jeder *Life span Assay* wurde viermal wiederholt. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte über die delta ct-Methode.

Die Bestimmung der Metaboliten erfolgte für jedes Experiment und Gruppe aus 6 biologischen Proben. Um die Varianz zwischen den Proben zu verringern, wurden die Daten aus den Metabolitenmessungen mittels logarithmischer Transformation und Ausrichtung am Median aller gemessenen Signalstärken einer Probe normalisiert. Diese Transformation reduzierte den dominanten Effekt sehr starker Signale. Im Gegenzug verstärkte es die Signale von bisher schwachen bisher unbedeutenden Metaboliten. Zur Identifizierung jener Metaboliten, die verschiedenen Behandlungen widerspiegeln, erfolgte ein Gruppenvergleich mittels t-Test. Für weiterführende Analysen der verschiedenen Modelle wurden multivariate Analysenmodelle wie die PCA verwendet, ausgeführt über SPSS 18.0 mit den normalisierten Daten.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Etablierung einer Nachbeobachtung für die MeSyBePo Studie

Die 2002 gestartete Querschnittsstudie Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam (MeSyBePo) schließt Probandendaten von über 2000 Teilnehmern ein. Ziel der Studie ist es, Zusammenhänge von Charakteristika des Metabolischen Syndroms, sowie Adipositas-assoziiierter Erkrankungen zu evaluieren. Besonderes Interesse gilt dem T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen als Folge der Adipositas [106]. Die Studie sieht eine erste Nachuntersuchung (Follow-up) nach mindestens 3 Jahren vor. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden 1600 Teilnehmer eingeladen, von ihnen nahmen 584 Personen (174 Männer, 410 Frauen) an der Folgeuntersuchung teil. Die Daten dieser 584 Teilnehmer bilden den hier verwendeten Datensatz.

#### 5.1.1 Verteilung und prospektive Veränderungen der phänotypischen Charakteristika der Probanden

##### *Kohorte der Folgeuntersuchung (Follow-up)*

Zum Einschlusszeitpunkt der Studie betrug das mittlere Alter der 584 Teilnehmer 56 Jahre (Tabelle 11). Von den 584 Teilnehmern (410 Frauen, 70%) gaben 45 Personen (8%) an zu rauchen. Der mittlere BMI von  $29,6 \pm 6,0$  galt als übergewichtig. Dem BMI folgend, betrug der WHR  $0,89 \pm 0,1$  und der Gesamtkörperfettanteil 37%.

Zur Folgeuntersuchung betrug das Alter im Durchschnitt 61 Jahre und die Follow-up-Zeit im Mittel 5,3 Jahre. Über diese Zeit ist die Anzahl der Raucher um 1,4% angestiegen ( $p \leq 0,001$ ). Ebenso zeigten sich signifikante Anstiege für den BMI ( $30,3 \pm 6,3$ ,  $p \leq 0,001$ ), den WHR ( $0,9 \pm 0,1$ ,  $p \leq 0,001$ ) und für den Gesamtkörperfettanteil ( $p \leq 0,001$ ).

Alle betrachteten Parameter bis auf HDL-Cholesterin (unverändert) zeigten während des Beobachtungszeitraumes eine signifikante Veränderung.

**Tabelle 11: Parameterverteilung der Follow-up Kohorte**

Parameterverteilung der Follow-up Kohorte (584 Personen) zu Studienbeginn und zur Folgeuntersuchung. Daten angegeben als Anzahl n (%) oder MW  $\pm$  Stabw zu Studienbeginn  $F_b$  und zur Folgeuntersuchung  $F_f$ ; Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$

Parameter	n	$F_b$		n		$F_f$		p-Werte
								$F_b$ vs. $F_f$
Alter (J)	584	55,6	$\pm$ 11,25	584	60,9	$\pm$ 11,24	$\leq 0,001$	
Frauen	584	410	(70,2)	584	410	(70,2)		
Raucher	584	45	(7,7)	563	53	(9,1)	$\leq 0,001$	
<b>Anthropometrie</b>								
BMI ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ )	584	29,6	$\pm$ 5,98	584	30,3	$\pm$ 6,32	$\leq 0,001$	
Körpergewicht (kg)	584	83,4	$\pm$ 18,15	584	83,9	$\pm$ 18,88	$\leq 0,001$	
WHR	584	0,89	$\pm$ 0,10	584	0,90	$\pm$ 0,09	$\leq 0,001$	
Tailenumfang (cm)	582	96,5	$\pm$ 15,47	581	96,7	$\pm$ 16,39	$\leq 0,001$	
Hüftumfang (cm)	583	108,1	$\pm$ 13,52	581	107,6	$\pm$ 15,74	$\leq 0,001$	
Körperfett (%)	579	36,7	$\pm$ 7,66	540	38,1	$\pm$ 7,48	$\leq 0,001$	
<b>Blutdruck</b>								
Systole (mmHg)	564	126,9	$\pm$ 16,98	544	130,4	$\pm$ 17,21	$\leq 0,001$	
Diastole (mmHg)	564	78,4	$\pm$ 9,71	544	82,9	$\pm$ 31,75	<b>0,014.</b>	
<b>Glukosestoffwechsel</b>								
Glukose 0 min (mg/dl)	579	97,8	$\pm$ 21,88	579	107,0	$\pm$ 24,02	$\leq 0,001$	
Glukose 120 min (mg/dl)	533	121,6	$\pm$ 46,10	490	118,9	$\pm$ 42,55	$\leq 0,001$	
Insulin 0 min (mU/l)	579	9,0	$\pm$ 6,04	545	10,8	$\pm$ 6,95	$\leq 0,001$	
HbA1c	581	5,6	$\pm$ 0,63	580	5,5	$\pm$ 0,63	$\leq 0,001$	
HOMA <sub>IR</sub>	574	2,3	$\pm$ 1,95	540	2,9	$\pm$ 2,34	$\leq 0,001$	
<b>Lipidstoffwechsel</b>								
Gesamt-Cholesterin (mmol/l)	582	5,5	$\pm$ 1,05	581	5,7	$\pm$ 3,76	<b>0,002</b>	
HDL-Cholesterin (mmol/l)	581	1,4	$\pm$ 0,37	581	1,4	$\pm$ 0,39	n.s.	
LDL-Cholesterin (mmol/l)	577	3,5	$\pm$ 0,92	581	3,5	$\pm$ 0,88	$\leq 0,001$	
Triglyzeride (mmol/l)	584	1,5	$\pm$ 0,79	581	1,5	$\pm$ 0,99	$\leq 0,001$	

### 5.1.2 Aussagekraft von FGF21 für die Prädiktion von metabolischen Störungen

In der Leber synthetisierte Proteohormone sind in der Lage in viele Stoffwechselwege und Entwicklungsvorgänge regulatorisch einzugreifen. Ein neu entdecktes Hormon ist FGF21, welches scheinbar Einfluss auf das Diabetes Risiko und die Regulation des Blutzuckers hat. So sind für Personen mit koronarer Herzkrankheit als auch bei Diabetikern erhöhte FGF21-Konzentrationen dokumentiert [123]. Aus diesem Grund wurde FGF21 in die Analysen mit einbezogen, mit der Fragestellung ob FGF21 prädiktiv für die Diabetesinzidenz oder das Metabolische Syndrom genutzt werden kann.

Unter Ausschluss aller, die an einer Intervention zur Gewichtsreduktion teilnahmen sowie Probanden mit einem zur Eingangsuntersuchung diagnostizierten T2DM gingen 440 (151 m/ 289 f) nicht-diabetische Personen mit in die Analyse ein. Bis zur Folgeuntersuchung wiesen 54 (26 m/28 f) ein Metabolisches Syndrom auf 35 (14 m/ 21 f) entwickelten einen T2DM und 69 (29 m/ 40 f) Teilnehmer verschlechterten sich von ursprünglich normalen Blutglukosewerten zu einer eingeschränkten Glukosetoleranz.

**Tabelle 12: Parameterverteilung FGF-21 Kohorte**

Parameterverteilung der Kohorte zu Studienbeginn sowie für alle Personen mit späterem Metabolischem Syndrom, Daten angegeben als Anzahl n oder MW  $\pm$  Stabw, Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$

Parameter	Kontrollen	Inzidenz MetS	p- Wert
Geschlecht (m/w)	125/261	26/28	
Alter (J)	55,6 $\pm$ 0,6	57,6 $\pm$ 1,3	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,3 $\pm$ 0,3	30,1 $\pm$ 0,7	0,006
WHR	0,89 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0	0,005
Gesamt Cholesterin (mmol/l)	5,51 $\pm$ 0,5	5,74 $\pm$ 0,1	n.s.
LDL-Cholesterin (mmol/l)	3,42 $\pm$ 0,05	3,64 $\pm$ 0,1	n.s.
HDL-Cholesterin (mmol/l)	1,45 $\pm$ 0,02	1,35 $\pm$ 0	n.s.
Triglyzeride (mmol/l)	1,43 $\pm$ 0,04	1,65 $\pm$ 0,1	n.s.
Glukose 0 min (mg/dl)	96,9 $\pm$ 1,1	97,1 $\pm$ 2,2	n.s.
Glukose 120 min (mg/dl)	121 $\pm$ 2,5	127 $\pm$ 6,1	n.s.
HbA1c (%)	5,5 $\pm$ 0,03	5,84 $\pm$ 0,2	0,005
Systole (mmHg)	126 $\pm$ 1	130 $\pm$ 2	n.s.
Diastole (mmHg)	78 $\pm$ 1	81 $\pm$ 1	0,012
FGF-21 (pg/ml)	278 $\pm$ 10,1	326 $\pm$ 21	0,006

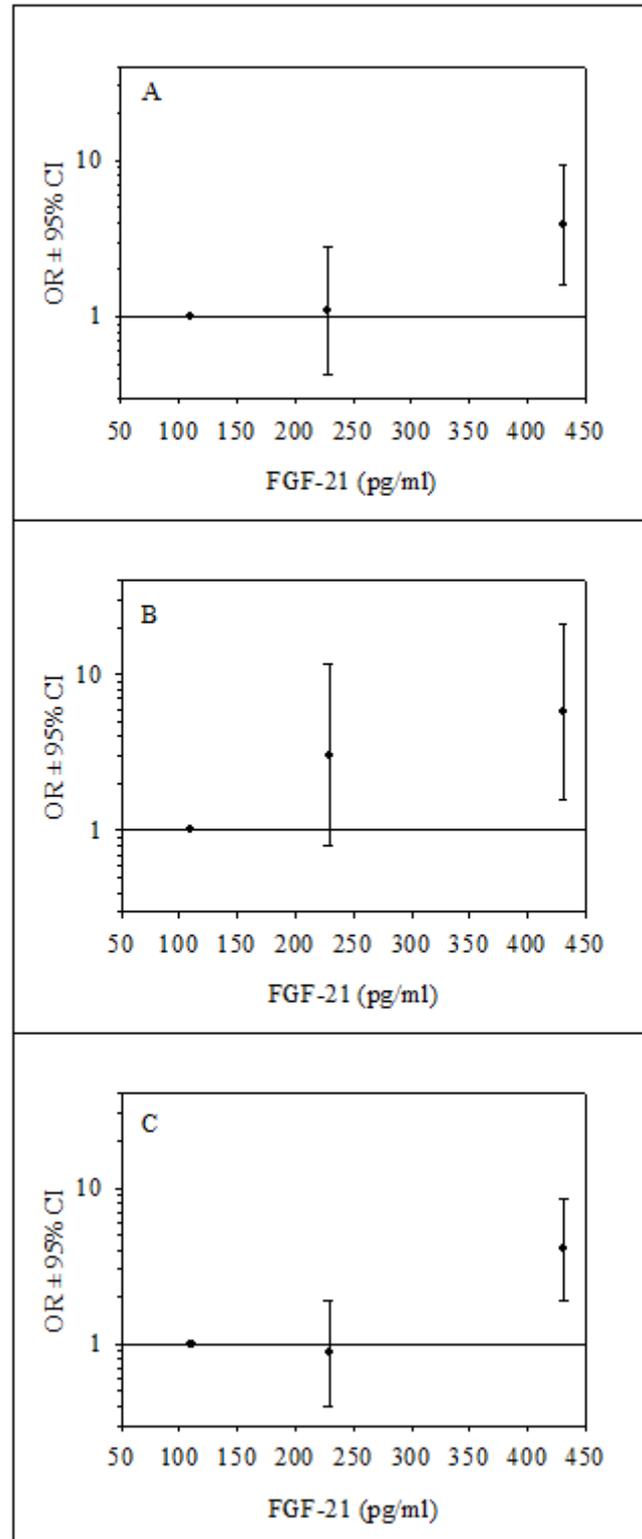
Die Parameterverteilung dieser Kohorte zu Studienstart ist in Tabelle 12 aufgelistet sowie die Mittelwerte der Parameter zu Studienbeginn aller Personen, die nach durchschnittlich 5,3 Jahren mit einem Metabolischen Syndrom diagnostiziert wurden. So hatten Personen, die

später ein Metabolisches Syndrom entwickelten, bereits zu Studienbeginn einen höheren BMI ( $p=0,006$ ), WHR ( $p=0,005$ ), Hb1Ac ( $p=0,005$ ) und diastolischen Blutdruck ( $p=0,012$ ) im Vergleich zu den Kontrollen. Für Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, dem Systolischen Blutdruck und dem Alter fanden sich keine Unterschiede zwischen diesen beiden Kohorten.

Die FGF21-Spiegel korrelierten zu Studienbeginn signifikant mit dem systolischen ( $r=0,185$ ;  $p<0,001$ ) und diastolischen ( $r=0,169$ ;  $p<0,001$ ) Blutdruck, den Triglyzeriden ( $r=0,273$ ;  $p<0,001$ ), dem WHR ( $r=0,103$ ;  $p=0,032$ ), BMI ( $r=0,243$ ;  $p<0,001$ ), Alter ( $r=0,280$ ;  $p<0,001$ ), Hb1Ac ( $r=0,225$ ;  $p<0,001$ ), der Nüchtern glukose ( $r=0,156$ ;  $p=0,001$ ) und der 2h Glukose ( $r=0,241$ ;  $p<0,001$ ). Für LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und die freien Fettsäuren ergaben sich keine signifikanten Korrelationen.

Patienten, die später ein MetS entwickelten hatten zur Eingangsuntersuchung höhere FGF21-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen ( $p=0,006$ ). Selbst wenn andere bekannte Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up Zeit (Modell 1) sowie WHR, der systolische Blutdruck, HDL-Cholesterin, Triglyzeride und die Nüchtern glukose (Modell 2) mit in die Berechnung aufgenommen wurden, blieb FGF21 ein unabhängiger Prädiktor für das Metabolische Syndrom. Im ersten Modell belief sich das Risiko auf ein *Odds Ratio* (OR) von 2,6 95%CI 1,5 - 4,5;  $p=0,001$  im zweiten Modell OR 2,2 95%CI 1,2 - 4,1;  $p=0,009$  (Abb. 8).

Im nächsten Schritt erfolgte die Analyse jener Personen ohne Diabetesprävalenz (Prävalenz zu Studienbeginn). Im ersten Modell war FGF21 eindeutig mit T2DM assoziiert (OR 2,4 95%CI 1,2 - 4,7;  $p=0,002$ ) und auch im zweiten Modell war der Schätzer vergleichbar (OR 2,0 95%CI 0,91 - 4,3;  $p=0,086$ ) (Abbildung 8B OR für FGF21 Terzile beider Modelle). Zuletzt wurde der Zusammenhang zu einem eingeschränkten Glukosestoffwechsel analysiert und erwies sich ebenfalls signifikant (OR 1,9 95%CI 1,2 - 3,3;  $p=0,012$ ) (Abb. 8C). Es ergaben sich keine Zusammenhänge für ein verändertes Risiko abhängig vom BMI, WHR, und dem Blutdruck. Ebenso zeigten sich keine Zusammenhänge für die Lipidparameter zum Zeitpunkt des Follow-up.



**Abb. 8: Risikoabschätzungen in Abhängigkeit der FGF21-Spiegel**

Risikoschätzung für (A) das Metabolische Syndrom, (B) T2DM und (C) die Verschlechterung zu einem gestörten Glukosestoffwechsel in den Terzilen der FGF21-Spiegel, adjustiert für Alter, Geschlecht, BMI, Follow-up Zeit. Die Fehlerbalken stellen das 95%ige Konfidenzintervall dar. Die horizontale Linie gilt als Referenzlinie für OR=1, es erfolgte die Auftrennung in Terzile nach FGF21-Konzentrationen.

### 5.1.3 Aussagekraft von Vaspin für die Prädiktion von Störungen der Glukosehomöostase

Dem vom Fettgewebe sezernierten Adipokin Vaspin wird ein Einfluss auf die Blutglukoseregulation in Abhängigkeit vom Körpergewicht zugeschrieben [26, 37]. Es wurde mit der Frage in die Analysen eingeschlossen, ob es prädiktiv für die frühzeitige Erkennung eines Diabetes oder einer gestörten Regulation des Glukosestoffwechsels genutzt werden kann.

Unter Ausschluss aller Teilnehmer der Gewichtsreduktionskurse sowie aller Probanden mit einem zur Eingangsuntersuchung diagnostizierten T2DM gingen 361 (99 m/ 223 f) nicht-diabetische Personen in die Analyse ein. Bis zur Folgeuntersuchung wiesen 39 (10 m/ 29 f) Personen einen T2DM auf, 50 (21 m/ 29 f) Teilnehmer mit ursprünglich normalen Blutglukosewerten zeigten eine gestörte Glukosetoleranz.

**Tabelle 13: Parameterverteilung der Vaspin Kohorte**

Verteilung der Parameter zu Studienbeginn sowie für alle Personen mit späterem T2DM, Daten angegeben als Anzahl n oder MW  $\pm$  Stabw Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$

Parameter	Kontrollen		Inzidenz T2DM		p- Wert
Geschlecht (m/w)	99/223		10/29		
Alter (J)	54,9	$\pm$ 11,4	57,1	$\pm$ 11,5	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,9	$\pm$ 5,4	33,7	$\pm$ 5,8	$\leq 0,001$
WHR	0,88	$\pm$ 0,115	0,92	$\pm$ 0,076	0,008
Gesamt Cholesterin (mmol/l)	5,6	$\pm$ 1	5,34	$\pm$ 1,1	n.s
LDL -Cholesterin (mmol/l)	3,52	$\pm$ 0,9	3,31	$\pm$ 1	n.s
HDL-Cholesterin (mmol/l)	1,46	$\pm$ 0,4	1,29	$\pm$ 0,3	0,005
Triglyzeride (mmol/l)	1,36	$\pm$ 0,7	1,65	$\pm$ 1	0,023
Glukose 0 min (mg/dl)	90,7	$\pm$ 12,1	99,4	$\pm$ 16,6	0,002
Glukose 120 min (mg/dl)	109	$\pm$ 31,4	134,2	$\pm$ 34,5	$\leq 0,001$
HbA1c (%)	5,4	$\pm$ 0,5	5,9	$\pm$ 0,82	$\leq 0,001$
Systole (mmHg)	124	$\pm$ 17	131	$\pm$ 15	0,013
Diastole (mmHg)	77	$\pm$ 9	80	$\pm$ 10	n.s
Vaspin (pg/ml)	1,2	$\pm$ 1,22	1,7	$\pm$ 1,54	0,085

Die Verteilung verschiedener Charakteristika der Kohorte zu Studienstart ist in Tabelle 13 aufgelistet sowie die Mittelwerte zu Studienbeginn aller Personen. Personen, die später einen T2DM entwickelten, hatten bereits zu Studienbeginn einen höheren BMI ( $p \leq 0,001$ ), WHR ( $p = 0,008$ ), Triglyzeride ( $p = 0,023$ ), Glukose 0min ( $p = 0,002$ ) und Glukose 120min ( $p \leq 0,001$ ), HbA1c ( $p \leq 0,001$ ) sowie den systolischen Blutdruck ( $p = 0,013$ ) im Vergleich zu den Kontrollen. HDL-Cholesterin ( $p = 0,005$ ) war im Vergleich der Gruppen signifikant erniedrigt.

Für das Alter, Cholesterin, die Diastole und Vaspin selbst fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, wobei sich für Vaspin ein Trend zu höheren Spiegel bei Probanden mit inzidentem *Diabetes mellitus* Typ 2 zeigte.

Korrelationsanalysen der Parameter zu Studienbeginn wiesen signifikante Zusammenhänge zwischen dem Vaspin-Spiegel und dem Geschlecht ( $r=0,173$ ;  $p=0,001$ ), dem HDL-Cholesterin ( $r=0,105$ ;  $p=0,048$ ) und den Triglyzeriden ( $r=0,112$ ;  $p=0,035$ ) nach. Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Vaspin-Spiegel zu Studienbeginn und den Variablen Alter, BMI, WHR, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, Glukose 0min, Glukose 120min, HbA1c und Blutdruck. Korrelationsanalysen für den Vaspin-Spiegel zu Studienbeginn und den genannten Parametern zur Nachuntersuchung wiesen signifikante Korrelationen für das Geschlecht ( $r=0,138$ ;  $p=0,009$ ) und den diastolischen Blutdruck ( $r=0,133$ ;  $p=0,016$ ) auf, für die restlichen Parameter zeigten sich keine Zusammenhänge.

Patienten, die später einen T2DM entwickelten, hatten zur Eingangsuntersuchung etwas höhere mittlere Vaspin-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen ( $p=0,085$ ). Ob Vaspin im Rückschluss für die Kohorte prädiktiv für die Erkennung eine T2DM hätte fungieren können wurde in logistischen Regressionsmodellen überprüft. In einem ersten Modell (Modell 1) erfolgte zunächst eine grobe Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up Zeit. Bereits in diesem ersten Modell erwiesen sich Vaspin (OR 1,6 95%CI 1,2 – 2,1;  $p=0,003$ ) und der BMI (OR 1,2 95%CI 1,1- 1,3;  $p\leq 0,001$ ) als signifikante Faktoren für die Entwicklung eines T2DM. In erweiterten Modellen, in denen Parameter des Glukosestoffwechsels aufgenommen wurden (Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up Zeit sowie Glukose 0min, Glukose 120min und HbA1c) zeigten sich für die Nüchternglukose ein OR von 1,0 (95%CI 1,1 – 1,3;  $p=0,038$ ) und für die Blutglukose nach 120min ein OR von 1,01 (95%CI 1,00 – 1,02;  $p=0,038$ ). In diesen und allen weiteren Modellen zeigte sich Vaspin als signifikanter Einflussfaktor für die Entwicklung eines T2DM mit einem OR von 1,4 (95%CI 1,0 – 1,9;  $p=0,021$ ). In Anbetracht der vorhergehenden Korrelationsanalysen erfolgten weitere Regressionsanalysen unter Berücksichtigung der Lipide (Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up Zeit sowie LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride), wobei sich bis auf Vaspin kein weiterer signifikanter Einflussfaktor als aussagekräftig erwies. Ebenso wies eine Analyse unter Berücksichtigung der Blutdruckparameter (Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI und Follow-up Zeit sowie den systolischen und diastolischen Blutdruck) keine weiteren signifikanten Einflussfaktoren bis auf Vaspin selbst aus. In einem letzten Modell (Modell 2) wurden andere bekannte Einflussfaktoren wie der HbA1c, der Taillenumfang, die Leukozyten und die Aktivität mit in die Berechnung aufgenommen. Auch in diesem Modell verblieb Vaspin als signifikanter Einflussfaktor mit einen OR von 1,6 (95%CI

1,2 – 2,1;  $p=0,003$ ) und der HbA1c wies einen Trend aus (OR 1,9 95%CI 0,9 – 3,6;  $p=0,068$ ). Eine nach Geschlechtern getrennte Analyse minderte den p-Wert und damit die Aussagekraft für die männlichen Probanden aufgrund der geringen Personenzahl. Die Schätzer für Vaspin (Model 1), aufgeteilt nach Geschlecht (m:w), waren folgende: OR 2,0 95%CI 1,0 – 4,0;  $p=0,063$  vs. OR 1,5 95%CI 1,1 – 2,0;  $p=0,011$ . Die gleiche Analyse für das erweiterte Modell (Model 2) ergab folgende Schätzer (m:w) OR 1,5 95%CI 0,7 – 3,3;  $p=0,342$  vs. OR 1,5 95%CI 1,1 – 2,1;  $p=0,011$ .

Die durchgeführten Analysen weisen Vaspin als signifikanten Einflussfaktor für die Ausbildung eines T2DM mit einem OR von 1,6 aus. Ob dieser Zusammenhang bereits im prädiabetischen Zustand und somit bei Vorliegen einer gestörten Glukosetoleranz besteht, wurde ebenso in den beschriebenen Modellen geprüft. Ein Vergleich der Mittelwerte der gemessenen Parameter zwischen den Kontrollen und den Personen mit gestörter Glukosetoleranz wies deutlich geringere Unterschiede in den Mittelwerten auf (Anhang A1) ein Unterschied in den Vaspin-Spiegeln bestand zwischen diesen Gruppen nicht. Im Falle einer gestörten Glukosetoleranz als Zielvariable kommt Vaspin keine Rolle als erklärende Einflussvariable zu.

## 5.2 Etablierung einer Langzeit-Nachbeobachtung der Gruppe von Patienten mit standardisierter Intervention

### *Interventionsgruppe*

Von den beschriebenen 584 Personen haben direkt nach Einschluss in die Studie 60 Probanden an einem begleiteten einjährigen Gewichtsreduktionskurs teilgenommen und ausgehend von Alter und Gewicht zu Studienbeginn, diesen wurden 90 Kontroll-Probanden aus den verbleibenden 524 Probanden zugeordnet (siehe Methoden).

Zum Interventionsstart betrug das mittlere Alter der 60 Teilnehmer 56 Jahre, zwei Personen (3,3 %) gaben an zu rauchen (Tabelle 14),

Über den Beobachtungszeitraum stieg der BMI um 0,9 und war zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung  $35,2 \pm 5,7$  ( $p=0,004$ ). Parallel dazu steigt das Gesamtkörperfett bis zum Follow-up um 2,1% bis auf  $45,2 \pm 4,6$  % ( $p \leq 0,001$ ) an.

Der systolische Blutdruck stieg über den Beobachtungszeitraum von  $128,7 \pm 14,5$  mmHg auf  $135,6 \pm 16,5$  mmHg ( $p=0,004$ ), ebenso stieg die Nüchtern glukose von  $105,0 \pm 25,2$  mg/dl auf  $110,3 \pm 26,9$  mg/dl ( $p \leq 0,001$ ). Gegenläufig verhielt sich dazu der Blutglukosespiegel nach 2h. Ausgehend vom Ausgangswert von  $129,2 \pm 52,4$  mg/dl sank dieser im Mittel bis zum Follow-up auf  $103,9 \pm 31,1$  mg/dl ab ( $p=0,026$ ). Ein Einfluss der Intervention auf die Parameter des Lipidstoffwechsels zeigte sich nicht.

**Tabelle 14: Parameterverteilung der Teilnehmer der Gewichtsreduktion**

Parameter der Gewichtsreduktionsteilnehmer (GW) (60 Personen) zu Studienbeginn und zur Folgeuntersuchung. Daten angegeben als Anzahl n (%) oder MW  $\pm$  Stabw zu Studienbeginn  $GW_b$  und zur Folgeuntersuchung  $GW_f$ ; p Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$

Parameter	n	$GW_b$	n	$GW_f$	p-Werte $GW_b$ vs. $GW_f$
Alter	60	55,9 $\pm$ 9,35	60	60,4 $\pm$ 9,16	<b><math>\leq 0,001</math></b>
Frauen	60	54 (90)	60	54 (90)	
Raucher	60	2 (3,3)	60	6 (10,0)	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Anthropometrie</b>					
BMI ( $kg \cdot m^{-2}$ )	60	34,3 $\pm$ 5,24	60	35,2 $\pm$ 5,71	<b>0,004</b>
Körpergewicht (kg)	60	95,7 $\pm$ 17,82	60	96,6 $\pm$ 18,22	n.s
WHR	60	0,89 $\pm$ 0,08	60	0,90 $\pm$ 0,08	n.s
Taillenumfang (cm)	60	108,1 $\pm$ 14,44	60	106,7 $\pm$ 12,98	n.s
Hüftumfang (cm)	60	120,8 $\pm$ 11,83	60	121,2 $\pm$ 12,80	n.s
Körperfett (%)	57	43,1 $\pm$ 4,16	58	45,2 $\pm$ 4,61	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Blutdruck</b>					
Systole (mmHg)	60	128,7 $\pm$ 14,50	60	135,6 $\pm$ 16,46	<b>0,004</b>
Diastole (mmHg)	60	80,6 $\pm$ 10,61	60	82,8 $\pm$ 10,30	n.s
<b>Glukosestoffwechsel</b>					
Glukose 0 min (mg/dl)	60	105,0 $\pm$ 25,23	60	110,3 $\pm$ 26,91	<b><math>\leq 0,001</math></b>
Glukose 120 min (mg/dl)	54	129,2 $\pm$ 52,44	49	103,9 $\pm$ 31,12	<b>0,026</b>
Insulin 0 min (mU/l)	60	9,7 $\pm$ 6,06	58	14,5 $\pm$ 8,66	<b><math>\leq 0,001</math></b>
HbA1c	60	5,7 $\pm$ 0,83	60	5,7 $\pm$ 0,96	n.s
HOMA <sub>IR</sub>	60	2,7 $\pm$ 2,25	58	4,2 $\pm$ 3,87	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Lipidstoffwechsel</b>					
Gesamt-Cholesterin (mmol/l)	60	5,5 $\pm$ 0,88	60	5,7 $\pm$ 0,97	n.s
HDL-Cholesterin (mmol/l)	59	1,3 $\pm$ 0,29	60	1,4 $\pm$ 0,30	n.s
LDL-Cholesterin (mmol/l)	59	3,5 $\pm$ 0,74	60	3,6 $\pm$ 0,80	n.s
Triglyzeride (mmol/l)	60	1,4 $\pm$ 0,65	60	1,7 $\pm$ 1,04	n.s

*Kontrollgruppe*

Zum Interventionsstart betrug das mittlere Alter dieser Gruppe 57 Jahre (Tabelle 15). Fünf Personen (5,6%) gaben zu Beginn der Studie an zu rauchen, bis zum *Follow-up* stieg diese Zahl um 5,5% auf 10 Personen (11,1%) an.

Der Anstieg des BMI bis zur Folgeuntersuchung belief sich in dieser Gruppe auf 0,5 ( $p \leq 0,001$ ) BMI Punkte. Zum Zeitpunkt des Einschluss in die Studie betrug der BMI  $28,8 \pm 6,3$ . Bis zur Folgeuntersuchung  $29,3 \pm 6,6$ . Ebenso stiegen der WHR, der Taillenumfang sowie das Körperfett an. Der WHR stieg auf  $0,90 \pm 0,1$  an ( $p \leq 0,001$ ), der um 1,6 cm auf  $95,2 \pm 13,8$  cm ( $p = 0,003$ ) und das Gesamtkörperfett um 0,9% bis zur Nachfolgeuntersuchung auf  $35,9 \pm 8,3\%$  ( $p \leq 0,001$ ).

Es zeigten sich Veränderungen des Blutdrucks, im Glukosestoffwechsel auch für den Insulinspiegel und den  $HOMA_{IR}$ .

Bis auf eine signifikante Verschlechterung des HDL-Cholesterin von  $1,5 \pm 0,4$  mmol/l auf  $1,4 \pm 0,3$  mmol/l ( $p = 0,011$ ) zeigten sich keine Veränderungen auf die gemessenen Parameter des Lipidstoffwechsels.

**Tabelle 15: Parameterverteilung der Teilnehmer der Kontrollen**

Parameterverteilung der Teilnehmer der Kontrollen (K) (90 Personen) zu Studienbeginn und zur Folgeuntersuchung. Daten angegeben als Anzahl n (%) oder MW  $\pm$  Stabw zu Studienbeginn  $K_b$  und zur Folgeuntersuchung  $K_f$ ; Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$

Parameter	n	$K_b$	n	$K_f$	p-Werte $K_b$ vs. $K_f$
Alter	90	56,9 $\pm$ 11,7	90	61,7 $\pm$ 11,7	<b><math>\leq 0,001</math></b>
Frauen	90	56 (62,2)	90	56 (62,2)	
Raucher	90	5 (5,6)	90	10 (11,1)	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Anthropometrie</b>					
BMI ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ )	90	28,8 $\pm$ 6,32	90	29,3 $\pm$ 6,59	<b><math>\leq 0,001</math></b>
Körpergewicht (kg)	90	80,5 $\pm$ 16,55	90	81,1 $\pm$ 16,95	n.s
WHR	90	0,9 $\pm$ 0,10	89	0,9 $\pm$ 0,09	<b>0,017</b>
Taillenumfang (cm)	90	93,6 $\pm$ 14,80	89	95,2 $\pm$ 13,78	<b>0,003</b>
Hüftumfang (cm)	90	105,6 $\pm$ 12,83	89	106,0 $\pm$ 13,34	n.s
Körperfett (%)	90	35,0 $\pm$ 7,68	88	35,9 $\pm$ 8,28	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Blutdruck</b>					
Systole (mmHg)	87	127,2 $\pm$ 17,83	86	133,4 $\pm$ 18,35	<b><math>\leq 0,001</math></b>
Diastole (mmHg)	87	77,3 $\pm$ 9,39	86	82,5 $\pm$ 11,15	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Glukosestoffwechsel</b>					
Glukose 0 min (mg/dl)	89	101,6 $\pm$ 18,74	89	105,3 $\pm$ 20,27	<b>0,030</b>
Glukose 120 min (mg/dl)	83	124,1 $\pm$ 50,18	76	121,0 $\pm$ 46,64	n.s
Insulin 0 min (mU/l)	89	8,6 $\pm$ 5,90	84	10,6 $\pm$ 5,85	<b><math>\leq 0,001</math></b>
HbA1c	90	5,6 $\pm$ 0,79	90	5,5 $\pm$ 0,43	n.s
HOMA <sub>IR</sub>	88	2,2 $\pm$ 1,68	83	2,8 $\pm$ 1,78	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<b>Lipidstoffwechsel</b>					
Gesamt--Cholesterin (mmol/l)	90	5,4 $\pm$ 0,98	90	5,4 $\pm$ 0,96	n.s
HDL-Cholesterin (mmol/l)	90	1,5 $\pm$ 0,41	90	1,4 $\pm$ 0,32	<b>0,011</b>
LDL-Cholesterin (mmol/l)	90	3,3 $\pm$ 0,87	90	3,3 $\pm$ 0,77	n.s
Triglyzeride (mmol/l)	90	1,4 $\pm$ 0,69	90	1,5 $\pm$ 0,83	n.s

### 5.2.1 Inzidenz des T2DM und des Metabolischen Syndroms

In Abhängigkeit der Kategorisierung nach Gewichtsverläufen und Gewichtsveränderung, wurden die Inzidenzen für T2DM und das Metabolische Syndrom (MetS) betrachtet (Tabelle 16). Zu Studienbeginn waren bereits 13 Personen (21,6%) aus der Interventionsgruppe und 15 Personen (16,6%) der Kontrollgruppe mit einem T2DM diagnostiziert. Bis zur Folgeuntersuchung waren es insgesamt respektive 12 (20%) ( $p=0,825$ ) und 16 (17,7 %) Personen mit einem diagnostizierten T2DM ( $p=0,846$ ) Tabelle 16. In die Klassifizierung des MetS nach WHO fielen zu Studienbeginn 8 (13,3%) der 60 Gewichtsreduktionsteilnehmer und 13 Kontroll-Probanden (14,4%). Bis Studienende wiesen 24 (40%) der 60 Gewichtsreduktionsteilnehmer ( $p\leq 0,001$ ) ein MetS auf, von den Kontrollen sind 31 (34,4%) betroffen ( $p\leq 0,001$ ).

**Tabelle 16: Fallzahlen für T2DM und MetS der Gewichtsreduktionsteilnehmer (1)**

Fallzahlen für T2DM und MetS zur Eingangsuntersuchung und Follow-up der Teilnehmer der Gewichtsreduktion und Kontrollen nach Eigenangabe. Aufschlüsselung der Daten der Gewichtsreduktionsteilnehmer nach Eigenangabe des Gewichtsverlaufs. T2DM<sub>b</sub> Typ-2-Diabetes Eingangsuntersuchung, T2DM<sub>f</sub> Typ-2-Diabetes Follow-up, MetS<sub>b</sub> Metabolisches Syndrom Eingangsuntersuchung, MetS<sub>f</sub> Metabolisches Syndrom Follow-up

	n	T2DM <sub>b</sub>	T2DM <sub>f</sub>	MetS <sub>b</sub>	MetS <sub>f</sub>
<b>Eigenangabe Gewichtsverlauf Gewichtsreduktion (n=60)</b>					
1 stabil	5	3	3	0	3
2 abgenommen	10	2	1	0	3
3 zugenommen	12	2	2	1	3
4 leicht schwankend	9	2	2	0	4
5 stark schwankend	20	4	4	7	11
gesamt	56	13	12	8	24
<b>Kontrollen, konstantes Gewicht (n=90)</b>					
gesamt	90	15	16	13	31

Bei einer Aufteilung der Gewichtsreduktionsteilnehmer nach der tatsächlichen Gewichtsveränderung mit einem von uns gesetzten Grenzwert von 3% wies keine Gruppe eine deutlich höhere Fallzahl für T2DM-Fälle auf (Tabelle 17). Die Fallzahlen für das MetS zeigen bei dieser Auftrennung für die Folgeuntersuchung eine Häufung des Metabolischen Syndroms für diejenigen, die im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht relativ konstant geblieben sind.

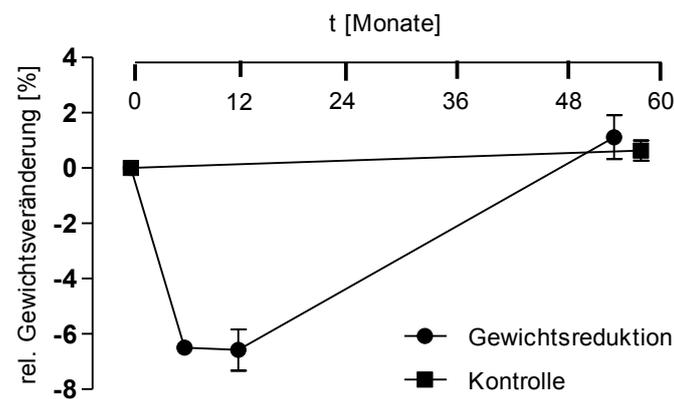
**Tabelle 17: Fallzahlen für T2DM und MetS der Gewichtsreduktionsteilnehmer (2)**

Fallzahlen für T2DM und MetS zur Eingangsuntersuchung und Follow-up der Teilnehmer der Gewichtsreduktion und Kontrollen. Aufschlüsselung der Daten der Gewichtsreduktionsteilnehmer nach relativer prozentualer Netto-Gewichtsveränderung. T2DM<sub>b</sub> Typ-2-Diabetes Eingangsuntersuchung, T2DM<sub>f</sub> Typ-2-Diabetes Follow-up, MetS<sub>b</sub> Metabolisches Syndrom Eingangsuntersuchung, MetS<sub>f</sub> Metabolisches Syndrom Follow-up

	n	T2DM <sub>b</sub>	T2DM <sub>f</sub>	MetS <sub>b</sub>	MetS <sub>f</sub>
<b>relative Netto-Gewichtsveränderung Gewichtsreduktion (n=60)</b>					
> 97% des Ausgangsgewichts	15	4	2	2	6
± 3%	25	6	6	4	12
> 103%	20	3	4	2	6
gesamt	60	13	12	8	24
<b>Kontrollen, konstantes Gewicht (n=90)</b>					
gesamt	90	15	16	13	31

### 5.2.2 Gewichtsverläufe unter Intervention

Die relative Gewichtsveränderung der 60 Teilnehmer der Gewichtsreduktion (GW) im Vergleich zu deren Kontrollen ist in Abb. 9 gezeigt. Während die Kontrollen im Mittel +0,6% des Ausgangsgewichts über die Zeit zunahm, war die Gewichtsveränderung der GW-Gruppe innerhalb des ersten Jahres durch die Intervention sehr groß. Die Gewichtsabnahme nach 6 Monaten belief sich auf -6,5% des Ausgangsgewichtes und konnte über die nächsten sechs Monate von fast allen Teilnehmern gehalten werden. Nach insgesamt zwölf Monaten betrug die mittlere Gewichtsabnahme -6,6% des Ausgangsgewicht. Bis zum *Follow-up* erfolgt eine vollständige Wiederzunahme des verlorenen Körpergewichts bis über den Ausgangswert hinaus. Die Gewichtsveränderung nach den insgesamt 54 Monaten (4,5 Jahre) betrug im Mittel +1,1% seit Studienstart.



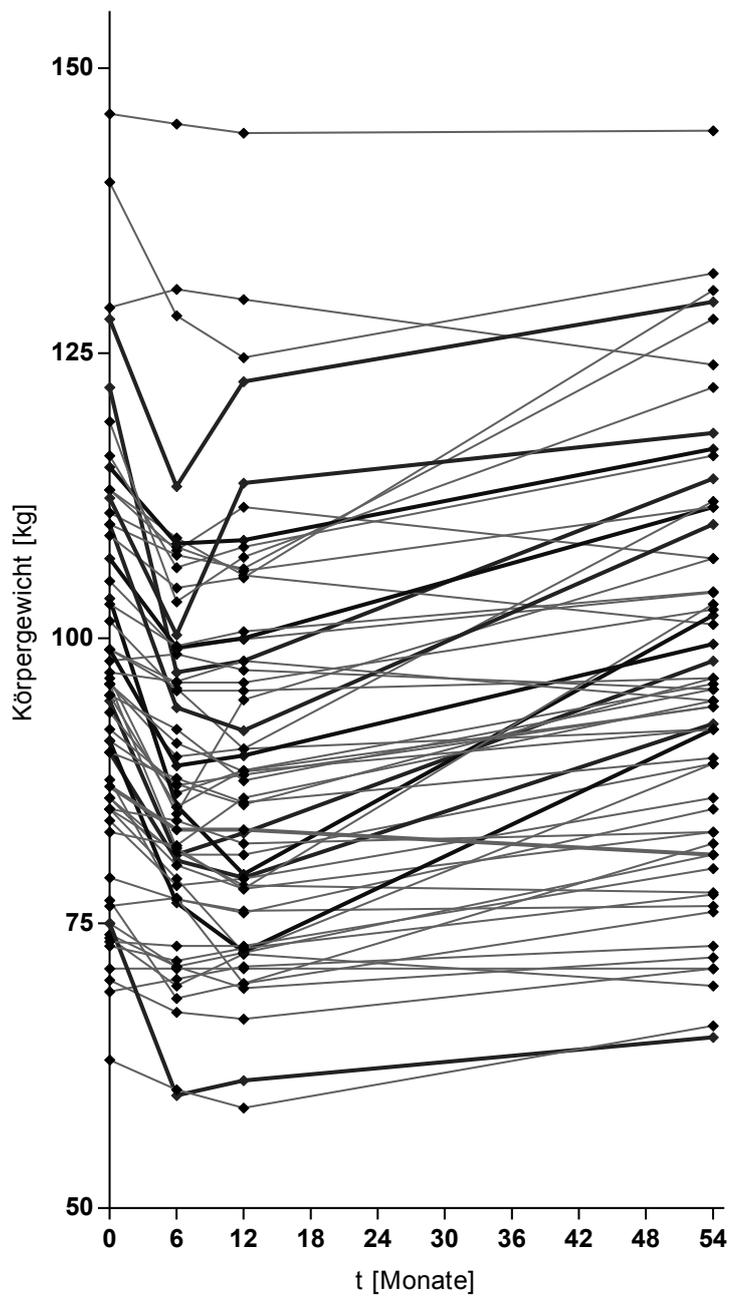
**Abb. 9: Gewichtsverlauf nach Studienbeginn der Teilnehmer der Intervention und Kontrollen**

Die Teilnehmer der Intervention wurden initial, nach sechs Monaten, nach einem Jahr sowie zur Folgeuntersuchung gewogen. Die Probanden der Kontrollgruppen wurden ausschließlich initial und zur Folgeuntersuchung gewogen. Dargestellt ist die mittlere Gewichtsveränderung  $\pm$  Standardfehler.

Inwiefern sich die individuellen Gewichtsverläufe in der Interventionsgruppe verhalten haben ist in Abb. 10 detailliert dargestellt. Die Verläufe der einzelnen Teilnehmer variierten sehr stark und verdeutlichen die individuelle Gewichtsveränderung der Teilnehmer auf die Intervention.

Der überwiegende Teil der Probanden nahm in den ersten sechs Monaten erfolgreich ab. Lediglich fünf der 60 Probanden waren nicht in der Lage abzunehmen, zwei Personen nahmen 1 kg zu. Über die nächsten sechs Monate nach der intensiv betreuten Reduktionsphase nahmen 29 Personen weiter ab, für die restlichen 31 stagnierte die weitere Abnahme, sechs von ihnen waren in der Lage ihr Gewicht direkt nach Kursende auch für die nächsten sechs Monate zu halten, die Restlichen nahmen zu. Über die Zeit des Follow-up bis zur Folgeuntersuchung gelang es nur noch acht Personen ihr Gewicht weiter zu reduzieren.

Mit einer gesamten Gewichtsveränderung von +1,1% nach 54 Monaten zeigte sich die deutliche Wiedernahme nach initial erfolgreicher Intervention. Mit dem Ende der Betreuung der Intervention war ein deutlicher Trend zur Wiedernahme des verlorenen Gewichts zu verzeichnen.

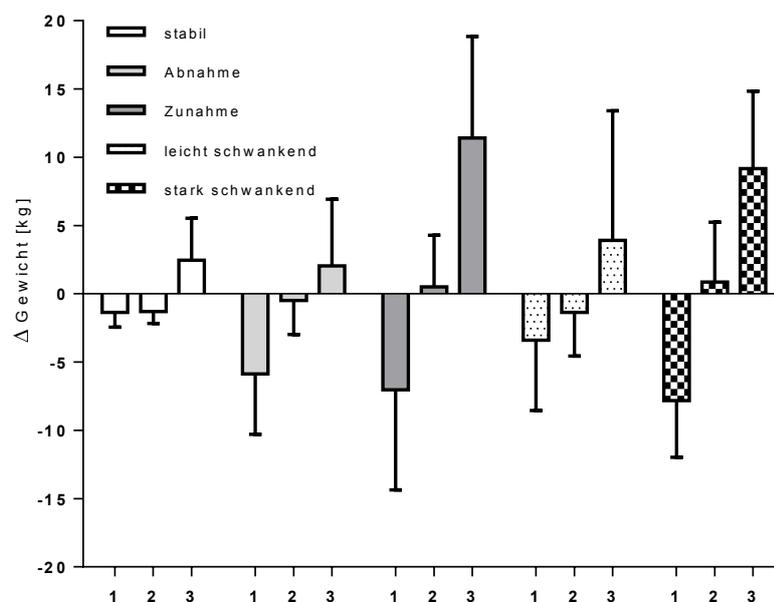


**Abb. 10: Individuelle Gewichtsverläufe nach Studienbeginn**  
Gewichtsverläufe der 60 Teilnehmer der Gewichtsreduktion über 54 Monate.

### 5.2.3 Validierung der Eigenangabe der Gewichtsentwicklung für die Gesamtkohorte

Die Gewichtsentwicklung aller Teilnehmer über die Beobachtungszeit wurde per Fragebogen aufgenommen. Sie sollten ihren Gewichtsverlauf einer von fünf Kategorien zuordnen. Diese waren: stabiler Verlauf, kontinuierliche Abnahme, kontinuierliche Zunahme, leicht schwankender oder stark schwankender Verlauf ausgehend vom initialen Gewicht. Für die Teilnehmer der Intervention standen neben der Zuordnung in eine Kategorie des Verlaufs zusätzliche Verlaufsdaten des Gewichts zur Verfügung. Um die Aussagekraft dieser Eigenangabe zur Gewichtsentwicklung zu validieren, verglichen wir die Daten der Eigenangabe mit den von uns dokumentierten Verlaufsdaten für die 60 Teilnehmer.

In Abb. 11 sind die mittleren Gewichtsveränderungen ( $\Delta$  Gewicht in kg) über drei Zeiträume aufgetragen: (1) Gewichtsveränderung vom 0.-6. Monat, (2) 6.-12. Monat, (3) 12.-54. Monat jeweils unterteilt für die entsprechende Kategorie der Eigenangabe des Gewichtsverlaufs.



**Abb. 11: Validierung Gewichtsentwicklung**

#### Gegenüberstellung der Eigenangaben und dokumentierten Daten zum Gewichtsverlauf

Dargestellt sind die Mittelwerte der Gewichtsveränderung der 60 Teilnehmer der Gewichtsreduktion,  $\Delta$ Gewicht [kg] für die Zeiträume (1) von 0. bis zum 6. Monat, (2) vom 6. bis 12. Monat, (3) und vom 12. bis zum 54. Monat (Folgeuntersuchung) für die jeweilige Zuordnung der Eigenangabe des Gewichtsverlaufs. Als stabiler Gewichtsverlauf ( $n=5$ ) galten maximale Schwankungen des Körpergewichts von 2-3kg bis zur Folgeuntersuchung, Abnahme ( $n=10$ ) und Zunahme ( $n=12$ ) galten jeweils für einen kontinuierlichen Verlauf der Gewichtsentwicklung bis zur Wiedereinbestellung. Ein leicht schwankender Gewichtsverlauf ( $n=9$ ) bezeichnet Veränderungen innerhalb von  $\pm 5$  kg um das Ausgangsgewicht, starke Veränderungen betreffen Veränderungen  $>5$  kg des Ausgangsgewichts ( $n=20$ ). Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw.

In die jeweiligen Gruppen ordneten sich fünf Personen der Gruppe mit stabilem Gewichtsverlauf zu, zehn gaben eine kontinuierliche Abnahme an, zwölf eine Zunahme. Neun ordneten sich einem leicht schwankendem Gewichtsverlauf zu und 20 Personen einem stark schwankendem Gewichtsverlauf. Vier Personen konnten bzw. wollten keine Aussage zu ihrem Gewichtsverlauf machen.

Es zeigte sich, dass sich die Teilnehmer entsprechend ihren Gewichtsverlauf weitestgehend korrekt zuordneten. Ihre Angaben deckten sich im Allgemeinen mit der dokumentierten Schwankung des Körpergewichts. So waren jene der ersten Gruppe, die einen stabile Gewichtsentwicklung angegeben haben auch jene, deren Werte für die relative Gewichtsveränderung ( $\Delta$  Gewicht) die geringsten Schwankungen aufweisen und die nach Abschluss der Intervention (nach 12 Monaten) bis zur Folgeuntersuchung im Mittel um  $2,4 \pm 3,1$  kg zunahmen.

Ähnlich verhielt es sich für die zweite Gruppe. Sie gaben an kontinuierlich abgenommen zu haben. So hat diese Gruppe innerhalb der ersten 6 Monate im Mittel  $-5,8 \pm 4,4$  kg abgenommen, die Abnahme stagnierte und über die nächsten sechs Monate wurde das Gewicht gehalten. Nach Abschluss der Intervention bis zur Folgeuntersuchung nahm diese Gruppe  $2,0 \pm 4,8$  kg zu. Die ersten beiden Gruppen waren somit jene mit den geringsten Nettogewichtsschwankungen bis zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung nach 4,4 Jahren.

Zwölf Teilnehmer gaben an, dass sie nach Interventionsende kontinuierlich zugenommen hätten. In dieser Gruppe fanden sich die höchsten mittleren Gewichtsverluste innerhalb der ersten sechs Monate der Intervention von  $-7,0 \pm 7,3$  kg. Nach weiteren sechs Monaten sind viele wieder auf ihrem Ausgangsgewicht zurückgefallen oder tendieren bereits zu einem höheren Gewicht. Bis zur Folgeuntersuchung lag der Mittelwert des Körpergewichts bei  $-11,4 \pm 7,4$  kg unter dem Ausgangsgewicht. Die Personen, die sich in die letzte Kategorie „stark schwankenden Gewichtsverlauf“ zugeordnet hatten, wiesen ebenso eine starke Abnahme über die ersten sechs Monate auf, die Zunahme im Zeitraum nach der Intervention betrug hier  $+9,2 \pm 5,7$  kg. Personen die sich der Gruppe „leichte Schwankungen des Körpergewichts“ zugeordnet hatten, verloren in der Interventionsphase im Mittel  $-3,4 \pm 5,1$  kg, konnten weiterhin eine Nettoabnahme von zusätzlichen  $-1,4 \pm 3,2$  kg erreichen und nahmen bis zur Folgeuntersuchung insgesamt  $+3,9 \pm 9,5$  kg zu.

Es zeichnet sich ein Trend ab, dass insbesondere Personen mit einem hohen anfänglichen Gewichtsverlust jene sind, die im Nachhinein die größte Wiederzunahme hatten. Im Gegensatz dazu schien es Teilnehmern mit einem moderaten Gewichtsverlust länger möglich zu sein, das verlorene Gewicht zu halten.

### 5.2.4 Schätzung des kardiovaskulären Risikos nach Eigenangabe des Gewichtsverlaufs

Der Framingham Score wurde zur Berechnung des individuellen zehnjährigen kardiovaskulären Risikos verwandt. Die jeweiligen Mittelwerte der Gruppen wurden in Tabelle 18 aufgelistet. Ein Vergleich des berechneten zehnjährigen kardiovaskulären Risikos zwischen Eingangsuntersuchung und Folgeuntersuchung zeigte für die 90 Kontrollen einen Anstieg des kardiovaskulären Risikos ( $p \leq 0,001$ ). Für die MeSyBePo Follow-up Kohorte (inklusive der 90 Kontrollen) und die Interventionsgruppe zeigten sich in der Gesamtbetrachtung keine Unterschiede. Differenziert nach dem Gewichtsverlauf, zeigte sich in vier der fünf Gruppen der MeSyBePo Follow-up Kohorte ein Anstieg im kardiovaskulären Risiko. Personen mit angegebenem stabilem Gewichtsverlauf, einer Zunahme aber auch Schwankungen des Gewichts, wiesen zur Folgeuntersuchung ein höheres kardiovaskuläres Risiko auf. Die einzige Ausnahme bildeten Personen, die erfolgreich und kontinuierlich Gewicht verloren hatten, für diese bestand zur Eingangsuntersuchung sowie zur Folgeuntersuchung das gleiche kardiovaskuläre Risiko wie bei Studienbeginn. Innerhalb der Teilnehmer der Gewichtsreduktion zeigte sich für Personen mit starken Schwankungen im Gewicht ein deutlicher Anstieg des kardiovaskulären Risikos.

**Tabelle 18: Zehnjähriges kardiovaskuläres Risiko (1)**

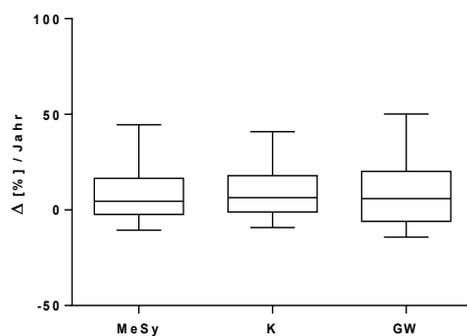
Zehnjähriges kardiovaskuläres Risiko zur Eingangsuntersuchung und Follow-up für alle Teilnehmer, Aufteilung nach Gruppen und Kategorie des Gewichtsverlaufs, MW  $\pm$  Stabw des Scores zu Studienbeginn  $Score_b$  und zur Folgeuntersuchung  $Score_f$

	Kat.	$n_b$	$Risiko_b$		$n_f$	$Risiko_f$		p-Wert
<b>MeSy</b>		502	8,7	$\pm$ 7,8	482	10,7	$\pm$ 9,6	n.s.
<b>Kontrollen</b>		88	9,4	$\pm$ 8,4	85	12,5	$\pm$ 10,7	$\leq 0,001$
<b>Gewichtsreduktion</b>		54	8,7	$\pm$ 6,2	55	9,6	$\pm$ 5,8	n.s.
<b>MeSy</b>	<b>1</b>	179	10,3	$\pm$ 8,4	170	12,2	$\pm$ 10,4	0,001
	<b>2</b>	45	8,4	$\pm$ 5,3	44	9,2	$\pm$ 8,6	n.s.
	<b>3</b>	57	6,1	$\pm$ 4,6	56	9,8	$\pm$ 8,4	$\leq 0,001$
	<b>4</b>	118	7,9	$\pm$ 8,4	112	9,6	$\pm$ 9,8	$\leq 0,001$
	<b>5</b>	54	6,3	$\pm$ 6,4	53	8,9	$\pm$ 7,1	0,012
<b>Gewichtsreduktion</b>	<b>1</b>	5	9,0	$\pm$ 4,7	5	12,5	$\pm$ 7,4	n.s.
	<b>2</b>	10	8,5	$\pm$ 6,1	10	7,8	$\pm$ 4,4	n.s.
	<b>3</b>	12	9,0	$\pm$ 9,3	12	8,6	$\pm$ 4,6	n.s.
	<b>4</b>	9	8,8	$\pm$ 7,4	9	6,7	$\pm$ 3,9	n.s.
	<b>5</b>	20	7,8	$\pm$ 4,8	20	11,9	$\pm$ 6,7	0,010

Kat. = Kategorie des Gewichtsverlaufs: 1 stabiler Verlauf (maximale Veränderungen des Gewichts von 2-3 kg), 2 kontinuierliche Abnahme, 3 kontinuierliche Zunahme, 4 leicht schwankender ( $\pm 5$ kg) oder 5 stark schwankender ( $> \pm 5$ kg) Verlauf

Die relativen Veränderungen des kardiovaskulären Risikos pro Jahr für die Gruppen MeSyBePo-Follow-up inklusive der 90 Kontrollen sowie die 90 Kontrollen separat und die 60 Teilnehmer sind in der Abb. 12A dargestellt (5.-95. Perzentil). Ein gruppenübergreifender Vergleich der prozentualen Veränderungen des kardiovaskulären Risikos pro Jahr wies hier keine Unterschiede aus. Wie auch in den Tabellen 5 bis 8 bereits ersichtlich war, stieg das mittlere kardiovaskuläre Risiko für alle Gruppen gleichermaßen an. Bei der Verteilung der Daten aller drei betrachteter Gruppen, zeigten sich die größten Streuungen für die Personen oberhalb des 75. Perzentil.

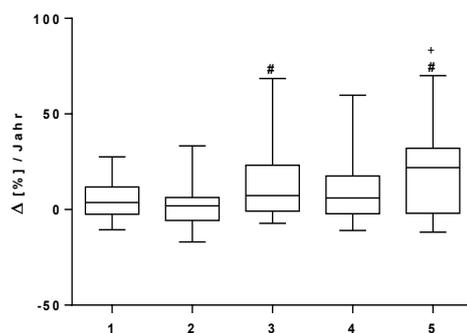
A



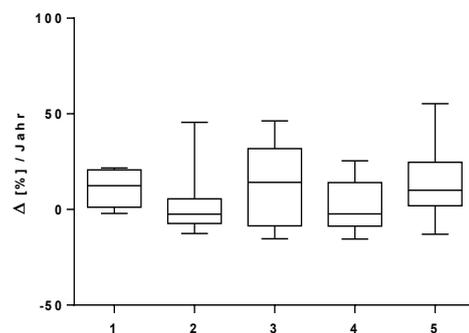
**Abb. 12: relative Veränderung des kardiovaskulären Risikos pro Jahr,**

Δ%/ Jahr für die MeSyBePo-Follow-up Kohorte (MeSy), die 90 gematchten Kontrollen (K) sowie die 60 Teilnehmer der Gewichtsreduktion (GW) (A), Differenzierte Betrachtung innerhalb der fünf Gruppen der Eigenangabe des Gewichtsverlaufs für die MeSyBePo-Follow-up-Kohorte (B) und die Teilnehmer der Gewichtsreduktion (C). # signifikanter Unterschied zur Gruppe 2 Gewichtsabnahme, + signifikanter Unterschied zur Gruppe 1, Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur  $p \leq 0,005$

B



C



In den Abb. 12B und C wurde eine nach Kategorie des Gewichtsverlaufs differenzierte Analyse des relativen kardiovaskulären Risikos abgebildet. Innerhalb der MeSyBePo-Follow-up-Kohorte (Abb. 12 B) zeigte sich für eine Gewichtsabnahme (2) eine deutlich geringere Veränderung des relativen Risikos gegenüber einer Gewichtszunahme (3) ( $p=0,002$ ). Eine deutliche Verschlechterung des relativen Risikos zeigte sich für einen stark schwankenden Verlauf (5) gegenüber einer Gewichtsabnahme (2) ( $p=0,001$ ) sowie einem stabilem Gewicht (1) ( $p=0,003$ ). Bei der Verteilung der Daten insbesondere der Gruppen drei bis fünf, zeigten sich die größeren Streuungen für die Messwerte oberhalb des 75. Perzentil. Innerhalb der Teilnehmer der Gewichtsreduktion in Abb. 12 C konnten keine Unterschiede in den relativen Veränderungen des jährlichen kardiovaskulären Risikos ermittelt werden. Auffällig war hier die große Streuung innerhalb der zweiten Gruppe (Gewichtsabnahme),

oberhalb des 75. Perzentil. Für die dritte Gruppe, mit stabilem Verlauf, streuten die Daten stark innerhalb des 25.-75. Perzentils, im Verhältnis dazu waren die Antennen sehr klein.

In einer zweiten Kategorisierung, einer Aufteilung der Gewichtsveränderungen an einer 3%-Grenze, (Tabelle 19) zeigten sich innerhalb der MeSyBePo-Follow-up-Kohorte Anstiege für Personen, die im Ausmaß von  $\pm 3\%$  um ihr Ausgangsgewicht schwankten oder mehr als 3% zunahmen (Kategorie 2 und 3). Innerhalb der Teilnehmer der Gewichtsreduktion zeigte sich ein deutlicher Anstieg des zehnjährigen kardiovaskulären Risikos für Personen die  $\pm 3\%$  um ihr Ausgangsgewicht schwankten.

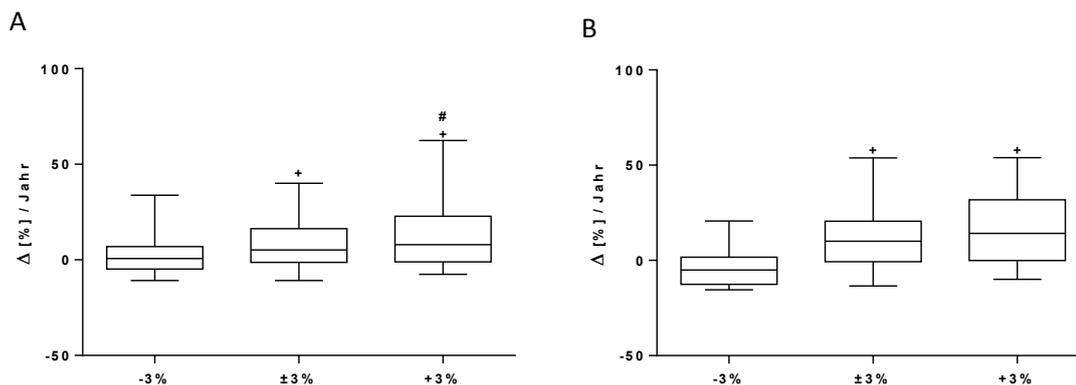
**Tabelle 19: Zehnjähriges kardiovaskuläres Risiko (2)**

Zehnjähriges kardiovaskuläres Risiko zur Eingangsuntersuchung und Follow-up für alle Teilnehmer, Aufteilung nach Gruppen anhand einer 3% Grenze, MW  $\pm$  Stabw des Scores zu Studienbeginn  $Score_b$  und zur Folgeuntersuchung  $Score_f$

	Kat.	$n_b$	Risiko <sub>b</sub>		$n_f$	Risiko <sub>f</sub>		p-Wert
<b>MeSy</b>	1	137	8,3	$\pm$ 6,5	133	8,6	$\pm$ 7,8	n.s.
	2	195	9,7	$\pm$ 8,4	188	12,1	$\pm$ 10,4	$\leq 0,001$
	3	170	7,8	$\pm$ 8,0	161	10,7	$\pm$ 9,8	$\leq 0,001$
<b>Gewichtsreduktion</b>	1	14	10,0	$\pm$ 5,4	15	7,7	$\pm$ 3,6	n.s.
	2	24	7,4	$\pm$ 4,8	24	9,9	$\pm$ 5,8	0,012
	3	19	8,8	$\pm$ 8,2	19	10,8	$\pm$ 7,1	n.s.

Die Unterteilung in drei Gruppen erfolgte anhand einer 3% Grenze: Veränderung zum Ausgangsgewicht von mehr als -3,1% (1), Schwankungen von  $\pm 3,0\%$  um das Ausgangsgewicht (2) oder Veränderung des Gewichts von mehr als 3% vom Ausgangsgewicht (3)

In den Abb. 13A und B wurde die relative Veränderung des kardiovaskulären Risikos pro Jahr in 3 Gruppen, kategorisiert nach einer 3%-Grenze für die Gewichtsveränderungen, abgebildet. Innerhalb der MeSyBePo-Follow-up-Kohorte (Abb. 13 A) zeigte sich ein Anstieg der Veränderung des relativen Risikos ausgehend von einer Veränderung des Gewichts von mehr als -3% des Ausgangsgewichts im Vergleich zu einer  $\pm 3\%$ igen Veränderung um das Ausgangsgewicht ( $p=0,001$ ) sowie zu einer Veränderung größer als 3% ( $p\leq 0,001$ ). Zusätzlich war die Veränderung des relativen Risikos ausgehend von einem Anstieg des Gewichts größer 3% im Vergleich zu einer  $\pm 3\%$ igen Veränderung um das Ausgangsgewicht größer ( $p=0,009$ ).



**Abb. 13: relative Veränderung des kardiovaskulären Risikos pro Jahr**

Relative Veränderung für die MeSyBePo-Follow-up Kohorte (MeSy) (A) sowie die 60 Teilnehmer der Gewichtsreduktion (GW) (B) kategorisiert nach einer 3%-Grenze für die Gewichtsveränderungen. # signifikanter Unterschied zur Gruppe 2 Gewichtsabnahme, + sign. Unterschied zur Gruppe 1, Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur  $p \leq 0,017$

Innerhalb der Teilnehmer der Gewichtsreduktion (Abb. 13 B) zeigte sich ebenso ein Anstieg des relativen Risikos ausgehend von einer Veränderung des Gewichts von mehr als -3% des Ausgangsgewichts im Vergleich zu einer  $\pm 3\%$ igen Veränderung um das Ausgangsgewicht ( $p=0,009$ ) sowie zu einer Veränderung größer als 3% ( $p \leq 0,004$ ).

Bei der Verteilung der Daten zeigten sich oft große Streuungen für die Messwerte oberhalb des 75. Perzentil, gegensätzlich dazu verhielt sich die Streuung unterhalb des 25. Perzentils. In beiden Abbildungen zeichnete sich eine stufenartige Erhöhung der Veränderung des jährlichen relativen kardiovaskulären Risikos von der Gruppe einer finalen Gewichtsabnahme zu derer die an Gewicht zugenommen haben. Ebenso schien die Spannbreite der Gewichtsveränderungen für Personen die um ihr Ausgangsgewicht und darüber schwankten größer.

Trotz der Anstiege in den Scores ist zu erwähnen, dass laut Kategorisierung des Framingham Scores, erst ab einem absoluten Risiko von mehr als 15% von einem moderaten Risiko ausgegangen werden kann, bei mehr als 20% spricht man von einem hohen Risiko. Für alle untersuchten Probanden galt somit noch immer eine Einstufung in eine der beiden niedrigen Risikokategorien innerhalb derer sich jedoch Veränderungen des zehnjährigen kardiovaskulären Risikos zeigten.

## 5.3 Analyse von verschiedenen Fütterungsregimen mit unterschiedlicher Nahrungsverfügbarkeit auf die Langlebigkeit in *C.elegans*

### 5.3.1 Etablierung: Einfluss exogener und endogener Faktoren auf die Lebensspanne

Der Einfluss exo- als auch endogener Effekte auf die Lebensspanne von Nematoden wurde über den *Life Span Assay* ermittelt. Aufgrund sehr individueller Störgrößen bedarf es einer validen Etablierung des Assays unter den für die Fragestellung relevanten Bedingungen. Zu diesen Bedingungen zählen eine effektive langanhaltende Inhibition des Bakterienwachstums, die den Nachweis des lebensverlängernden Effekts bakterieller Verdünnungen auf die Lebensspanne des Wildtyps zulässt, sowie relevante genetische Modelle die unter den gleichen Bedingungen vital sind.

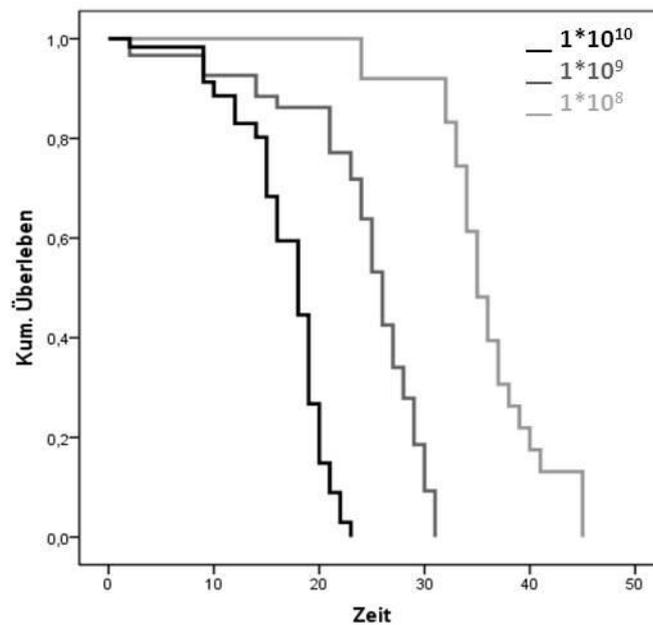
#### *Inhibition des Bakterienwachstums*

Im Vergleich unterschiedlicher Methoden zur dauerhaften Wachstumshemmung der Bakterien erwies sich eine Inkubation mit Ampicillin als die mit Abstand beste Möglichkeit. Die Behandlungen mit UV-Licht oder ein Hitzeschock hemmten nicht nur die Teilung, sondern töten die Bakterien ab. Unter Verwendung des Antibiotikums ist die Hemmung des bakteriellen Wachstums gegeben, das Wurmwachstum und die –entwicklung (lichtmikroskopische Beurteilung) sind im Vergleich zu anderen Methoden jedoch nicht, beeinträchtigt. Die Inkubation der Bakterien mit Ampicillin galt als Standard für alle weiteren aufgeführten *Life Span Assays*

#### *Lebensverlängernde Effekte bakterieller Verdünnungen*

Kontinuierlich wachstumsinhibierte Bakterienkulturen ermöglichen die Etablierung von lebensverlängernden Effekten unter Nahrungsrestriktion. Zu diesen Zweck wurden die mittleren Lebensspannen von Nematoden, denen über ihre gesamte Lebensdauer  $1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml,  $1 \cdot 10^9$  CFU/ml oder  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml als Nahrungsquelle zu Verfügung standen verglichen (Abb. 14).

Wildtyp-Nematoden, denen konstant eine Bakterienkonzentration von  $1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml zur Verfügung stand, lebten im Mittel  $16,8 \pm 0,7$  Tage. Deutlich verlängert wurde die Lebensspanne mit Abnahme der Bakterienkonzentration, dies galt für den Vergleich zur Kontrollgruppe als auch innerhalb der Gruppen ( $p \leq 0,001$ ). Unter einer konstanten Bakterienkonzentration von  $1 \cdot 10^9$  CFU/ml war eine Lebensspanne von  $24,2 \pm 1,0$  Tagen zu beobachten, unter  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml eine Lebensspanne von  $35,9 \pm 1,0$  Tagen (MW $\pm$ Sem).



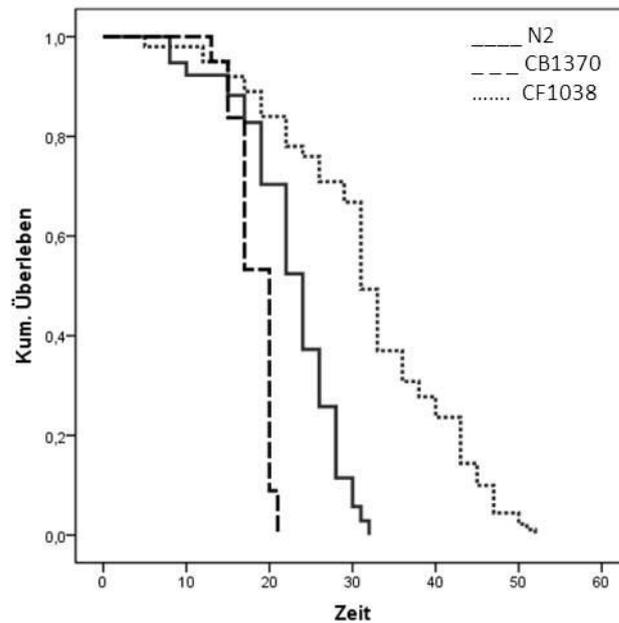
**Abb. 14: Kaplan-Meier Statistik - Effekt bakterieller Verdünnungen auf die Lebensspanne.**

Kumulatives Überleben für drei Gruppen bakterieller Lösungen ( $1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml,  $1 \cdot 10^9$  CFU/ml oder  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) des Wildtypen N2 über die Zeit in Tagen

#### *Validierung des Phänotyps zweier genetischer Modelle*

Neben exogenen Einflussfaktoren nehmen auch endogene, genetische Faktoren Einfluss auf die Lebensspanne. Analog zu den beschriebenen Effekten einer diätetischen Intervention sind genetische Modelle bereits etabliert. Wie in der Einleitung beschrieben weisen Mutationen im IGF-1/Insulin-Rezeptor-Homolog (Stamm CB1370 *daf-2(e1370)III*) und restrikte Nematoden bezogen auf ihre Lebensspanne den gleichen Phänotyp auf. Ebenso bedingt eine Mutation im FOXO-Homolog (Stamm CF1038 *daf-16(mu86)I*) eine kurze Lebensspanne und weist damit den gleichen Phänotyp auf wie überfütterte Tiere des Wildtyps N2 (Abb. 15). Es ist davon auszugehen, dass der Insulinsignalweg stark von der Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden diese beiden Mutanten zur Überprüfung des Einflusses wechselnder Nutrienten-Regimes auf die Lebensspanne gewählt.

Standen beiden Stämmen konstant  $1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml als Nährstoffquelle zu Verfügung, ließ sich für CB1370 *daf-2(e1370)III* ein langlebiger Phänotyp mit einer Lebensspanne von  $32,0 \pm 1,0$  Tagen (in allen Fällen\*  $p \leq 0,001$ ), für CF1038 *daf-16(mu86)I* ein kurzlebiger Phänotyp mit einer Lebensspanne von  $18,3 \pm 0,3$  Tagen ( $p \leq 0,001$ ) bestätigen und für den Wildtypen N2 eine Lebensspanne von  $22,7 \pm 0,7$  Tagen.



**Abb. 15: Kaplan-Meier Statistik verschiedener genetischer Modelle.**

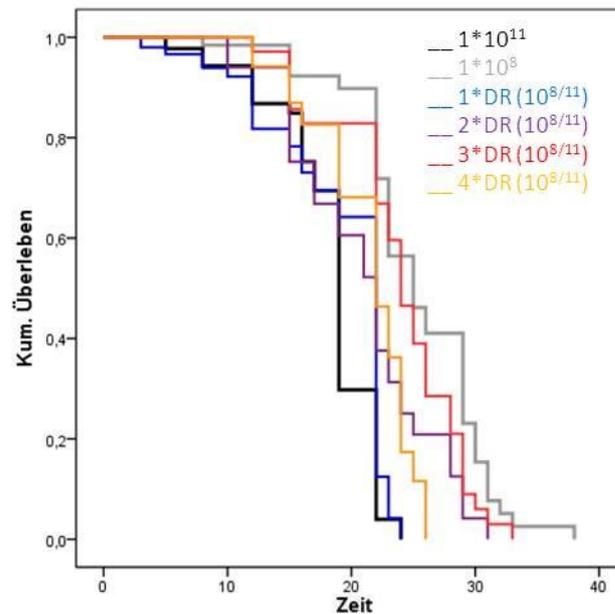
Kumulatives Überleben für drei Gruppen: Wildtyp N2, CB1370 *daf-2(e1370)III* und CF1038 *daf-16(mu86)* über die Zeit in Tagen, Bakterienkonzentration  $1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml

### 5.3.2 Einfluss variierender Restriktionsregime auf die Lebensspanne

Kontinuierliche Restriktion von Nährstoffen als auch eine Überversorgung wirken sich zum einen lebensverlängernd zum anderen lebensverkürzend auf die Lebensspanne im Nematoden aus. Ein Wechsel zwischen beiden Extremen führt in Säugern dauerhaft zu Störungen im Metabolismus. Ob dies auch für das Nematoden-Modell gilt, wurde hier untersucht.

#### *Ergebnisse Wildtyp N2*

In vier voneinander unabhängigen Experimenten durchliefen vier Gruppen zyklische Restriktionsphasen (siehe Methoden). Parallel dazu wurden zwei Kontrollgruppen (kontinuierlich restriktiv  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml und kontinuierlich überfüttert  $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml) mitgeführt. Eine repräsentative Überlebensstatistik wurde in Abb. 16 dargestellt.



**Abb. 16: Kaplan-Meier Statistik variierender Restriktionsregimes (Wildtyp N2).**

Kumulatives Überleben über die Zeit in Tagen der Referenzgruppen kontinuierlich restriktiv ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) und kontinuierlich überfüttert ( $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml). Die intermittierenden Nahrungsrestriktionen / Fütterungen mit 24stündigen Restriktionsphasen auf  $1 \cdot 10^8$  Bakterien erfolgten im Abstand von sieben Tagen. Dieser Wechsel erfolgte ein- bis viermal in den jeweiligen Gruppen: 1xDR (Tag 0), 2xDR (Tag 0, Tag 7), 3xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14) und 4xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21).

**Tabelle 20: Deskriptive Statistik der Life Span Assays N2**

Deskriptive Statistik der Life Span Assays für den Stamm N2, p-Wert Log Rank Test

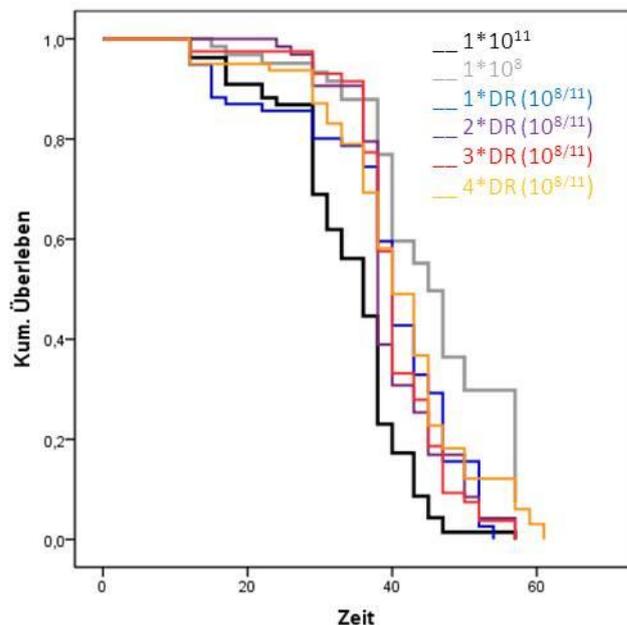
Stamm	MW $\pm$ SEM	n	p-Wert	<i>ad libitum</i>	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
N2 restrikt	27,53 $\pm$ 0,731	4		0,000	0,000	0,013	0,194	0,131
N2 <i>ad libitum</i>	19,15 $\pm$ 0,586	4		x	0,251	0,001	0,000	0,000
1xDR	21,90 $\pm$ 0,535	4			x	0,005	0,000	0,000
2xDR	23,24 $\pm$ 0,594	4				x	0,272	0,359
3xDR	23,69 $\pm$ 0,479	4					x	0,074
4xDR	26,70 $\pm$ 0,572	4						x

In allen Versuchen (Tabelle 20) ließ sich eine deutlich verlängerte Lebensspanne der Nematoden unter einer kontinuierlich restriktive Nahrungszufuhr ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe  $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml nachweisen (Kaplan-Meier, Log Rank:  $p \leq 0,001$ ). Des Weiteren war eine sukzessive Verlängerung der Lebensspanne mit zunehmender Häufigkeit einer 24 stündigen Restriktion (DR) von  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml zu beobachten (einzelne Experimente siehe Anhang A2). Die mittleren Lebensspannen der unterschiedlichen Restriktionsgruppen lagen überwiegend zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen von  $1 \cdot 10^{11}$  und  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml und waren mit wenigen Ausnahmen statistisch voneinander unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). Lediglich in einem von vier Experimenten ließen sich keine Unterschiede zwischen 2xDR, 3xDR und 4xDR nachweisen. Eine einmalige 24-stündige Restriktion entsprach in allen Versuchen nur einer kleinen Änderung der mittleren

Lebensspanne. Bereits eine zweite 24-stündige Restriktion verschob diesen Mittelwert deutlich und eine Verlängerung der Lebensspanne in drei der vier Versuche konnte nachgewiesen werden. So zeigte sich dreimal eine sukzessive Steigerung der Lebensspanne über die einzelnen sich wiederholenden Restriktionsphasen.

*Ergebnisse: CB1370 daf-2(e1370)III (langlebig)*

Analog zum Wildtypen wurden die zyklischen Restriktionsphasen auf den Stamm CB1370 daf-2(e1370)III angewandt. Die Überlebensstatistik wurde repräsentativ für vier Experimente in Abb. 17 für ein Experiment dargestellt.



**Abb. 17: Kaplan-Meier Statistik variierender Restriktionsregimes (CB1370 daf-2(e1370)III)**

Kumulatives Überleben über die Zeit in Tagen der Referenzgruppen kontinuierlich restriktiv ( $1 \cdot 10^8$  CFU) und kontinuierlich überfüttert ( $1 \cdot 10^{11}$  CFU). Die intermittierenden Nahrungsrestriktionen/Fütterungen mit 24stündigen Restriktionsphasen auf  $1 \cdot 10^8$  Bakterien erfolgten im Abstand von sieben Tagen. Dieser Wechsel erfolgte ein- bis viermal in den jeweiligen Gruppen: 1xDR (Tag 0), 2xDR (Tag 0, Tag 7), 3xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14) und 4xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21).

**Tabelle 21: Deskriptive Statistik der Life Span Assays CB1370**

Deskriptive Statistik der Life Span Assays für den Stamm CB1370, p-Wert Log Rank Test

Stamm	MW $\pm$ SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CB1370 restrikt	42,09 $\pm$ 1,198	4		0,000	0,037	0,000	0,001	0,021
CB1370 ad libitum	34,70 $\pm$ 0,976	4		x	0,049	0,213	0,220	0,148
1xDR	37,03 $\pm$ 1,170	4			x	0,280	0,422	0,530
2xDR	35,82 $\pm$ 1,008	4				x	0,384	0,321
3xDR	37,89 $\pm$ 0,894	4					x	0,357
4xDR	38,30 $\pm$ 0,950	4						x

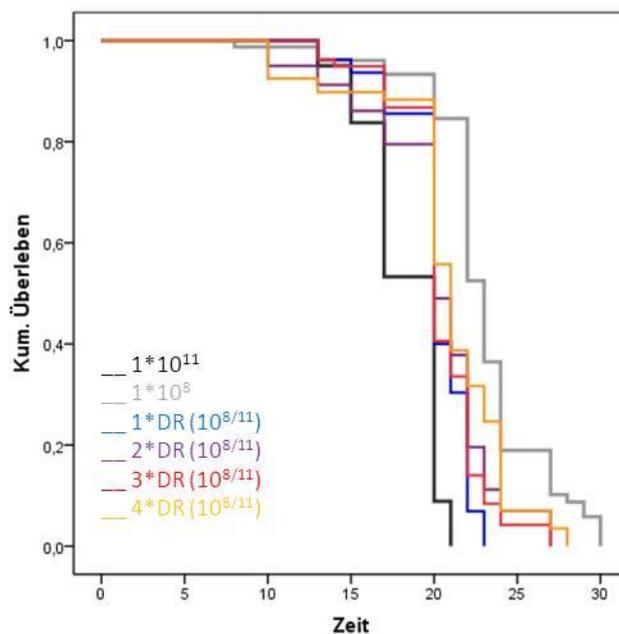
In allen vier Versuchen (Tabelle 21, Anhang A3) lässt sich für CB1370 daf-2(e1370)III eine signifikant verlängerte Lebensspanne der Nematoden unter einer kontinuierlich restriktive

Nahrungszufuhr ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe  $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml) nachweisen ( $p \leq 0,001$ ).

Die Effekte einer wiederholten Restriktion waren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (zum einen lebensverlängert, zum anderen lebensverkürzend) gegeben, die jeweiligen Werte der mittleren Lebensspannen liegen je nach Experiment zwischen den beiden Kontrollgruppen und unterschieden sich mit  $p \leq 0,05$  von den Kontrollen. Innerhalb der Restriktionsgruppen ließen sich jedoch keine eindeutigen Unterschiede der mittleren Lebensspanne nachweisen (nicht dargestellt). So war der Effekt einer mehrfachen Restriktion der Gleiche, wie jener einer einmaligen Restriktion und es zeigte sich kein gestufter Verlauf wie bei den Wildtypen zuvor beobachtet. Eine konstante Restriktion ( $1 \cdot 10^8$ ), über den gesamten Lebenszyklus zeigte auch für CB1370 daf-2(e1370)III den stärksten lebensverlängernden Effekt.

*Ergebnisse: CF1038 daf-16(mu86)I (kurzlebig)*

Analog zum Wildtypen wurden die zyklischen Restriktionsphasen auf den Stamm CF1038 daf-16(mu86)I angewandt. Die Überlebensstatistik wurde repräsentativ für vier Experimente in Abb. 18 für ein Experiment dargestellt.



**Abb. 18: Kaplan-Meier Statistik variierender Restriktionsregimes (CF1038 daf-16(mu86)I)**

Überleben über die Zeit in Tagen der Referenzgruppen kontinuierlich restriktiv ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) und kontinuierlich überfüttert ( $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml). Die intermittierenden Nahrungsrestriktionen / Fütterungen mit 24stündigen Restriktionsphasen auf  $1 \cdot 10^8$  Bakterien erfolgten im Abstand von sieben Tagen. Dieser Wechsel erfolgte ein- bis viermal in den jeweiligen Gruppen: 1xDR (Tag 0), 2xDR (Tag 0, Tag 7), 3xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14) und 4xDR (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21).

**Tabelle 22: Deskriptive Statistik der *Life Span Assays* CB1038**Deskriptive Statistik der *Life Span Assays* für CB1038, p-Wert Log Rank Test

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	<i>ad libitum</i>	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CF1038 restrikt	22,82 ± 0,475	4		0,000	0,000	0,000	0,001	0,002
CF1038 <i>ad libitum</i>	18,20 ± 0,310	4		x	0,040	0,201	0,001	0,036
1xDR	18,77 ± 0,295	4			x	0,227	0,276	0,053
2xDR	19,82 ± 0,374	4				x	0,410	0,075
3xDR	19,78 ± 0,355	4					x	0,115
4xDR	19,24 ± 0,435	4						x

In allen vier Versuchen (Tabelle 22) ließ sich auch für CF1038 eine deutlich verlängerte Lebensspanne der Nematoden unter einer kontinuierlich restriktiven Nahrungszufuhr ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml) ermitteln ( $p \leq 0,001$ ).

Effekte einer wiederholten Restriktion waren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen gegeben, die jeweiligen mittleren Lebensspannen lagen auch hier zwischen den beiden Kontrollgruppen und unterschieden sich mit  $p \leq 0,01$  von den Kontrollen. Innerhalb der Restriktionsgruppen bestanden keine einheitlichen signifikanten Unterschiede (Anhang A4). Der Effekt einer mehrfachen Restriktion schien somit der gleiche zu sein, wie der einer einmaligen Restriktion und es zeigte sich kein gestufter Verlauf wie bei den Wildtypen zuvor. Eine konstante Restriktion, über den gesamten Lebenszyklus zeigte auch hier den stärksten lebensverlängernden Effekt.

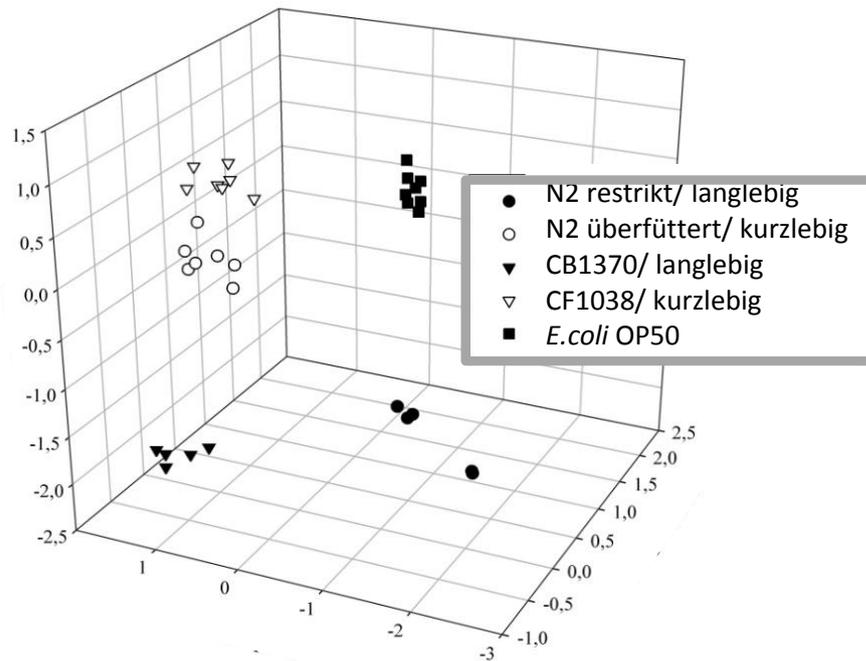
#### 5.4 Analyse von Metabolitenprofilen in unterschiedlichen Langlebigkeits-Modellen

Unter der Fragestellung ob eine Zuordnung von Stoffwechselwegen zum beobachteten Phänotyp möglich ist, erfolgte die Analyse von Proben unterschiedlicher diätetischer Regimes ( $1 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^{10}$ ,  $1 \cdot 10^{11}$  CFU/ml) des Wildtypen N2, sowie die der beiden genetischen Modelle CB1370 daf-2(e1370)III und CF1038 daf-16(mu86)I (je  $1 \cdot 10^{10}$  CFU/ml) mittels GC-MS und UPLC-FT-ICR-MS. Der Ansatz ermöglichte den Vergleich diätetischer und genetischer Modelle, die sich durch ihre zum Wildtypen veränderte Lebensspanne auszeichneten. So wiesen sowohl restrikt gefütterte ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml) Nematoden als auch der Stamm CB1370 daf-2(e1370)III einen langlebigen Phänotyp auf, wohingegen überfütterte Nematoden als auch der Stamm CF1038 daf-16(mu86)I kurzlebig waren. Sollten sich potentielle neue, auf die Lebensspanne Einfluss nehmende Mechanismen herausstellen, sollten diese funktionell mit Hilfe von siRNA-Techniken untersucht werden.

Mittels GC-MS und UPLC-FT-ICR-MS wurden 745 Metaboliten (462 polar, 283 lipophil) detektiert. Mittels *Principle Component Analysis* (PCA) und hierarchischem Clustern (HCL) ließ sich eindeutig die Nahrungsquelle *E.coli* OP50 von den Nematoden trennen (Abb. 19). Des

Weiteren waren die unterschiedlichen genetischen Modelle ebenso anhand ihrer Metabolitenprofile eindeutig via PCA voneinander zu unterscheiden.

Insgesamt veränderten sich 149 Metaboliten parallel zu den Regimes und hatten somit dieselbe Effektrichtung. Von diesen 149 Metaboliten, waren 30 polare und 36 lipophile in langlebigen Modellen erhöht, 37 polare und 46 lipophile in den langlebigen Modellen erniedrigt, von diesen sind in Tabelle 23 die stärksten Hits gelistet. Viele der 149 Metaboliten sind bisher noch unbekannt und konnten keinem Reaktionsweg zugeordnet werden.



**Abb. 19: Metabolitenprofile**

Graphische Darstellung der ersten drei Komponenten der Metabolitenprofile der GC-MS- Ergebnis der PCA von Nematodenproben zur bakteriellen Kontrolle.

**Tabelle 23: Metabolitenkandidaten aus GC-MS und UPLC-FT-ICR-MS**

	erhöht in langlebigen Modellen	erniedrigt in langlebigen Modellen
<b>GC-MS</b>	Insoine-5-Monophosphat* 2-Amino-Adipinsäure Beta-1,6-Anhydroglukose Gulose Adenin* Guanosin*	Harnstoff* Piperidin-Carboxylsäure 4-Amino-Butansäure Asparagin 5-Amino-Pentansäure Tryptophan#
<b>FT-ICR-MS</b>	Guanosin* 2-Aminomuconat-Semialdehyd#	5-Aminoimidazolribonukleotid* Pantothensäure

Metabolite des Purinstoffwechsels sind mit \* markiert, die des d Tryptophan-Stoffwechsels mit #

Die aufgeführte Auswahl der Metabolitenkandidaten erfolgte unter den Kriterien, dass die jeweiligen Metaboliten nicht in mehreren Stoffwechselwegen vorkamen oder deren jeweilige Vorstufe und Folgeprodukt von mehreren Enzymen umgesetzt wurden. Unter Berücksichtigung dieser Punkte wiesen die Analysen Übereinstimmungen für einige Metabolite des Purinstoffwechsels und Tryptophanstoffwechsels aus. Die Möglichkeit diese Metaboliten zu untersuchen sollte über die gezielte Hemmung ihrer Umsetzung, mittels RNA-Interferenz, ihrer Umsetzung erfolgen. Einerseits betraf dies ein Enzym im Abbau von Hypoxanthin und Xanthin, die Xanthin-Dehydrogenase, andererseits mehrere Enzyme des Tryptophanabbaus sowie eines in der Umwandlung zu Serotonin. Die Möglichkeit, mehrere Enzyme in einem Stoffwechselweg inhibieren zu können, bedingte die weiterführenden Untersuchungen des Tryptophan-Stoffwechsels.

#### 5.4.1 Gezielte Hemmung ausgewählter Reaktionswege des Tryptophanstoffwechsels

Der Tryptophan-Stoffwechsel zeigte sich in allen untersuchten Modellen zur Langlebigkeit reproduzierbar verändert. An spezifischen Punkten der betroffenen Reaktionswege wurden Enzyme ausgewählt und mittels RNAi in ihrer Expression herab reguliert. Diese Enzyme kontrollieren jeweils spezifisch die Umwandlung einzelner Metabolite im Tryptophan-Stoffwechsel (Abbildung Tryptophan-Stoffwechsel A5).

(1) Tryptophanabbau: RNA-Interferenz gegen Tryptophan-2,3-Dioxygenase (T-2,3-DO), katalysiert Umwandlung von Tryptophan in N-Formylkynurenin

(2) Tryptophanabbau: RNA-Interferenz gegen Aminomuconat-Semialdehyd-Dehydrogenase (alh-7); katalysiert die Umwandlung von 3-Hydroxyanthranilat zu 2-Amino-3-

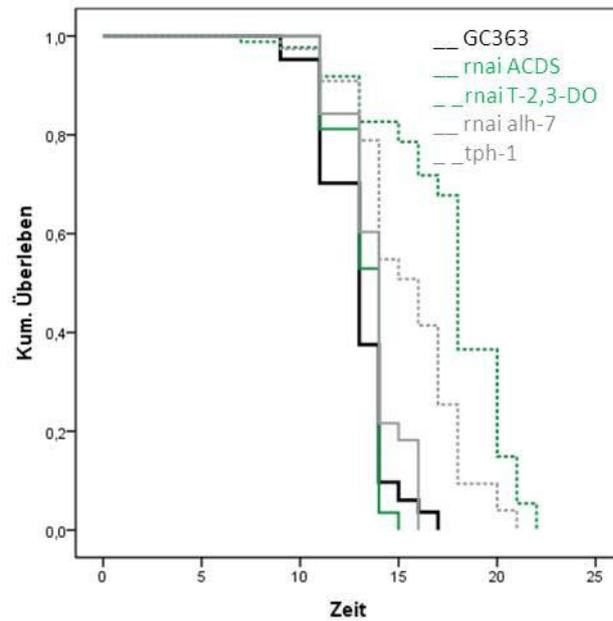
Carboxymuconat-6-Semialdehyd (3) sowie den darauf folgenden Schritt katalysiert durch die Aminomuconat-semialdehyd-Decarboxylase (ACSD),  
(4) Umwandlung von L-Tryptophan zu 5-Hydroxy-L-Tryptophan (5-HTP), katalysiert durch die Tryptophan-Hydroxylase (tph-1).

Zur Validierung der veränderten Regulation dieser Kandidatengene erfolgte eine Kontrolle der Expression auf Genebene sowie des Phänotypen über die Lebensspanne. Im Abstand von sieben Tagen über drei Wochen war für alle drei Gruppen eine Herabregulation der jeweiligen Genexpression nachzuweisen je nach Gruppe und Zeitpunkt wurde die Genexpression um bis zu 15-95% gemindert.

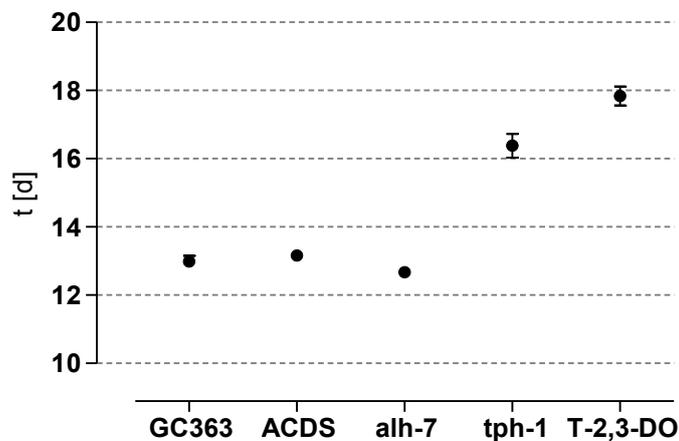
#### *Life Span Assay*

In vier voneinander unabhängigen Experimenten wurden vier Gruppen mit den jeweiligen siRNA exprimierenden Bakterien gefüttert (T-2,3-DO, alh-7, ACSD, tph-1). Parallel dazu wurde eine Kontrollgruppe, die lediglich mit Bakterien mit Leervektor die Nahrungsquelle erhielten (GC363), mitgeführt. Eine repräsentative Überlebensstatistik ist in Abb. 20 dargestellt.

Es ließ sich eine signifikant verlängerte Lebensspanne für jene Gruppen mit siRNA gegen Tryptophan-Dioxygenase ( $17,8 \pm 0,28$  Tage) sowie gegen Tryptophan-Hydroxylase ( $16,4 \pm 0,35$  Tage) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $13,0 \pm 0,16$  Tage) nachweisen ( $p < 0,001$ ) (Abb. 21). Für die weiteren zwei Gruppen, bei denen die siRNA gegen die Carboxymuconat-semialdehyd-Decarboxylase und die Aldehyddehydrogenase gerichtet war, konnte kein Effekt auf die mittlere Lebensspanne gezeigt werden.



**Abb. 20: Überlebensfunktionen (*Life Span-Assay*) NL2099 mit siRNA,** Überlebensfunktionen der Gruppen unter kontinuierlicher Fütterung mit siRNA exprimierenden Bakterien (T-2,3-DO, alh-7, ACSD, tph-1 sowie einer Kontrollgruppe, der Leervektorkontrolle GC363).



**Abb. 21: *Life Span Assay* (T-2,3-DO, alh-7, ACSD, tph-1)**

Die mittleren Lebensspannen und Standardfehler des *Life Span Assays* aller Gruppen (T-2,3-DO Tryptophan-Dioxygenase, alh-7 Aldehyddehydrogenase, ACSD Carboxymuconat-semialdehyd-Decarboxylase, tph-1 Tryptophan-Hydroxylase)

Die deutliche Verlängerung der Lebensspanne, die bei der Hemmung beider Enzyme (und Tryptophan-Hydroxylase) zu beobachten war, bestätigte einen Zusammenhang des Tryptophanstoffwechsels mit der Lebensdauer der Nematoden. Beide Enzyme katalysieren die direkte Umwandlung von Tryptophan, dessen Konzentrationsveränderung sich direkt oder indirekt auf Regelkreise der Lebensspanne auswirkte.

## 6. Diskussion

### 6.1. Nachbeobachtung der MesyBePo Studie

Ziel der Querschnittsstudie Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam (MeSyBePo) war es Zusammenhänge von Biomarkern mit Charakteristika des metabolischen Syndroms sowie Adipositas-assoziierten Erkrankungen zu evaluieren. Besonderes Interesse galt dem Zusammenhang zwischen Adipositas, T2DM und kardiovaskulären Risikofaktoren [106]. Insgesamt wurden 2062 Teilnehmer metabolisch charakterisiert und Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und T2DM ermittelt. Um die prospektive Entwicklung von kardiovaskulären Risikofaktoren untersuchen zu können, wurden alle Teilnehmer nachverfolgt, die zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung vor mehr als drei Jahren in die Studie eingeschlossen wurden. Von diesen 1600 Personen nahmen 584 Individuen erneut teil und bildeten die MeSyBePo Follow-up Studie, die als Bestandteil dieser Arbeit ausgewertet wurde.

Die untersuchten 584 Probanden nahmen innerhalb von durchschnittlich 5,3 Jahren an Gewicht zu und die relative Fettmasse stieg an. In Anbetracht des Anstieges im Taillenumfang und einer Abnahme im Hüftumfang, wurde dieses Fett anscheinend überwiegend abdominell eingelagert. In einer anderen prospektiven Studie wurden ebenso Gewichtszunahmen, von 3,9 kg beziehungsweise 5,8% innerhalb von 8 Jahren nachgewiesen [124, 125]. Die Varianzen im Vergleich zur vorliegenden Studie beruhen auf Unterschieden in der Zusammensetzung und Größe der untersuchten Studienpopulation [124, 125]. Die Gewichtszunahme über die Zeit begründet sich wahrscheinlich im allgemeinen Trend, dass die tägliche körperliche Aktivität, die notwendig wäre um die aufgenommene überschüssige Energie adäquat zu verbrennen, nicht mehr ausgeübt wurde [126, 127]. Eine adipogene Umgebung und der sitzende Lebensstil beeinflussen den täglichen Energieumsatz und begünstigten eine Gewichtszunahme [126, 127]. Infolge des Anstiegs des Körpergewichts verschlechterten sich auch weitere anthropometrische und metabolische Parameter, die Mechanismen dahinter sind teilweise bekannt und dokumentiert [1]. Innerhalb der 584 Probanden verschlechterten sich so die Nüchternblutglukosespiegel, die basalen Insulinspiegel und der HOMA als Maß für die Insulinresistenz. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer Gewichtszunahme und dem Diabetes Risiko wurde bereits von Schienkiewitz *et al.* beschrieben [124]. Eine der gesundheitlichen Konsequenzen von Übergewicht ist *Diabetes mellitus* Typ 2 [1]. Für 15% der 584 Teilnehmer wurde schon zu Studienbeginn ein T2DM entsprechen der WHO

diagnostiziert, wobei dieser Anteil nach den neueren Kriterien einteilung der Diabetesdiagnostik sogar höher wäre. In den Analysen wurden die diagnostischen Kriterien verwendet, die zu Beginn der Studie international maßgeblich waren [10]. Die altersadjustierte Diabetesprävalenz liegt in Deutschland bei ca. 7% [128]. Der Anteil der Diabetiker der MeSyBePo-Kohorte von über 2000 Teilnehmern betrug 7,3%. Entsprechend schien die MeSyBePo-Kohorte den Durchschnittswert, aufgrund ihrer Größe und Zusammensetzung, vergleichbar abzubilden, wobei es sich bei der MeSyBePo Studie nicht um eine repräsentative Studie handelt. Die MeSyBePo Follow-up Studie zeigte eine doppelt so hohe Diabetesprävalenz im Vergleich zur initialen Gesamtgruppe. Hierfür sind vermutlich mehrere Gründe verantwortlich. Während die MeSyBePo Kohorte ein durchschnittliches Alter von 52,0 Jahren aufwies, belief sich das mittlere Alter der Follow-up Kohorte auf 55,6 Jahre. Dies unterstützt die Vermutung, dass eher ältere und potentiell schon kränkere Probanden an der Nachbeobachtung teilgenommen haben. Bei einem Teil dieser Probanden wurden im Rahmen der MeSyBePo Studie erstmalig ein Diabetes diagnostiziert, auch dies dürfte zu einer erhöhten Bereitschaft beigetragen haben, sich für die Nachbeobachtung wieder vorzustellen. Die betrachtete Kohorte aus 584 Teilnehmern bestand demnach anteilig aus mehr älteren Personen mit einem höheren Anteil von Patienten mit prävalentem Diabetes bei Studieneinschluss.

Die MeSyBePo-Studie wurde als Querschnittsstudie geplant um individuelle Anlagen und Biomarker zu erkennen, die mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder T2DM assoziiert sind. Einschränkungen wie Verzerrungen von Effekten treten u.a. schon durch den Rekrutierungsprozess auf. Für MeSyBePo wurden Anzeigen geschaltet, die Teilnahme war freiwillig und war nicht mit einer Aufwandsentschädigung verbunden. Aufgrund dieser Rekrutierungsstrategie konnte die Studie nicht bevölkerungsrepräsentativ sein. Unter diesen genannten Gegebenheiten war davon auszugehen, dass sich die Studienpopulation überwiegend aus Personen mit einem erhöhten Gesundheitsbewusstsein zusammensetzt. Darunter befanden sich insbesondere auch vermehrt Personen, denen bekannt war, dass sie ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und T2DM besitzen. Ebenso könnte sich ein Teil dieser Personen durch die Teilnahme eine intensivere Versorgung bezüglich ihrer vorliegenden Risiken oder Erkrankungen, wie zum Beispiel *Diabetes mellitus* Typ-2, erhofft haben. Letzteres wäre eine mögliche Erklärung für die Häufung der diagnostizierten Diabetiker in der Kohorte bis zur Nachuntersuchung. Weitere Verzerrungen, die sich im Rekrutierungsprozess ergeben, betreffen u.a. das Alter oder auch das Geschlecht. Aufgrund der freiwilligen Teilnahme, kann es zur Häufung einiger Altersgruppen kommen, gleiches

betrifft die Geschlechterverteilung. Für die Studie zeigte sich grundsätzlich eine weitgefächerte Altersverteilung. Da die Untersuchungen einen kompletten Tag in Anspruch nahmen, war der zeitliche Aufwand sehr hoch. Berufstätigen Personen war es entsprechend erschwert, trotz Interesse einen Termin zu vereinbaren. Personen im Ruhestand oder im Rahmen einer universitären Ausbildung sind flexibler in ihrer Zeiteinteilung. Erstere sind oft aufgrund von Vorerkrankungen interessiert und motiviert, das Interesse junger Menschen an solchen Studien ist allgemein weniger ausgeprägt. In Bezug auf das Geschlecht zeigte sich, dass überwiegend Frauen Interesse an der Untersuchung zeigten. Der Anteil weiblicher Teilnehmer überwog so stark, dass eine Auswertung getrennt nach Geschlechtern nicht sinnvoll war.

Insgesamt wurden 2062 Probanden in zwei Studienzentren für MeSyBePo rekrutiert. 2012 wurde die Rekrutierungsphase abgeschlossen. Insgesamt wurde damit über einen relativ langen Zeitraum rekrutiert, was zusätzliche Probleme für ein Studienkollektiv darstellen kann, z.B. durch veränderte Therapieansätze bei prävalenter Erkrankung. Allerdings wurden diese Daten erfasst und Analysen wurden nach Möglichkeit dafür korrigiert. Die Limitation einer Querschnittstudie liegt vor allem darin, dass Umweltfaktoren allein durch das Vorliegen der Erkrankung schon verändert werden können. So kann beispielsweise ein bestehender *Diabetes mellitus* Typ 2 das Essverhalten eines Patienten verändern.

Im Rahmen der angeschlossenen Nachuntersuchung an MeSyBePo, als MeSyBePo Follow-up Studie veränderte sich entsprechend das Studiendesign und die Ziele wurden ergänzt. Die longitudinalen Daten erlaubten es, den zeitlichen Verlauf metabolischer Erkrankungen zu untersuchen. Im Vergleich zu anderen großangelegten multizentrischen Studien, wie der *Nurses' Health Study*, mit über 239.000 Teilnehmerinnen, oder auch der EPIC Studie, mit 519.000 Teilnehmern [129, 130], ist die MeSyBePo Follow-up Studie eine verhältnismäßig kleine Studie. Durch diese Bedingung war es wiederum möglich, umfassende metabolische Daten zu sammeln. So wurden von allen Teilnehmern oGTT-Daten erfasst. Groß angelegte prospektive Studien können solche genaue Charakterisierung u.a. allein aufgrund des finanziellen und zeitlichen Aufwandes und der großen Zahl an Teilnehmern häufig nicht in vergleichbarer Tiefe abdecken. Die Nachuntersuchung selbst wurde in einem sehr engen zeitlichen Rahmen von einem Jahr durchgeführt. Die lange Rekrutierungsphase und die kurze Phase für die Wiedereinbestellung der Teilnehmer bedingten eine hohe Varianz für die Zeitspanne der Nachverfolgung. Für einige Probanden bedeutete dies eine große Zeitspanne bis zur zweiten Untersuchung im Rahmen der Studie. Für eine Aussage zur Pathogenese einer metabolischen Erkrankung wie Diabetes machte es einen deutlichen Unterschied, ob die

Untersuchung nach drei, fünf oder neun Jahren stattfand. Innerhalb der hier betrachteten Studiengruppe wurde bei 31 Personen ein neu manifestierter, inzidenter *Diabetes mellitus* Typ-2 diagnostiziert. Dieser Wert entspricht einer Inzidenz von 6,7% innerhalb eines fünf Jahres Follow-up und damit 1,3% pro Jahr. Je nach Studie schwanken die Angaben, ebenso variieren die Angaben oft stark in ihren Einheiten. Laut KORA Studie betrug die Inzidenz 2009 15,5 pro 1000 Personenjahre, Innerhalb der MONICA Studie 5,8 pro 1000 Personenjahre [131]. In einer Studie von Narayan *et al.* wurde die Inzidenz für eine amerikanische Kohorte berechnet und belief sich auf 0,53% pro Jahr [132]. Insgesamt liegt die von uns beobachtete Inzidenz in etwa im Bereich der Kora- und Monika Studie, die diesbezüglich ebenfalls auf deutschen Daten, wenn auch aus anderen Regionen, beruhen. Trotz der bestehenden Kritikpunkte an der MeSyBePo Follow-up Studie ließ sich demnach eine Diabetesinzidenz beobachten, die in etwa den Erwartungen für eine deutsche Population entsprechen.

Ein wesentlicher Punkt, dem jede Folgeuntersuchung unterliegt, ist die erneute Verfügbarkeit und das bestehende Interesse an der Studie, ebenso können gesundheitlich Probleme älterer Probanden die Wiedereinbestellung verhindern, ein Wohnortswechsel betrifft oft jüngere Probanden. Die bisher genannten Faktoren sind schwer zu kontrollieren und stellen insbesondere bei der aktuellen MesyBepo Follow-up Studie einen Kritikpunkt des Studiendesigns dar. Kürzere Abstände in der Wiedereinbestellung können einem kleinen Anteil dieses Schwundes entgegen wirken, jedoch ist der Effekt auf die einzelnen Parameter kleiner, da deren Veränderung über kurze Zeiträume geringer ausfällt. Die in diesem Datensatz aufgetretenen variierenden Zeitspannen bis zur Nachuntersuchung, wurden im Rahmen statistischer Modelle entsprechend mit berücksichtigt. Gleiches galt für das Alter, das Geschlecht und den BMI, da davon auszugehen war, dass sie Einfluss auf den Endpunkt haben können. Die große Varianz in der Zeit bis zur Nachuntersuchung hätte durch langfristig geplante Wiedereinbestellung der Teilnehmer vermindert werden können. Im Falle einer Fortsetzung des Follow-up könnte dies gegebenenfalls aktiv verbessert werden.

Die genannten Limitationen müssen bei der Betrachtung der Ergebnisse beachtet werden. Die Limitationen beschränken die Aussage auf das hier untersuchte Kollektiv, eine Übertragung auf die „allgemeine“ Bevölkerung ist nicht möglich.

### FGF21

In dieser Studie wurde gezeigt, dass FGF21 die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms als auch eines T2DM sowie eine Verschlechterung der Blutzuckerhomöostase vorhersagen konnte. Obwohl diese Daten lediglich eine statistische Assoziation darstellten, unterstützten sie aufgrund ihres prospektiven Charakters die Hypothese, dass FGF21 eine Rolle bei der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms sowie in der Pathophysiologie des T2DM spielte. Zur Eingangsuntersuchung beliefen sich die Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Personen mit späterem MetS auf nur wenige Parameter: FGF21, BMI, WHR und Hb1Ac. Da in die Analyse bewusst nur Personen ohne weitere diagnostizierte metabolische Erkrankungen aufgenommen wurden, war davon auszugehen, dass sich beide Gruppen ähneln müssten. Ob die genannten Unterschiede allein auf den Messwerten der verglichenen Parametern oder anderer Faktoren beruhen, die hier nicht bestimmt wurden, kann nicht geklärt werden. Studien, wie jene von An *et al.* beschrieben auch diese und weitere Unterschiede, für übergewichtige Personen. Für diese Übergewichtigen zeigten sich Unterschiede in den FGF21-Spiegeln sowie für den BMI, Parameter des Glukosestoffwechsels und des Lipidstoffwechsels im Vergleich zu Kontrollen [133, 134]. Es wäre möglich, dass das Körpergewicht oder der Anteil des Körperfetts Einfluss auf den Anstieg FGF21-Spiegel nehmen kann oder FGF21 in Folge von Regelkreisen vermehrt exprimiert wird, die erst durch ein erhöhte Körpergewicht aktiviert sind. Für die hier vorliegenden Analysen konnte dies jedoch ausgeschlossen werden, da FGF21 die untersuchten Endpunkte unabhängig von den genannten Faktoren beeinflusste. Nicht nur im Fall von Übergewicht wurden in Querschnittsstudien erhöhte FGF21-Spiegel beschrieben, auch für prädiabetische und diabetische (T2DM) Personen sind hohe Spiegel beschrieben [123, 134]. Es schien als stiegen die FGF21-Spiegel parallel mit zunehmendem Gewicht oder Verschlechterungen der Glukosehomöostase an und dies könnte entsprechend auch für Personen zutreffen die ein Metabolisches Syndrom entwickeln. Korrelationsanalysen wiesen Beziehungen zwischen FGF21 dem BMI, WHR und Parametern des Glukosestoffwechsels aus. Diese traten auch in der beschriebenen Querschnittsstudie von Zang *et al.* auf [133]. In den weiterführenden Analysen von Chen *et al.* und Zang *et al.* wiesen diese Wissenschaftler Assoziationen zwischen den FGF21-Spiegeln und dem Risiko für das MetS, zu Insulin als auch zum HOMA nach [123, 133]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein FGF21 als unabhängiger Faktor für das Risiko eines Metabolischen Syndroms. Theoretisch könnten natürlich auch andere Parameter, die hier nicht gemessen wurden, mit FGF21 korreliert sein und den Zusammenhang zwischen FGF21 und einem inzidentem Metabolischen Syndrom erklären [135]. Nicht alle Hypothesen können im Rahmen von Humanstudien beantwortet werden,

eine Übertragung einzelner Fragestellungen in Modellsysteme ist für das Verständnis systemischer Effekte häufig hilfreich [136]. So konnte Mai *et al.* *in vivo* nachweisen, dass freie Fettsäuren die zirkulierenden FGF21-Spiegel erhöhen können [137]. *In vitro* Daten bestätigten diesen Effekt und zeigten, dass dieser PPAR $\alpha$ -abhängig ist [137]. In einer weiteren Arbeit von Mai *et al.* konnte die Relevanz des Effekts der Lipidinfusion auf die FGF21-Spiegel auch unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden, während der Effekt von Insulin eher von geringerer Relevanz zu sein schien [138]. FGF21 scheint somit Anteil an den genannten pathophysiologischen Mechanismen zu nehmen, oder wird zumindest messbar durch diese beeinflusst. Tierexperimentelle Daten zeigten eine Verbesserung der Blutglukose durch eine FGF21-Administration bei genetisch adipösen *ob/ob* und *db/db* Mäusen [24, 139, 140]. Bemerkenswerterweise sind diese Modelle ohnehin schon durch erhöhte FGF21-Spiegel charakterisiert [133, 140]. Um diese Effekte zu deuten sollte bedacht werden, dass der Spiegel des zirkulierenden FGF21 nicht die Aktivität des FGF21-Systems adäquat widerspiegeln muss, die Wirkung also von anderen Faktoren abhängig ist. Dies und die genetische Prädisposition können Gründe sein, warum für FGF21 in Tiermodellen eine Verbesserung des Blutzuckers beobachtet wurde. Systemisch könnten ganz andere Effekte auftreten. Bei Patienten, die aufgrund der langsamen Veränderung der Umweltfaktoren an Gewicht zunehmen und deren Blutglukosehomöostase gestört ist, könnte ähnlich einer Insulinresistenz, eine FGF21-Resistenz vorliegen [141]. FGF21 könnte auch als Antwort vorhergehender pathologischer Mechanismen in den Probanden erhöht gewesen sein, die hier nicht erfasst wurden. So ist FGF21 auch bei Patienten mit einer Fettleber erhöht [142], welche in der Folge mit dem Metabolischen Syndrom als auch T2DM assoziiert war. Zuletzt könnten tierexperimentelle Daten im Menschen nicht reproduzierbar sein.

Die Etablierung neuer Biomarker ist grundsätzlich von großem Interesse. So könnte eine Therapie frühzeitig begonnen werden oder möglicherweise präventiv eine Manifestation verhindern. FGF21 könnte ein potentieller neuer Biomarker sein um Personen mit einem erhöhten Risiko für T2DM zu identifizieren. Über die logistische Regression erwies sich FGF21 als unabhängiger Faktor zur Vorhersage des T2DM Risikos. Inwieweit dies für den klinischen Alltag von Relevanz sein kann, ist damit allerdings noch nicht gezeigt. Daher wurden in dieser Arbeit zusätzlich Receiver-Operating Curves (ROCs) berechnet, um den klinischen Wert von FGF21 besser abschätzen zu können. Unter Berücksichtigung etablierter Risikofaktoren zeigte FGF21 keinen zusätzlichen Informationsgewinn, so dass FGF21 derzeit keine Bedeutung für die klinische Prädiktion eines Diabetes beim einzelnen Patienten hat. Um der Alpha-Fehler-Akkumulierung gerecht zu werden, mussten die Unterschiede in den Ausgangsparametern der Gruppen strenger betrachtet werden. Die geringe Anzahl an Personen in der

interessierenden Gruppe beschränkt auch die Aussagekraft der Daten. Eine Fortsetzung des Follow-up kann dazu dienen die Ergebnisse in einer größeren Kohorte zu validieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FGF21 ein unabhängiger Prädiktor des Metabolischen Syndroms, T2DM und eines eingeschränkten Glukosestoffwechsels war. Im Zusammenhang zu anderen bestehenden Ergebnissen, gehen wir davon aus, dass erhöhte FGF21-Spiegel zum einen durch die spezifischen metabolischen Veränderungen wie erhöhte Spiegel freier Fettsäuren wie auch im Kontext einer FGF21-Resistenz entstehen könnten und so einem Metabolischen Syndrom sowie einem T2DM vorhergehen können.

### *Vaspin*

Neben FGF21 wurde auch für Vaspin die Prädiktion von Störungen der Glukosehomöostase untersucht. Aus den Analysen ergab sich Vaspin als unabhängiger Prädiktor für die Inzidenz eines T2DM, nicht aber für eine eingeschränkte Glukosetoleranz.

Tierexperimentelle Daten implizierten für Vaspin eine Insulin sensibilisierende Funktion, die exakte Rolle von Vaspin bei der humanen Insulinresistenz ist jedoch unklar [27, 37, 38, 143]. In einer Querschnittsstudie mit schlanken und übergewichtigen Jugendlichen fanden sich die höchsten Vaspin-Spiegeln in den Probanden mit ausgeprägter Insulinresistenz [144]. Für übergewichtige Frauen mit polyzystischem Ovarialsyndrom zeigten sich Assoziationen zwischen Vaspin mit dem BMI und WHR. Die Expression von Vaspin war durch die Gabe von Metformin und durch die abnehmende Insulinresistenz vermindert [145]. In einer Studie von Youn *et al.* ließen sich keine Unterschiede in den zirkulierenden Vaspin-Spiegeln zwischen Kontrollen und Typ 2 Diabetikern feststellen, ebenso zeigten sich keine Assoziationen in den Korrelationsanalysen [38]. In einer zweijährigen Follow-up Studie zeigte Jian *et al.* bei Diabetikern sogar niedrigere Vaspin-Spiegel im Vergleich zu gesunden Probanden [146].

In der hier vorliegenden Arbeit unterschieden sich die Personen mit späterem T2DM und die Kontrollen bei der Eingangsuntersuchung durch höhere Vaspin-Spiegel und für weitere Parameter bereits sehr stark. Andere Autoren zeigten für Personen mit diagnostizierten MetS deutlich erhöhte Vaspin-Spiegel und wiesen Assoziationen zwischen erhöhten Vaspin-spiegeln und Adipositas sowie einer eingeschränkten Insulinsensitivität nach [38, 147]. In Korrelationsanalysen variieren die Korrelationen stark abhängig vom Vorliegen eines T2DM, so fanden sich für Gesunde kaum messbare Korrelationen mit Vaspin [146]. Die Ergebnisse früherer und aktueller Studien vermuteten daher für Vaspin eine Rolle bei der Insulinresistenz und im Fettstoffwechsel [147, 148].

In der logistischen Regression erwies sich Vaspin als unabhängiger Risikofaktor für die Diabetesinzidenz. Die vorliegenden Daten untermauern die Verbindung, die zwischen den Serum-Vaspin-Spiegeln, Insulin-Resistenz und T2DM bisher vermutet wurde [37]. Dem widersprechen Daten aus einer zweijährigen Studie, in der die Diabetiker deutlich geringere Vaspin-Spiegel als die Kontrollen aufwiesen [146]. Die Autoren benannten als möglichen Einflussfaktor die fehlende Berücksichtigung der Behandlungsdauer des T2DM bei der Rekrutierung der Typ 2 Diabetiker. Eine lange Gabe von Diabetes-Medikamenten könnte die Vaspin-Spiegel langfristig beeinflusst haben und damit eine Abnahme von Vaspin hervorrufen [30, 146]. Oft sind auch große Variationen in den Vaspin-Spiegeln durch beide Geschlechter gegeben [38, 149]. Ein sexueller Dimorphismus ist bekannt und wurde in vielen, aber nicht allen Fällen berücksichtigt [147] oder es erfolgte eine Aufteilung nach Personen mit hohen und niedrigen Vaspin-Spiegeln [146]. In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend für das Geschlecht adjustiert.

Der BMI sowie die *Follow-up*-Zeit schienen in der hier vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Ausbildung eines T2DM einen starken Einfluss zu haben. Nach der Adjustierung für mehrere Faktoren, schienen das Alter und leichte körperliche Aktivität ebenso die Ausbildung eines T2DM zu beeinflussen. Vaspin war in unserer Studie kein unabhängiger Prädiktor einer gestörten Glukosetoleranz. Frühere Autoren haben spekuliert, dass Vaspin eine kompensatorische Rolle auf molekularer Ebene in der Pathogenese der Insulinresistenz und Adipositas assoziierter Erkrankungen haben könnte [150]. Aufgrund unserer vorliegenden Daten, hat das Protein möglicherweise eine funktionelle Bedeutung bei der Entstehung des *Diabetes mellitus* Typ 2. Die Tatsache, dass wir keinen Effekt auf die Entstehung einer gestörten Glukosetoleranz sehen kann unterschiedliche Ursachen haben. Methodisch könnte unsere Kohorte zu klein sein, um einen vorhandenen Effekt zu sehen. Umgekehrt stellt die gestörte Glukosetoleranz nur einen Phänotyp eines gestörten Glukosemetabolismus dar. Nicht erfasst wurde von uns beispielsweise die Insulinclearance, so dass wir abschließend die funktionelle Zuordnung von Vaspin zu Mechanismen der Glukoseregulation anhand unserer Daten nicht abschätzen können.

Eine Hypothese wurde von Blüher *et al.*, formuliert. Diese geht davon aus, dass Vaspin in seiner Eigenschaft als Serpin, in der Lage ist Proteasen zu hemmen, die den Abbau von Molekülen mit Glukose-senkendem Effekt fördern (Insulin-Clearance), sowie anti-orexigene Moleküle. Entsprechend würde Vaspin durch eine verstärkte Insulin-Clearance zu einem Anstieg der Blutglukose beitragen können [27].

Bezüglich der Interpretation der Daten soll auch auf die Limitationen der Studie eingegangen werden. Zunächst waren die Kontrollen dieser Analyse keine gesunden Kontrollen. Die

Personen waren im Durchschnitt zum Einschlusszeitpunkt bereits übergewichtig und wiesen mit dem Übergewicht assoziierte metabolische Veränderungen auf. Die geringe Anzahl an Personen in der Gruppe schmälert die Aussagekraft. Um der Alpha-Fehler-Akkumulierung gerecht zu werden, mussten die Unterschiede in den Ausgangsparametern der Gruppen strenger betrachtet werden und für multiples Testen korrigiert werden. Eine Validierung der Ergebnisse in einer größeren Kohorte ist unbedingt wünschenswert.

Zusammengefasst, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Vaspin die Entstehung des T2DM vorhersagt. Eine Hypothese über die Mechanismen dieses statistischen Zusammenhanges konnte aus unseren Daten nicht abgeleitet werden.

## 6.2 Langzeit-Nachbeobachtung nach standardisierter Intervention

### *Intervention zur Gewichtsreduktion*

Die MeSyBePo-Studie bot im Verlauf die Möglichkeit eine Sub-Studie, die hier beschriebene Interventionsstudie zur Gewichtsreduktion, einzubetten. Dies war eine wesentliche Fragestellung der Doktorarbeit, da mit dieser Gruppe zumindest explorativ untersucht werden konnte, ob eine intendierte Gewichtsabnahme langfristig positive oder negative Folgen für den Stoffwechsel der Probanden hat. Gerade vor dem Hintergrund der mittlerweile erschienen Look AHEAD-Studie [151] ist diese Frage von erheblicher Bedeutung. Innerhalb der Follow-up Studie mit 584 Individuen waren 60 Personen, die an einem begleiteten einjährigen Gewichtsreduktionkurs teilgenommen hatten. Die Probanden nahmen in der sechs monatigen Phase intensiver Betreuung im Mittel -6,5% ihres Körpergewichts ab. Dieses Gewicht konnten sie die darauffolgenden sechs Monate erfolgreich halten. Wang *et al.* zeigte nach 20-wöchiger Intervention, eine erfolgreiche Gewichtsreduktion von bis zu -15% in einer Gruppe von 34 Frauen [152]. Nicklas *et al.* wiesen für einen vergleichbaren Zeitraum Gewichtsverluste von 4-6 kg [54, 153] nach. Wesentliche Faktoren für die Gewichtsverluste und deren Erhalt sind die reduzierte Netto-Kalorienaufnahme [54, 154] und die zusätzliche Bewegung [155]. Je nachdem wie gut die betroffenen Personen in der Lage waren ihre Lebensgewohnheiten umzustellen und diese beizubehalten, bestimmten diese Veränderung das Maß an Gewichtsverlust und langfristigem Gewichtserhalt [54]. Insbesondere der Gewichtserhalt, scheint stark mit einem fortlaufenden Kontakt zur Gruppe und dem Studienpersonal zusammenzuhängen. Mit dem Ende der intensiven Phase der Intervention und der damit verbundenen engen Betreuung der Teilnehmer stagnierte der Gewichtsverlust für die untersuchten 60 Teilnehmer und ging in eine Phase der Wiedezunahme über. Zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung hatten die Teilnehmer im Durchschnitt mindestens ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht. Auch Wang *et al.* berichteten von einer deutlichen Wiedezunahme im ersten Jahr [152]. Nach der zwanzigwöchigen Intervention wurden deren Probandinnen nach sechs und zwölf Monaten kontaktiert um das Gewicht zu erfragen, 28 der 34 Frauen hatten bis zum zwölften Monat bereits wieder ca. 5% zugenommen. Alle Verhaltensänderungen als Teil der Intervention wurden anscheinend auch mit dem Ende der Intervention wieder aufgegeben, ohne dauerhafte Akzeptanz oder Umsetzbarkeit. Bei gleichbleibendem Verlauf, hätten die Teilnehmerinnen nach zwei Jahren ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht [152]. Gosselin *et al.* zeigten wiederum, dass ein langfristiger Gewichtserhalt möglich wäre, wenn eine zusätzliche extrinsisch Motivation erfolgt [156]. Im Rahmen eines kostenpflichtigen Programms, mit

wöchentlichen Treffen und fortwährend verfügbaren Ansprechpartnern wurde der monatliche Teilnahmebetrag im Follow-up bei Gewichtserhalt erlassen [156]. Dies ist ein nicht zu vernachlässigender Faktor für die Adhärenz und den Erfolg bei allen kommerziellen Programmen [40, 53, 157]. Insgesamt ist die Bereitschaft an diesen Programmen teilzunehmen sehr groß, und verbunden mit neuen Medien scheint hier ein großes Potential für eine hohe Adhärenz und der andauernden Veränderungen des Lebensstils zu liegen [53, 158, 159]. Verlaufsdaten müssen dies jedoch noch bestätigen.

Die meisten Studien zur Gewichtsreduktion mit Follow-up berichteten von einer Wiedezunahme des Körpergewichts [55, 56, 160]. Oft betrifft diese Zunahme Teilnehmer ab dem zweiten Jahr nach Intervention und letztendlich sind es bis zu 95% aller Teilnehmer, die nach spätestens 5 Jahren wieder ihr Ausgangsgewicht vorweisen, wenn nicht sogar übertreffen [55, 56, 160-162]. Die vorliegenden Daten bestätigen eben diesen Verlauf. Obwohl die Programme leitlinienkonform durchgeführt wurden, blieben die Langzeiterfolge aus. Markant für die Gewichtsentwicklung der untersuchten Kohorte war der bereits erwähnte Abbruch der intensiven Betreuung nach dem sechsten Monat. Es folgte ein Wechsel im Programm, das nur noch regelmäßige Treffen mit allen Teilnehmern für weitere sechs Monate vorsah. Zu diesem Zeitpunkt setzte eine Stagnation der Gewichtsentwicklung ein. Nach insgesamt zwölf Monaten begann die stetige Wiedezunahme an Körpergewicht. Letztlich zeigte sich für die 60 untersuchten Probanden der Sub-Studie, dass 1,1% des ursprünglichen Körpergewichtes nach einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 54 Monaten wieder zugenommen wurde. Dies entspricht nach Literaturlage weitgehend den erwarteten Effekten [44].

#### *Langzeit-Nachbeobachtung*

Studien, die den langfristigen Gewichtsverlauf nach einer Intervention zur Gewichtsreduktion engmaschig dokumentierten, lieferten eher selten Angaben zur Entwicklung metabolischer Parameter [72, 163]. Diese Studien waren daher nicht in der Lage Rückschlüsse auf metabolische Effekte zu liefern [163]. Dies war eine Stärke der vorliegenden Studie. Für die 60 Teilnehmer der Intervention zeigten sich zum Follow-up nur wenige eindeutige Veränderungen in den gemessenen Parametern im Vergleich zur Situation vor der Gewichtsabnahme. Es konnte eine Zunahme im Körpergewicht, als auch im Körperfett verzeichnet werden, die sich jedoch nicht in einer Veränderung der anderen anthropometrischen Parameter zeigten. Wing *et al.* dokumentierten über neun Follow-up Jahre den Verlauf des Gewichts sowie des Taillenumfangs, aber auch der Fitness und des HbA1c lieferten jedoch keine weiteren Verlaufsdaten anderer Parameter [164, 165]. Weder

Wang *et al.* noch Gosselin *et al.* lieferten, bis auf Daten zum Gewichtsverlauf, weitere umfangreiche metabolische Daten [152, 156]. Von den hier gemessenen metabolischen Parametern, zeigten sich zum Follow-up Anstiege im Blutdruck, der Nüchtern glukose, im basalen Insulin sowie für den HOMA. Für den HbA1c zeigte sich kein Effekt über die Zeit bis zum Follow-up, dieser wurde wiederum eindeutig von Wing *et al.* 2014 gezeigt. Die Parameter des Lipidstoffwechsels der 60 Personen waren nicht verändert, und auch keine der bisher genannten Arbeiten stellte diesen Aspekt gesondert dar. Die herangezogene Kontrollgruppe von 90 Personen nahm im Verlauf an Gewicht, BMI, WHR, Taillenumfang als auch Hüftumfang sowie an Körperfett zu. Auch sie zeigten Anstiege für den Blutdruck, gleichwohl für Parameter des Glukosestoffwechsels. Da diese Personen als Teil der MeSyBePo-Follow-up Kohorte galten, wurden die Faktoren welche die Veränderungen der Parameter bedingen bereits zuvor diskutiert. Bei übergreifender Betrachtung der Veränderung der Mittelwerte zwischen Intervention und Kontrolle stellte sich jedoch die berechnete Frage des tatsächlichen Nutzens der Intervention. Die Teilnehmer schienen keinen eindeutigen und dauerhaften Vorteil in Bezug auf die gemessenen Parameter vorzuweisen. Etwa zur gleichen Zeit dieser Berechnungen konnten auch Wing *et al.*, im Rahmen der Look AHEAD-Studie, keinen dauerhaften Überlebensvorteil durch eine Intervention zur Gewichtsreduktion nachweisen [151, 165]. Die groß angelegte Look AHEAD-Studie wurde aufgrund dieser Daten sogar vorzeitig beendet. Im Rahmen der Look AHEAD-Studie [165, 166] wurde der Effekt einer Intervention zur Gewichtsreduktion ausschließlich an übergewichtigen bzw. adipösen Diabetikern untersucht. Die gesamte Kohorte mit 5154 Personen war deutlich größer, und konnte eine mittlere Follow-up Zeit von 9,6 Jahren vorweisen. Im Vergleich der strukturellen Abläufe, sind sich die Look AHEAD-Studie und die MesyBePo-Follow-up-studie sehr ähnlich, jedoch weist die Look AHEAD-Studie längere und intensivere Nachbetreuung auf [151, 162, 164]. Ebenso wie für die hier betrachteten 60 Teilnehmer der Intervention zur Gewichtsreduktion, zeigten sich auch in der Look AHEAD-Studie die größten Erfolge anthropometrisch als auch metabolisch nach der sechsmonatigen Intensivphase bzw. nach einem Jahr [165, 166]. Im weiteren Verlauf des Follow-up verminderten sich die metabolischen Unterschiede zwischen Intervention- und Kontroll-Gruppe [165]. Auch bei Wing *et al.* wurde die Nachbetreuung der Probanden intensiver durchgeführt. Folglich scheint durch eine intensivere Nachbetreuung neben dem Gewicht auch eine dauerhafte Verbesserung weiterer Parameter möglich zu sein. Die Adhärenz [72] bleibt erhalten und damit auch die erzielten Effekte [73]. Zusätzlich wäre zu erörtern ob der dauerhafte Erfolg solch einer Intervention, erst bei einem größeren dauerhaften Gewichtsverlust zum Tragen kommen können [165], dies stellte Wing *et al.* zur Diskussion.

Um diese Fragestellung zu beantworten, müssten Studien so umstrukturiert werden, dass von Anfang an Gruppen mit unterschiedlichen Reduktionszielen definiert werden. Bisher erfolgte diese Zuordnung nur im Nachhinein [164] und es ist unbekannt, welche Faktoren eine starke oder schwache Abnahme bedingten. Entsprechend ließ sich bisher auch nicht klären, ob allein ein großer Verlust von Gewicht einen dauerhaften Erfolg einer Restriktion begünstigen konnte. Diese Betrachtung verbleibt als Fragestellung für zukünftige Studien. Gestützt wird der vorteilhafte Effekt einer nachhaltigen Gewichtsreduktion zweifelsohne durch die Ergebnisse bei Patienten nach bariatrischen Operationen. Bei diesen Patienten kommt es zu einem nachhaltigen Gewichtsverlust mit einer Reduktion der Morbidität und sogar Mortalität [58, 59, 61, 62].

Im Rahmen der hier ausgewerteten Interventionsstudie musste berücksichtigt werden, dass die Rekrutierung der Teilnehmer auf freiwilliger Basis stattfand und die Teilnahme mit einem hohen Leidensdruck begründet war. Da die Teilnahme kostenpflichtig war, konnte davon ausgegangen werden, dass dies ein weiterer Faktor für die Motivation an der Umstellung des Lebensstils war. Die Gruppe war hinsichtlich dieser Faktoren vermutlich eher homogen. Die Art der Intervention sprach jedoch vermutlich nicht alle Personen gleich positiv an, entsprechend waren die Erfolge im Ausmaß der Reduktion variabel. Abhängig von den Ernährungsgewohnheiten und dem täglichen Ablauf, fiel es einigen Personen schwerer ihren Lebensstil umzustellen.

Ob eine längere und intensivere Betreuung vorteilhaft ist, ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Die Ergebnisse der Look AHEAD-Studie sprechen eher dagegen, sind aber möglicherweise nicht ohne weiteres auf nicht-diabetische Patienten zu übertragen. Im Rahmen einer neuen Studie unserer Arbeitsgruppe wird dies bereits umgesetzt. Ebenfalls werden in diesem Rahmen auch direkt Kontrollen zur Interventionsgruppe randomisiert. Der Mangel einer randomisierten Kontrollgruppe ist eine offensichtliche Schwäche der hier vorliegenden Studie. Auch wenn eine Kontrollgruppe mit 90 Personen aus der MeSyBePo Follow-up Studie gezogen wurde, erfolgte das Matching im Nachhinein und konnte nur an wenigen Parametern zur Übereinstimmung ausgerichtet werden. Auch die Größe der MeSyBePo-Follow-up Kohorte schränkte die Zahl der verfügbaren Matches ein. Auch hier hatten die variablen Follow-up Zeiten vermutlich einen Einfluss auf den Mittelwert der einzelnen Parameter. Aus diesen Gründen ist ein direkter Vergleich der beiden Studiengruppen zumindest sehr problematisch und eine randomisierte Langzeit-Studie bei adipösen, aber nicht diabetischen Patienten ist offensichtlich wünschenswert.

Bisher sind die gängigen Therapieoptionen bei Übergewicht medikamentöse Behandlungen, chirurgische Eingriffe, aber vor allem kontrollierte Gewichtsreduktionsprogramme [1, 39]. Ein

erfolgreicher Gewichtsverlust verbessert nachweislich kardiovaskuläre Risikofaktoren [161, 164] und erleichtert die Kontrolle eines *Diabetes mellitus* [161], entsprechend liegt in der Optimierung der Programme ein großes Interesse, da sie zum einen dauerhaft Kosten für das Gesundheitssystem einsparen könnten und im Vergleich zu einem chirurgischen Eingriff für den Patienten ein geringeres Risiko darstellen könnten.

### **6.2.1 Validierung der Eigenangabe der Gewichtsentwicklung**

Eine genaue und gemessene Dokumentation des Gewichtsverlaufs über einen langen Zeitraum ist aufwendig und für große Probandenkollektive nur unter erschwerten Bedingungen möglich. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Selbstangabe der 584 Probanden der MeSyBePo-Follow-up-Studie zur Folgeuntersuchung mit Daten der Interventionsgruppe validiert. Zunächst wurde eine Kategorisierung des Gewichtsverlaufs nach Studienende vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden alle Teilnehmer der Nachbeobachtung gebeten, ihre Gewichtsentwicklung bis zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung in eine von fünf Kategorien einzuordnen. Diese Angaben wurden mit den Daten der 60 Teilnehmer validiert, da diese standardisiert zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurden. Die jeweiligen Differenzen der Veränderungen des Körpergewichts zu den aufeinanderfolgenden Zeitpunkten wurden den Daten der Kategorisierung des eigenen Gewichtsverlaufs der Probanden gegenüber gestellt. Es ist allgemein bekannt, dass Probanden unter vergleichbaren Bedingungen dazu neigen ein niedrigeres Gewicht anzugeben (*underreporting*). Eine Möglichkeit der Korrektur dieser Falschangabe besteht darin jede Gewichtsangabe um circa zwei Prozent nach oben zu korrigieren [156]. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Validierungskohorte bestätigt werden, dass sich die Teilnehmer entsprechend ihren Gewichtsverlauf weitestgehend korrekt einordneten, wobei natürlich theoretisch die Teilnehmer der Gewichtsabnahme nicht notwendigerweise ähnlich korrekt berichten wie die Teilnehmer der Gesamtstudie.

### **6.2.2 T2DM, MetS und kardiovaskuläres Risiko**

Der Framingham Score diente der Berechnung des individuellen zehnjährigen kardiovaskulären Risikos und zeigte im Vergleich für die Teilnehmer der Gewichtsreduktion keine Veränderung des berechneten zehnjährigen kardiovaskulären Risikos über die Nachbeobachtungszeit. Für die Kontrollen (90 Probanden ohne intendierte Gewichtsabnahme) zeigte sich ein Anstieg des berechneten Risikos. Dem gegenüber wiesen jedoch alle Teilnehmer der MeSyBePo-Follow-up Kohorte (524 Probanden), die keine

Gewichtsreduktion anstreben, keinen Unterschied des Risikos auf. Dass der beobachtete Unterschied nur innerhalb einer kleinen Probandengruppe ohne Intervention und nicht mehr in der übergeordneten Kohorte, ebenso ohne Intervention, zu verzeichnen war, beruhte vermutlich auf den zum Matching vorgegebenen Kriterien. Die Kontrollen wurden unter anderem aufgrund der Prämisse keiner eigenen Maßnahmen zur Gewichtsreduktion ausgewählt. Dieses Einschlusskriterium für Kontrollen selektierte die Gruppe und dürfte für den Unterschied im berechneten Risiko zwischen Gesamtgruppe und Kontrollgruppe mit verantwortlich sein.

Dieses Ergebnis ist im Zusammenhang der Look AHEAD-Studie plausibel. Im Verlauf von neun Jahren Follow-up, ließ sich in dieser randomisierten kontrollierten Studie kein Unterschied für die Ereignisrate kardiovaskulärer Erkrankungen zwischen einer Interventionsgruppe mit Gewichtsreduktion und Lebensstilveränderung im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen [165]. Die Autoren vermuteten, dass erst größere Gewichtsverluste in der Lage sein könnten, einen dauerhaften Erhalt des niedrigen Körpergewichts zu fördern und damit einhergehend Effekte auf die Mortalität zeigen könnten. Ebenfalls könnten die fehlenden Unterschiede auf die Betreuung der Kontrollgruppe zurückgeführt werden. Die Kontrollgruppe könnte wider Erwarten von dem Programm profitiert haben [165]. Eine vergleichbare Beeinflussung war für die hier vorliegende Kontrollgruppe als auch für die gesamte MeSyBePo-Follow-up-Kohorte unwahrscheinlich. Zu berücksichtigen war jedoch, dass alle Probanden vermutlich ein hohes Gesundheitsbewusstsein hatten und damit langfristige Unterschiede minimiert wurden.

Für weiterführende Analysen in Kategorien der Gewichtsentwicklung (stabiler Verlauf (Schwankungen von 2-3 kg), kontinuierlicher Gewichtsverlust bzw. -zunahme, moderates Ab- und Zunehmen (weniger als 5 kg), starkes Ab- und Zunehmen (mehr als 5 kg)) wurden alle drei Gruppen (60 Probanden mit intendierter Gewichtsreduktion, 90 Kontrollen bzw. 524 Probanden der MeSyBePo-Follow-up Studie) auf Unterschiede des berechneten kardiovaskulären Risikos getestet. Innerhalb der Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden der jeweiligen Gruppen (Kategorien der Gewichtsentwicklung). Daher wurde diese Fragestellung in der gesamten MeSyBePo-Follow-up-Kohorte weiter untersucht.

In der kategorialen Betrachtung der Gewichtsentwicklung zeigte sich für die MeSyBePo-Follow-up-Kohorte, dass ein Anstieg des Körpergewichts mit einer Zunahme des berechneten kardiovaskulären Risikos einhergeht. Unsere Daten unterstützen, dass die Zunahme des berechneten kardiovaskulären Risikos durch die Zunahme an Gewicht und den damit verbundenen und bekannten metabolischen Veränderungen mit verursacht wird [1, 124].

Wird einer Gewichtszunahme nachhaltig entgegengewirkt, kann dies wie bei der hier betrachteten Gruppe mit intendiertem Gewichtsverlust den Anstieg des kardiovaskulären Risikos mindern. So zeigte sich bei uns kein Unterschied im Vergleich des mittleren zehnjährigen kardiovaskulären Risikos im Verlauf des Follow-ups für die Teilnehmer der Gewichtsreduktion. In weiterführende Analysen nach Kategorien der Gewichtsentwicklung zeigte sich lediglich für Probanden mit starken Schwankungen im Gewicht ein Anstieg des kardiovaskulären Risikos. Wing *et al.* liefern hierzu keine Vergleichsdaten, da keine weitere Unterteilung der Kohorte erfolgte. Nur wenige andere Arbeiten befassten sich spezifischer mit der Zyklenzahl von Gewichtsveränderungen oder mit dem Ausmaß der Schwankungen. In der *Nurses Health Study* galten Gewichtsveränderungen von mehr als 9 kg beziehungsweise 4,5 kg, die mindestens dreimal initiiert wurden als zyklisch [167, 168]. Im Rahmen der *Cancer Prevention Study* wurde ebenso eine Gewichtsabnahme von 4,5 kg mit Wiedergewinnung dieses Gewichts als Zyklus definiert [169]. Wir wählten eine engere Unterteilung für die Veränderungen des Gewichts, definierten jedoch auch zwei Kategorien für leichte und schwere Schwankungen an einer 5 kg Grenze. Innerhalb der MeSyBePo-Follow-up-Kohorte zeigten sich für eben diese Gruppen deutlich stärkere Veränderungen des jährlichen relativen kardiovaskulären Risikos im Vergleich zu Personen die konstante oder negative Gewichtsverläufe angaben. Die Risikoberechnungen in der *Nurses Health Study* zur Gesamtmortalität [168] sowie für den Bluthochdruck [167] wiesen vor Adjustierung jeweils signifikante Risiken für einen zyklischen Verlauf des Gewichts nach, konnten diesen nach Adjustierung für potentielle Störgrößen jedoch nicht mehr belegen [167, 168], oder wiesen sogar eine negative Assoziation nach [169]. Die Zyklenzahl wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgenommen, jedoch wurde für die Zuordnung in die Kategorien explizit unterschieden, nach konstanter Zu- oder Abnahme und im Gegensatz dazu nach mindestens einmaliger Ab- ab und Wiedergewinnung von einer Schwankung ausgegangen, ähnlich also der *Cancer Prevention Study* [169].

Bei den Berechnungen in den Kategorien von Gewichtsangabe und Unterteilung anhand einer 3% Grenze, fanden sich für eine Gewichtsabnahme keine Unterschiede zwischen dem zehnjährigen relativen Risiko der Eingangsuntersuchung im Vergleich zur Folgeuntersuchung. Unterstützend zu dieser Beobachtung beschrieb Wing *et al.*, eine deutliche Verbesserung des Körpergewichts und der kardiovaskulären Risikoparameter im Rahmen einer Intervention mit vierjährigem Follow-up [166]. Bereits nach einem Jahr war ein moderater Gewichtsverlust zwischen fünf und zehn Prozent mit deutlichen Verbesserungen einzelner kardiovaskulärer Risikofaktoren verbunden [164]. Die in dieser Arbeit untersuchten Personen ordneten sich einer kontinuierlichen Abnahme zu und hatten vermutlich, wenn überhaupt wenige Phasen

in denen sie wieder zunahmen, das ist jedoch nur eine Vermutung. Im Falle von Stevens *et al.* schien sich nach Adjustierung für den BMI und andere Risikofaktoren eine geringe Anzahl von Zyklen (definiert als 1-4 Zyklen) mit einem geringeren Mortalitätsrisiko assoziiert zu sein [169]. Eine Unterteilung der Probanden, nach Zyklenzahl oder wie in der hier untersuchten Kohorte nach Ausmaß der Gewichtsveränderung scheint demnach einen wesentlichen Einflussfaktor für die Prädiktion des kardiovaskulären Risikos zu berücksichtigen [168, 169]. Genauer gesagt betrifft dies die Parameter aus denen sich das Risiko berechnet. Ausgehend von dem Gewichtsverlauf, treten womöglich noch weitere Gemeinsamkeiten und Merkmale für die jeweiligen Personen auf. Bei Stevens *et al.* z.B. waren die Personen mit ausgeprägten zyklischen Gewichtsveränderungen auch die Personen die eher rauchten, einen T2DM vorwiesen sowie erhöhte Blutdruckwerte zeigten [169]. Unter Berücksichtigung der Arbeit von Stevens *et al.* könnte das heißen, dass auch wenn sich für zyklische Gewichtsveränderungen keine eindeutige Assoziation zur Mortalität nachweisen ließ, diese Personen im Verhalten eher einen ungesunden Lebensstil vorzuweisen schienen.

Im Widerspruch zu den Annahmen von Stevens *et al.* stehen Studien, welche den prädiktiven Wert für die kardiovaskuläre Mortalität untersuchten, jedoch nicht nachweisen konnten [168]. Bei dem Vergleich der genannten Studien sollte bedacht werden, dass zum einen die kardiovaskuläre Mortalität der Teilnehmer in LOOK AHEAD bestimmt wurde und zum anderen das zehnjährige kardiovaskuläre Risiko über den Framingham Score geschätzt wurde. Zudem war die Teilnahme an LOOK AHEAD ausschließlich Typ 2 Diabetikern vorbehalten. Ein direkter Vergleich ist hierbei schon aufgrund der unterschiedlichen Probandencharakteristika nicht möglich. Zudem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die von uns gezeigten Anstiege des zehnjährigen kardiovaskulären Risikos in Relation zu der eigenen Kategorisierung des Framingham Scores Schwankungen bzw. Anstiege innerhalb einer Kategorie darstellen. Das Risiko der Probanden verbleibt laut Framingham –Zuordnung gleich, jedoch erhöhte sich der Score-Wert innerhalb der jeweiligen Kategorie.

Neben der Schätzung des zehnjährigen kardiovaskulären Risikos wurden für die Gruppen die Inzidenz von T2DM sowie dem Metabolischen Syndrom untersucht. Zu Beginn der Studie waren acht der 60 Teilnehmer mit intendierter Gewichtsreduktion bereits ein MetS diagnostiziert, bis Ende der Studie verdreifachte sich diese Zahl. Für die Kontrollen ließ sich Ähnliches beobachten, hier erhöhte sich die Zahl um das 2,4 fache. Ein Anstieg in der Zahl der T2DM- und MetS-Diagnosen war innerhalb der knapp 5-jährigen Nachbeobachtungszeit in jedem Fall zu erwarten, allerdings ist die Zahl der inzidenten Fälle in der recht kleinen Gesamtgruppe auch gering. Durch die gezeigten Anstiege über die Zeit erfüllten tatsächlich dreimal so viele Probanden die entsprechende Anzahl an Kriterien und ihnen wurde ein MetS

zugeordnet. Die Anzahl an Diabetesdiagnosen veränderte sich wiederum kaum. Innerhalb der Interventionsgruppe verminderte sich die Zahl der Diabetiker um eins, in der Kontrollgruppe wurde bis zur Nachbeobachtung eine Diagnose mehr gestellt. Aufgrund der kleinen Gruppen war hier keine sinnvolle statistische Auswertung möglich, auch eine Trendabschätzung schien nicht sinnvoll. Dass eine langfristige Zunahme von Gewicht, als einer der wichtigsten Faktoren das Risiko für ein MetS erhöht, zeigten Stefanska *et al.* [170]. im Rahmen einer Studie mit 153 initial normalgewichtigen Frauen und einer 30-40jährigen Nachbeobachtungszeit. Eine Erklärung für die konstanten Zahlen der Diabetes-Inzidenz in der vorliegenden Arbeit könnte im Verlauf der Erkrankung selbst liegen. Der Manifestation eines T2DM geht eine lange kompensatorische Phase durch eine erhöhte Insulinausschüttung voraus, bis es zur Resistenz kommt [10]. Zum einen könnte die Nachbeobachtungszeit von 5 Jahren in der vorliegenden Kohorte zu kurz gewesen sein, als dass sich metabolische Veränderungen in Bezug auf die Glukosehomöostase in der Diabetes-Inzidenz gezeigt hätten. Zum anderen scheint eine Gewichtszunahme in Alter von 25-40 Jahren ein deutlich höheres Risiko für einen T2DM zu bedingen, als eine Gewichtszunahme zwischen dem 40. und 55. Lebensjahr, dies zeigten Daten der EPIC-Studie Potsdam [124]. Wie in den Risikoberechnungen zur Gesamtmortalität [168, 169] oder zum kardiovaskulären Risiko zuvor, könnten auch für die Diagnose des MetS zyklische Veränderungen oder die Zahl der Zyklen [125] von Gewichtsschwankungen eine Rolle für die spätere Zuordnung eines MetS haben, denn bei der Abschätzung von Mortalitätsrisiken sowie beim MetS werden auch kardiovaskuläre Faktoren mit in die Berechnungen einbezogen. Sollten diese durch zyklische Gewichtsveränderungen beeinflussbar sein, sollte sich das nicht nur bei der Abschätzung kardiovaskulärer Risiken sondern auch in der MetS-Inzidenz widerspiegeln können. Zusammenfassend zeigte sich wohl ein geringer Einfluss auf die Diabetes-Inzidenz, wobei die Gesamtgruppen aber zu klein ist um zu dieser Frage valide Aussagen machen zu können.

In Bezug zur Prädiktion des zehnjährigen kardiovaskulären Risikos und der MetS-Inzidenz verminderte eine Reduktion des Körpergewichts das kardiovaskuläre Risiko. Eine Gewichtszunahme und starke Schwankungen des Gewichts gingen jedoch mit einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko einher. Ebenso schien die MetS-Inzidenz für Personen, deren Gewicht Schwankungen unterlag, höher zu sein, auch wenn die MetS-Inzidenz für alle Gruppen anstieg.

Nach dem aktuellen Stand ist ein eindeutiger Beleg für den Nutzen von multimodalen, nicht chirurgischen Gewichtsreduktionsprogrammen für übergewichtige und adipöse Probanden weiterhin nicht erbracht. Es scheint aber Faktoren, wie das Ausmaß des Gewichtsverlusts, zu

geben, welche mit einem dauerhaften Erfolg einer Gewichtsreduktion in Zusammenhang gebracht werden können. Inwieweit diese Faktoren jedoch tatsächlich langfristig Einfluss auf die Endpunkte nehmen, bleibt unklar. Es sind weitere Studien erforderlich, die im Idealfall eine dauerhafte Betreuung versus einer Kontrollgruppe ohne Betreuung über viele Jahre engmaschig beobachten können, um die tatsächlichen Effekte und mögliche Risiken zyklischer Gewichtsveränderungen auf die Endpunkte bemessen zu können.

### 6.3 Analyse unterschiedlicher Faktoren auf die Langlebigkeit von *C.elegans*

Im Rahmen dieser Arbeit galt es im Modellorganismus *C.elegans* den Einfluss exo- als auch endogener Effekte auf die Lebensspanne zu untersuchen. Es galt ein intermittierendes Fütterungsregime zu etablieren und dessen Effekte auf die Lebensspanne. Ebenso war es von Interesse welche molekularen Mechanismen von diesem Fütterungsregime beeinflusst waren. Des Weiteren sollten Unterschiede im Intermediärstoffwechsel dietätischer und genetischer Modelle untersucht werden, mit dem Ziel Hinweise auf bisher unbekannte Faktoren und Stoffwechselwege zu erhalten, welche Einfluss auf die Lebensspanne nehmen.

#### 6.3.1 Einfluss endo- und exogener Faktoren auf die Lebensspanne

Faktoren wie Temperatur, Alter der Kultur, Bakterienstamm und Populationsdichte [171], die jeweils Einfluss auf die Lebensspanne nehmen, werden häufig unterschätzt und können bei einer geringen Wiederholungszahl der Versuche zu fehlerhaften Interpretationen einzelner Datensätze führen. Aus diesem Grund verlangt insbesondere der *Life Span Assay* eine valide Etablierung um einen Standard für das jeweilige Labor zu definieren [171]. Zur Standardisierung der Methodik erfolgte ein Vergleich verschiedener Protokolle zur Wachstumshemmung von Bakterien (Ampicillin, Carbenicillin, UV-Licht sowie Hitzebehandlung) mit dem Ergebnis, dass Ampicillin eine langanhaltende reproduzierbare Inhibition der Zellteilung sowie eine fortlaufende optimale Versorgung der Nematoden mit Nährstoffen gewährleistete.

Bereits Lenaerts *et al.* und Greer *et al.* beschrieben wesentliche Unterschiede im Verlauf des *Life Span Assays* in Abhängigkeit der Vitalität der Bakterien [87, 172]. So schienen Nematoden allgemein länger zu leben wenn ihre Nahrungsquelle zwar wachstumshemmend aber nicht abgetötet war [172]. Lenaerts *et al.* vermuteten hinter diesen Beobachtungen einen hitzelabilen, nicht-löslichen Faktor der Bakterien, der das Überleben der Nematoden begünstigt [172]. Bisher konnte dieser jedoch nicht identifiziert werden. Tote Bakterien, und damit metabolisch inaktive Bakterien, dienen den Nematoden folglich nur als unzureichende Nährstoffquelle, da sie für die Nematoden lebensnotwendige Metabolite nicht mehr produzieren können. Sie beeinflussen die Lebensspanne negativ [172]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Untersuchung der Nematoden mit Bakterien auf physiologischem Niveau angestrebt, aus diesem Grund erfolgte die Inkubation der Bakterien mit Ampicillin.

Im nächsten Schritt galt es jene Bakterienkonzentrationen zu ermitteln, bei denen die Lebensspanne dauerhaft verlängert werden kann. Eine maximale Lebensverlängerung im Vergleich zur *ad libitum* gefütterten Gruppe wurde mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^8$  CFU

erreicht. Ein deutlicher Effekt war ebenso noch bei  $1 \cdot 10^9$  zu erkennen. Eine Konzentration von  $1 \cdot 10^{11}$  CFU verkürzte die Lebensspanne deutlich. Dieser Vergleich bestätigte unter anderem die Daten von Greer *et al.* [173]. So zeichnen sich lebensverkürzende Effekte bei zu hohen, sowie zu niedrigen Bakterienkonzentrationen ab, lebensverlängernde Effekte sind somit nur bei einer Restriktion ohne Malnutrition zu erreichen [173].

Unabhängig von der Bakterienkonzentration dienten genetische Modelle mit veränderter Lebensspanne als Negativ- bzw. Positiv Kontrollen. So wurde für den Stamm CB1370 daf-2(e1370)III im Vergleich zum Wildtypen häufig eine um 50% verlängerte Lebensspanne beschrieben [88], dieser Effekt zeigte sich valide unter den etablierten Bedingungen in der vorliegenden Arbeit. Der Stamm CF1038 daf-16(mu86)I ist als kurzlebig beschrieben [88], auch dieser Effekt zeigte sich valide unter den etablierten Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit.

### 6.3.2 Einfluss variierender Restriktionsregimes auf die Lebensspanne

Das intermittierende Fütterungsregime der Nematoden sah entsprechend einen über die Lebensspanne verlaufenden wiederholten Wechsel von Überversorgung zu einer Minderversorgung mit Nährstoffen vor. Dieser Wechsel in der Verfügbarkeit von Nährstoffen diente der Fragestellung, ob solch ein erzwungenes zyklisches Regime Einfluss auf die Lebensspanne und den Metabolismus haben kann.

Am Wildtypen (N2) wurde dieses Restriktionsregime zuerst untersucht und es zeichnete sich eine sukzessive Steigerung der mittleren Lebensspanne parallel zur Anzahl der Restriktionsphasen ab. Die mittlere Lebensspanne näherte sich in den einzelnen Versuchen entweder ab der 3. oder der 4. Restriktion jener der kontinuierlichen Restriktion mit  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml an. Folglich war es möglich, den lebensverlängernden Effekt einer dauerhaften Restriktion zu imitieren, in dem regelmäßige kurze Restriktions-Intervalle mehrtägige Phasen einer Überversorgung unterbrechen. Diese Effekte ergänzten die Beobachtungen von Honjoh *et al.* 2009 nach intermittierendem Fasten (IF) für Nematoden [174]. Über den stetigen Wechsel von Mangel zu Überfluss hinaus, waren die Nematoden in der Lage den kurzfristigen Mangel an Nährstoffen während der Zeit der Wiederverfügbarkeit von Nahrung auszugleichen und wiesen eine verlängerte Lebensspanne auf [174]. Vergleichbar ist auch von Säugern bekannt, dass eine Restriktion mittels intermittierendem Fastens die Lebensspanne deutlich verlängern konnte [175]. Für Nematoden waren der von Honjoh *et al.* gewählte Fütterungszeitraum von 48h und das im Rahmen der vorliegenden Arbeit applizierte Regime von 24h mit sechstägiger *ad libitum*-Phase, die kürzesten bisher beschriebenen Zeitabschnitte für solch einen Versuchsablauf mit wechselnden Regimes.

Die Art der Applikation der Restriktion in den genannten Arbeiten glichen methodisch dem von Greer *et al.* beschriebenen Prinzip der *solid dietary restriction* (sDR) mit verdünnten Bakterienlösungen lebender oder getöteter Bakterien als Nahrungsquelle [173]. Das Maß der Lebensverlängerung schien nur noch zusätzlich von der Dauer der Restriktion abhängig zu sein. Der Faktor der Dauer der Restriktion im Zusammenhang mit der Wiederholung wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Ein vergleichbarer Ansatz, der für einen stufenartigen Effekt der Wiederholungen der Restriktionsphasen auf die Lebensspanne nachweisen kann, wurde bisher nicht beschrieben und ist in der hier vorliegenden Arbeit der erste. Dass ein zyklisch intermittierendes Fütterungsregime einen, ähnlich einer dauerhaften Restriktion, lebensverlängernden Effekt zeigte, steht in einem gewissen Widerspruch zur Situation beim Menschen. Hier konnten randomisierte Studien bislang keinen nachhaltig positiven Effekt durch eine Kalorienrestriktion im Hinblick auf klinisch relevante Endpunkte nachweisen [151]. Einzelne Studien legen sogar nahe, dass eine gewollte Gewichtsabnahme langfristig mit einer gesteigerten Mortalität assoziiert sein könnte [125]. Die aus dem humanen Modell häufig dokumentierten Effekte einer Wiedergewinnung an Körpergewicht nach einer Restriktion, und die damit oft einhergehende Verschlechterung metabolischer Parameter sind damit mutmaßlich auf Mechanismen zurückzuführen, die phylogenetisch im Nematoden noch nicht angelegt sind. Dies könnte beispielsweise das Belohnungssystem sein, welches phylogenetisch erst später entstanden ist [176]. Bei anderen wechselnden Fütterungsregimes, die auch Einfluss auf die Lebensspanne zeigten wie das *every-other-day feeding* (EOD) [88] sowie das bereits erwähnte intermittierende Fasten (IF) [88], schien es der IGF-1/Insulin-Signalweg zu sein, der den eigentlichen lebensverlängernden Effekt vermittelte [88]. Ob der IGF-1/Insulin-Signalweg auch bei wechselnden Fütterungsregimes in dieser Arbeit regulatorisch wirkte, wurde überprüft, indem zwei Nematodenstämme mit Mutationen im IGF-1/Insulin-Signalweg nach der Bestätigung ihrer Phänotypen dem gleichen zyklischen Fütterungsregime wie dem Wildtyp ausgesetzt waren. Bei der Übertragung der Applikation in diese Stämme, ließ sich kein Effekt auf die Lebensspanne nachweisen. Zwar lag die mittlere Lebensspanne jeweils zwischen der *ad libitum* und der restrikt gefütterten Gruppe, blieb jedoch innerhalb der Gruppen gleich und war unabhängig von der Anzahl der Restriktionszyklen. Demzufolge musste der IGF-1/Insulin-Signalweg sowie FOXO für die Verlängerung der Lebensspanne bei intermittierendem Fasten im Nematoden mit verantwortlich sein. Eine verminderte Aktivierung der Signalkaskade ausgelöst durch Nährstoffmangel hat ähnliche Effekte wie Funktionsverluste in einzelnen Genen des IGF-1/Insulin-Signalweges (z.B. *daf-2* oder *daf-16*) [81, 177]. Allgemein ist für den Stamm CB1370 *daf-2(e1370)III* eine um 50% verlängerte Lebensspanne beschrieben [178]. Für den

Stamm CF1038 *daf-16(mu86)* gibt es variable Angaben um welchen Anteil die Lebensspannen im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist [177]. Beide Phänotypen wurden auch in dieser Arbeit während der Etablierung bestätigt. Unter einer starken kontinuierlichen Restriktion konnten für beide Stämme, CB1370 sowie CF1038, lebensverlängernde Effekt nachgewiesen werden. Zusätzlich zum IGF-1/Insulin-Signalweg mussten folglich unter diesen Bedingungen auch noch andere nutrienten-sensitive Wege, wie zum Beispiel mTOR, anteilig an der Verlängerung der Lebensspanne beteiligt gewesen sein. Auch Honjoh *et al.* zeigte für den Stamm CB1370 *daf-2(e1370)*III eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne unter Restriktion mit der Vermutung, das mTOR zusätzlich in die Regulation mit eingreift [174]. Laut Kenyon *et al.* wird der lebensverlängernde Effekt eines reinen EOD Regimes über den IGF-1/Insulin-Signalweg vermittelt [88]. Honjoh *et al.* wies zudem nach, dass ein IF-Regime, welches einen sich wiederholenden Wechsel von *ad libitum* zu absolutem Nahrungsmangel innerhalb von 48h vorsah nicht mehr ausschließlich über den IGF-1/Insulinsignalweg vermittelte, sondern auch überlappend der TOR-Signalweg und damit zwei nutrientensensitive Signalwege Einfluss nahmen [174]. Auch für das hier etablierte intermittierende Fütterungsregime könnte ein Wechsel oder eine Überlappung zweier Signalkaskaden die Erklärung für die beobachteten Effekte liefern.

Betrachtete man die einzelnen Experimente, so ist der relative Einfluss der zyklischen Restriktion für die *daf-2*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp geringer. Untereinander wiesen die einzelnen Restriktionsgruppen keine Unterschiede auf, im Vergleich zur überfütterten Gruppe ließen sich jedoch signifikante Unterschiede in der mittleren Lebensspanne nachweisen. Eine Differenzierung nach einmaliger oder mehrmaliger Restriktion war hier offensichtlich gering. Auch Honjoh *et al.* konnte nur einen relativ geringen Effekt bei fortschreitender mehrmaliger Restriktion nachweisen. Für die *daf-2*-Mutante könnte somit der mTOR-Signalweg für die deutlich verlängerte Lebensspanne unter einer sehr eingeschränkten Verfügbarkeit von Nährstoffen verantwortlich gemacht werden. Die These unterstützten Daten von *eat-2* Mutanten. Für diese Mutanten ist beschrieben, dass ein chronischer Nahrungsmangel den mTOR-Signalweg hemmt und auf diese Art die Lebensverlängerung provoziert [88].

Im Vergleich zu *daf-2* war bei den *daf-16*-Mutanten ein eindeutigerer Effekt zu beobachten, obwohl diese lange als Nullmutanten galten, und eine Restriktion keinen Effekt haben sollte. Die hier dargestellten Ergebnissen widersprachen dem jedoch. Etwa zur gleichen Zeit wie die ersten Beobachtungen dieser Arbeit, veröffentlichte Kwon *et al.* das Vorhandensein einer bisher unbekannte aktiven Isoform von *daf-16*, die eben diese Beobachtungen erklären konnte. Die bisher verwendete *daf-16*-Mutante war keine Nullmutante, sondern wies immer

noch eine aktive Isoform von daf-16 auf, die auch Anteil an der Regulation der Lebensspanne haben konnte [177]. Der Effekt einer zyklischen Restriktion auf die mittlere Lebensspanne konnte demnach auch in der daf-16-Mutante gezeigt werden. Ein Effekt mehrmaliger Restriktion auf die Lebensspanne konnte gezeigt werden. Auch dort trat eine Verlängerung der Lebensspanne auf. Die allgemein kurze Lebensdauer der Tiere barg jedoch das Problem, dass der Großteil der Tiere insgesamt zu früh für die mehrmaligen Interventionen verstarben. Der Effekt einer mehrmaligen Restriktion im Verlauf von Wochen war für diese Mutante schwerer umsetzbar. Hier wären allgemein geringere Abstände zwischen den restrikten Phasen von Vorteil bzw. wäre es sinnvoll die vier Restriktionsphasen in Relation zur beobachteten maximalen Lebensspanne der Vorversuche auf diesen Stamm zu adaptieren. Im Rahmen dieser Beobachtungen stellte sich die Frage ob eine Restriktion im bereits gealterten Nematoden einen Einfluss auf die Lebensspanne hat. Eventuell stellt eine sehr späte Restriktionsphase einen Stressfaktor dar, der verkürzend auf die Lebensspanne wirkt. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Eine Restriktion von 24h oder 52h, in der dritten oder in der vierten Woche initiiert, wirkte sich nicht auf die Lebensspanne aus. Insofern ist der beobachtete Effekt einer Lebensverlängerung durch Kalorienrestriktion offenbar altersabhängig.

Um genauere Aussagen über metabolische Prozesse in oder in Folge der restrikten Phasen zu erhalten, wäre es im Nachhinein sinnvoll den Körperfettanteil der Würmer zu messen oder die Rate des Sauerstoffverbrauchs. Ebenso könnten Genexpressionsdaten Anhaltspunkte für Reaktionswege liefern, die durch die Art der Restriktion verstärkt aktiviert sind. Die Messungen würden die bereits publizierte Daten von Greer *et al.* sowie Ristow *et al.* um diese Modifikation in der Restriktion ergänzen [50, 173]. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus jedoch zunächst auf der Etablierung und Untersuchung eines bisher nicht beschriebenen zyklischen Regimes, da der Ansatz eines Wechsels in der Verfügbarkeit von Nährstoffen auf einem häufig in humanen Studien dokumentierten Effektes beruht. In humanen Studien wurde häufig ein Wechsel zyklischer Phasen von Gewichtsverlust und Gewichtszunahme nach intendierter Gewichtsreduktion beobachtet [169]. Ob sich dies negativ auf die Lebenserwartung auswirken kann, wurde bisher nicht ausreichend geklärt und aus diesem Grund in ein einfacheres Modell übertragen. Auf diese Art konnten die grundlegenden Mechanismen eines Wechsels der Nährstoffen-Verfügbarkeit untersucht werden. Für die Untersuchung metabolischer Muster unter Restriktion und *ad libitum* Fütterung wurde eine umfangreiche Untersuchung mit Hilfe von Metaboliten-Profilanalysen gestartet, die im Folgenden diskutiert werden.

### 6.3.3 Aufschluss metabolische Muster über Regelkreise der Lebensspanne

Die Lebensspanne der Nematoden lässt sich über zwei Wege beeinflussen, zu einen über endogene zum anderen über exogene Faktoren, somit genetische Veränderungen oder diätetische Interventionen respektive. Eine Restriktion bedingt Veränderungen der Aktivität intrazellulärer Signalwege, im speziellen des IGF-1/Insulin-Signalweges und verlängert auf diesem Weg die Lebensspanne. Ein analoger Effekt lässt sich allein durch Mutation des Insulinrezeptors erreichen. Wir haben beide Modelle hinsichtlich ihres Metabolitenprofils untersucht, um mögliche Zusammenhänge noch unbekannter Stoffwechselwege aufzudecken und deren Funktionalität im weiteren Verlauf zu bestätigen.

Unter den Metaboliten, die identifiziert werden konnten, zeigten jene des Tryptophan-Stoffwechsels reproduzierbar verändert. So wiesen langlebige Modelle niedrige Konzentrationen an Tryptophan auf, sowie erhöhte Konzentrationen des 2-Aminomuconsäure-Semialdehyds, als eines der Zwischenprodukte des Abbaus von Tryptophan. Dies könnte auf einen erhöhten Katabolismus im Tryptophan-Stoffwechsel hinweisen und somit auf einen erhöhten Proteinabbau in langlebigen Modellen. Ebenfalls von einem erhöhten Proteinkatabolismus in langlebigen Mutanten sowie Dauerlarven gingen Fuchs *et al.* und Martin *et al.* aus. Allerdings wurde hier eine andere Messmethode verwandt und nicht Tryptophan oder dessen Abbauprodukte, sondern vor allem verzweigtkettige Aminosäuren wie Valin und Isoleucin waren in den langlebigen Modellen erhöht [179, 180]. Auch in komplexeren Modellen schien dieser Effekt analog nachweisbar zu sein [181]. Tryptophan, als eine der essentiellen Aminosäuren, ist in Säugern wie auch in Nematoden ein Vorläufer von Serotonin und auch das serotonerge System des Nematoden und dessen Kontrolle ist laut Sze *et al.* den Säugern sehr ähnlich [182]. Serotonin scheint in Säugern sowie im Menschen wesentlichen Anteil an der Regulation der Aufnahme von Kohlehydraten zu haben [183]. Im Nager als auch im Menschen sind Stimulantien des Serotonins zudem in der Lage die Nahrungsaufnahme zu vermindern und im Gegenzug den Energieverbrauch zu erhöhen [183]. Allerdings bestehen auch positive Assoziationen von BMI und Serotonin-Rezeptordichte im Gehirn bei übergewichtigen Personen [184].

Ob Tryptophan selbst Einfluss auf die Lebensspanne von Nematoden haben kann, wurde von uns überprüft. Mittels spezifischer siRNA hemmten wir zwei entsprechende Enzyme für den Abbau und den Umbau, die Tryptophan-Dioxygenase und die Tryptophan-Hydroxylase und wiesen lebensverlängernde Effekte nach. Wir schlussfolgerten, dass die resultierenden hohen Tryptophan-Spiegel Grund des lebensverlängernden Effektes waren.

Diese Beobachtungen waren jedoch mit den initialen Daten der Metaboliten-Analysen nicht konform, in denen für langlebige Modellen niedrige Tryptophan-Spiegel gemessen wurden.

Wir vermuteten, daher dass nicht Tryptophan allein sondern ein Metabolit, welcher im Abbau des Tryptophans entsteht, metabolisch aktiv sein könnte und seine Konzentration über einen Rückkopplungsmechanismus den Abbau von Tryptophan reguliert. Diese Hypothese müsste durch ein erneutes Screening mit einer neuen Auswahl von Enzymen welche über RNA-Interferenz den Lebenszyklus beeinflussen, überprüft werden.

Dass der Tryptophan-Hydroxylase eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme zukommt, war seit längerem bekannt [182]. Ein kompletter als auch ein teilweiser Funktionsverlust des Enzyms generierte dennoch beständig vitale Larven und Nematoden. Die Tiere waren durch eine verminderte Nahrungsaufnahme, eine erhöhte Fetteinlagerung und sowie eine längere Lebensspanne gekennzeichnet. Laut Sze *et al.* hatte das Enzym indirekten Einfluss auf die Regulation der IGF-1/Insulin-Signalkaskade als auch auf die Mechanismen von TGF-beta [182]. Tph-1 Mutanten ebenso wie daf-2 Mutanten sind langlebig, beide weisen niedrige Serotoninspiegel auf. Modulationen im IGF-1/Insulin-Signalweg beider Genotypen zeigen ähnliche Effekte, was darauf schließen lässt das der IGF-1/Insulin-Signalweg über serotonerge Neurone gesteuert werden könnte [185]. Im Tierreich wird die serotonerge Antwort als Kopplung von Nahrungspertzeption mit motorisch-endokrinen Folgeeffekten oft als Belohnung verstanden und ist Teil eines Belohnungssystems [182]. Wie jedoch bereits erwähnt, besitzt der Nematode evolutionär bedingt kein vergleichbares System, wahrscheinlicher ist eine Rolle des serotonergen Systems in der homöostatischen Kontrolle des Energiemetabolismus.

In bisherigen Arbeiten zu metabolischen Profilen langlebiger Modelle des Nematoden *C.elegans* veröffentlichten Fuchs *et al.* NMR Daten der Charakterisierung von IGF-1/Insulin-Mutanten [179, 180, 186]. Butler *et al.* analysierte Proben langlebiger Modelle mittels HPLC und UV. Wir hingegen nutzen GC-TOF-MS und UPLC-FT-ICR-MS und verfolgten einen ungerichteten Ansatz zur Erstellung der metabolischen Profile. Die einzelnen Studien sind schwer vergleichbar, da je nach angewandter Methodik andere Metaboliten detektiert werden. Ziel der Untersuchung war die Hypothesengenerierung hinsichtlich unbekannter Mechanismen, die den Effekt der Langlebigkeit im Modellorganismus *C.elegans* bedingen können bzw. darauf Einfluss nehmen.

Aus den Ergebnissen der Nematoden-Experimente sowie dem bisherigen Stand anderer Publikationen scheinen sich langlebige Modelle durch einen erhöhten Proteinkatabolismus auszuzeichnen mit der Folge, dass einzelne Aminosäuren metabolisch als auch neuromodulatorisch wirken können bzw. in entsprechende Prozess involviert sind [179, 180]. Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass wir den Proteinkatabolismus nicht direkt bestimmt haben. Diese Effekte sind bisher im Zusammenhang mit exogenen oder endogenen

Modulationen einzelner Elemente im IGF-1/Insulin-Signalwegs in Nematoden beobachtet worden. Inwieweit diese Mechanismen evolutionär konserviert sind, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht sagen. Interessant ist jedoch, dass die lebensverlängernde Wirkung von Mutationen im IGF-1/Insulin-Signalweg dem Nematoden evolutionär auf dieser Stufe scheinbar die beste Möglichkeit geben seinen Fortbestand zu gewährleisten. Im Säugern wiederum gibt es bisher lediglich Hinweise auf einen erhöhten Proteinkatabolismus bei Störungen der Glukosehomöostase [181, 187, 188]. Störungen im IGF-1/Insulin-Signalwegs sind bei Säugern oft gleichzusetzen mit einer Insulinresistenz, die meist durch zu hohes Körpergewicht und einen zu großen Anteil an Körperfett bedingt sind und nicht mit der Lebenserwartung assoziiert sind [189].

Für *C.elegans* sollten sowohl exo- als auch endogener Effekte auf die Lebensspanne untersucht werden. Als exogener Effekt galt ein intermittierendes Fütterungsregime. Das Regime war angelehnt an die zyklischen Phasen von Nahrungskarenz und freier Speisewahl, die in humanen Studien oft mit einem zyklischen Gewichtsverlauf und mit der Verschlechterung metabolischer Parameter einhergehen. Bisher konnten in klinischen Studien keine positiven Effekte durch eine Kalorienrestriktion im Hinblick auf relevante Endpunkte nachgewiesen werden. Ein intermittierendes Fütterungsregimes in *C.elegans* verlängerte jedoch die Lebensspanne sukzessiv mit der Häufigkeit der Phasen zur Nahrungskarenz. Vermittelt wurden die Effekte scheinbar hauptsächlich über den IGF-1/Insulin-Signalweg. Diese widersprüchlichen Ergebnisse beruhen vermutlich auf Mechanismen und Wechselwirkungen, die phylogenetisch noch nicht im Nematoden angelegt sind.

Metabolischen Untersuchungen für *C.elegans* in Stämmen mit verlängerter Lebensspanne, waren durch verminderte Tryptophan-Konzentrationen charakterisiert. Die experimentelle spezifische Herabregulation einzelner Enzyme des Tryptophan-Stoffwechsels im Wildtypen war hingegen durch eine erhöhte Tryptophan-Konzentration charakterisiert und hatte ebenso lebensverlängernde Effekte. Die Vermutung liegt hier nahe, dass nicht Tryptophan allein, sondern ein bisher unbekannter Metabolit des Tryptophans Einfluss auf die Lebensspanne hat. Es bedarf weiterer Untersuchungen und der gezielten Hemmung von Enzymen des Tryptophan-Stoffwechsels um diesen potentiellen Regulator zu finden.

## 7. Zusammenfassung

Als ein aktuelles Problem unserer Gesellschaft stellt sich die Häufung von Erkrankungen dar, deren Entstehung auf Übergewicht und Bewegungsmangel zurückzuführen sind. Insbesondere mit fortschreitendem Alter nehmen die damit einhergehenden Komplikationen zu. Umso bedeutender ist das Verständnis um die pathologischen Mechanismen in Folge von Übergewicht und Bewegungsmangel, aber auch der des Alterungsprozesses und seiner beeinflussenden Faktoren.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entstehung metabolischer Erkrankungen beim Menschen zu untersuchen. Die Auswertung der Verlaufsdaten anthropometrischer und metabolischer Parameter von 584 Teilnehmern der prospektiven Studie Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam Follow-up (MeSyBePo Follow-up) ergab, dass für die gesamte Kohorte über den Beobachtungszeitraum von Jahren ein Anstieg an Übergewicht zu verzeichnen war. Ebenso war eine Verschlechterung des Blutdrucks und von Parametern des Glukosestoffwechsels charakteristisch. FGF21 nimmt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle als neuer potentiellen Biomarker für die Abschätzung des Risikos für *Diabetes mellitus* Typ 2 (T2DM) und das Metabolische Syndrom (MetS) ein. Unter Ausschluss aller Diabetiker und Personen mit MetS zu Studienbeginn untersuchten wir ob FGF21 in unserer Kohorte als prädiktiver Faktor für die Diabetes Inzidenz oder das MetS genutzt werden kann. Für unsere Kohorte konnten wir zeigen, dass Personen, die später ein MetS entwickeln, bereits zu Studienbeginn höhere FGF21-Spiegel, einen höheren BMI, WHR, Hb1Ac und diastolischen Blutdruck im Vergleich zu den Kontrollen haben. FGF21 blieb unter Berücksichtigung bekannter Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, BMI, Follow-up Zeit sowie WHR, der systolische Blutdruck, HDL-Cholesterin, Triglyzeride und die Nüchternglukose ein unabhängiger Prediktor für das MetS. Mit Vaspin konnte ein weiteres Fettgewebshormon identifiziert werden, welches das Diabetesrisiko beeinflusst. Unter Ausschluss aller Diabetiker zu Studienbeginn und den Teilnehmer der Gewichtsreduktion untersuchten wir ob auch Vaspin in unserer Kohorte als prädiktiver Faktor für die Diabetes Inzidenz genutzt werden kann. Für unsere Kohorte konnten wir zeigen, dass Personen, die später einen T2DM entwickeln, bereits zu Studienbeginn einen höheren BMI, WHR, HbA1c, systolischen Blutdruck sowie höhere Spiegel der Triglyzeride, Glukose 0min, und Glukose 120min im Vergleich zu den Kontrollen haben. Für Vaspin zeigte sich ein Trend zu höheren Spiegel. Vaspin hatte unter Berücksichtigung bekannter Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, BMI, Follow-up Zeit sowie HbA1c, Bauchumfang, Leukozyten und leichter Aktivität einen starken Effekt auf das Diabetesrisiko.

In einer Subkohorte von 60 Teilnehmern einer Intervention zur Gewichtsreduktion wurde der langfristige Effekt einer Gewichtsreduktion untersucht. Der Gewichtsverlauf aller Probanden ab Studienbeginn wurde erfragt und validiert. Der überwiegende Teil der Probanden der Intervention nahm in der ersten sechsmonatigen Phase erfolgreich ab. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Trend zur Wiedezunahme des verlorenen Gewichts über den Beobachtungszeitraum. Von besonderem Interesse war die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos über den Framingham Score. Betrachtet man dies stratifiziert nach Eigenangabe des Gewichtsverlaufs wird deutlich, dass ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse für Diejenigen mit konstant reduziertem Gewicht besteht. Ein besonders hohes Risiko haben Personen mit konstanter Wiedezunahme oder starken Gewichtsschwankungen. Insgesamt war unsere Studie viel zu klein, um eine abschließende Antwort zu diesem Thema geben zu können. Aber unsere Daten legen trotzdem nahe, dass eine dauerhaft erfolgreiche Gewichtsreduktion mit einem erniedrigten kalkulierten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist, während die Probanden, die wieder zunehmen eher sogar ein gesteigertes Risiko haben könnten.

Ein Vergleich der Inzidenzen von T2DM und MetS ergab, dass das Risiko für ein künftiges MetS für diejenigen, die im Gewicht schwanken, eher erhöht war.

Um die molekularen Mechanismen in einem einfachen Modellorganismus mit besonderem Fokus auf das Zusammenspiel von Gewichtsreduktion und Lebensspanne untersuchen zu können, untersuchten wir diese Fragestellungen im Nematoden *C.elegans*. In diesem Modell wurde der Einfluss verschiedener zeitlich restriktiver Nahrungsregimes auf die Lebensspanne untersucht. Kontinuierliche Restriktion von Nährstoffen als auch Überversorgung wirken sich jeweils lebensverlängernd bzw. -verkürzend auf die Lebensspanne von *C.elegans* aus.

Es interessierte der Einfluss eines intermittierenden Nahrungsregimes auf die Lebensspanne. Dieser regelmäßige Wechsel zwischen *ad libitum* Fütterung und Restriktion hat in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Restriktion einen unterschiedlich starken lebensverlängernden Effekt. Damit sind im Nematoden *C.elegans* Phänomene wie Gewichtswiedezunahmen nicht zu beobachten, insbesondere zeigt ein Weight-Cycling keine negativen Effekte auf die Lebensspanne. Der Effekt einer Gewichts-Wiedezunahme scheint daher auf Mechanismen zu beruhen, die phylogenetisch jünger sind und beim Nematoden *C.elegans* noch nicht vorhanden sind. Beispielhaft könnte dies das Belohnungssystem sein. Um neue Stoffwechselwege zu identifizieren, die die Lebensspanne beeinflussen, wurden Metabolitenprofile genetischer als auch diätetischer Langlebighkeitsmodelle analysiert. Diese Analysen identifizierten den Tryptophan-Stoffwechsel als einen neuen bisher so nicht im Fokus stehenden Stoffwechselweg, der mit Langlebighkeit in Verbindung steht. Die

funktionelle Bedeutung dieses Stoffwechselweges konnte durch Inhibition des Ab- und Umbaus von Tryptophan untersucht werden, auch hier zeigte sich ein lebensverlängernder Effekt im Nematodenmodell.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit mit FGF21 und Vaspin zwei neue Hormone als Prädiktoren für ein Metabolisches Syndrom bzw. *Diabetes mellitus* Typ 2 identifiziert werden. Wir konnten zeigen, dass eine zunächst erfolgreiche Gewichtsabnahme langfristig häufig mit einer Wiedezunahme an Gewicht einhergeht und dass damit metabolisch negative Veränderungen assoziiert sind. Wesentliche Schwäche der hier untersuchten humanen Studie ist die Studiengröße. Aufgrund dieser Limitation sind sicherlich keine abschließenden Bewertungen der untersuchten Zusammenhänge möglich.

Beim Nematoden *C.elegans* konnten wir zeigen, dass eine Lebensverlängerung abhängig von der Dauer und Häufigkeit der Restriktion ist. Es ist davon auszugehen, dass die Mechanismen hinter den negativen metabolischen Folgen einer Gewichtsreduktion phylogenetisch jünger sind und sich aus diesem Grund im Nematodenmodell nicht nachweisen lassen. In einer unvoreingenommenen Analyse der Metaboliten-Veränderungen in unterschiedlichen *C.elegans* Modellen konnten wir die Bedeutung des Tryptophan Stoffwechsels im Hinblick auf Langlebigkeit nachweisen.

## Summary

The accumulation of diseases attributed to obesity and sedentary lifestyle has emerged as a current problem in our society. Over time, the accompanying complications increase. Therefore, it is of utmost importance to understand the pathological mechanisms due to overweight and a lack of physical activity, as well as of the aging process and its influencing factors.

Our aim was to examine the development of metabolic diseases in a human cohort. We evaluated anthropometric data and metabolic parameters of 584 participants of the prospective MeSyBePo follow-up study with a mean follow-up of more than 5 years. We observed an increase in excess weight in the entire cohort. Likewise worsening of blood pressure and parameters of glucose metabolism was distinctive for this group. FGF21 was identified as a new potential biomarker for the evaluation of the risk of *Diabetes mellitus* type 2 and the metabolic syndrome. By exclusion of all individuals with a diagnosed *Diabetes mellitus* type 2 as well as metabolic syndrome at baseline we examined whether FGF21 would have a predictive value for the incidence of *Diabetes mellitus* type 2 or the metabolic syndrome. We could show that, compared to controls, individuals who developed a metabolic syndrome had significantly elevated FGF21 levels at baseline accompanied by higher BMI, WHR, Hb1Ac and diastolic blood pressure. FGF21 proved to be an independent predictor of the metabolic syndrome following adjustment for age, gender, follow-up time, WHR, systolic blood pressure, HDL, triglycerides and fasting blood glucose levels. Vaspin was identified as another adipokine that influenced the risk of *Diabetes mellitus* type 2. We examined whether vaspin had a predictive value for the incidence of *Diabetes mellitus* type 2 under exclusion of all diabetics at baseline and all participants with the intention to lose weight. We could show that, compared to controls, individuals who became diabetic had significantly higher BMI, WHR, HbA1c, systolic blood pressure, triglycerides, fasting plasma glucose as well as 2h glucose. Vaspin had a strong effect on the risk of *Diabetes mellitus* type 2 when adjusted for age, gender, BMI, follow-up time, Hb1Ac, waist circumference, leukocytes and light activity. In a subcohort of 60 individuals with the intention to lose weight, the long-term effects of weight loss were examined. Weight course of all 60 participants was asked and validated. The majority reduced weight successfully during the initial intervention period of 6 months. However, a distinct trend indicated weight regain over time. The evaluation of cardiovascular risk by the Framingham Risk Score for this cohort was of particular interest. Stratified by weight course, the cardiovascular risk was reduced for those with constant weight. Elevated risk was calculated for individuals with constant regain or strong weight cycling. Overall, the size of our cohort was insufficient to come to a final conclusion. Our data imply that a successful weight loss is associated with a lower estimated cardiovascular risk, while individuals who regain weight are likely to increase their estimated cardiovascular risk.

A comparison of the incident cases between groups of *Diabetes mellitus* type 2 and the metabolic syndrome showed that for those with weight cycling there was a higher risk for an incident of the metabolic syndrome.

In order to examine the molecular mechanisms in a simple organism with focus on the interaction of weight reduction and life span, we chose *C.elegans*. For this model, the influence of a scheduled fasting regime and its influence on life span was examined. Continuous restriction and oversupply of nutrients caused elongated and shortened life spans, respectively. We were interested in the effect of an intermittent fasting regime on life span. The regular switch between ad libitum feeding and restriction as a function of the number of restriction cycles caused various life prolonging effects. The phenomenon of weight regain known amongst humans could not be observed in the nematode. The effect is probably regulated via mechanisms that are phylogenetically younger and therefore not present yet in the nematode. As a speculation, the reward system could be the missing mechanism in the nematode. In order to identify new metabolic pathways that influence life span we analysed metabolic profiles of genetically and dietary longlived models. We identified tryptophan metabolism as a new, yet unknown pathway that is related to the regulation of life span. Its significance was examined via RNA interference by inhibiting the degradation and alternation of tryptophan, which resulted in an increase in life span.

In summary, we were able to identify two new hormones as predictors for the metabolic syndrome and *Diabetes mellitus* type 2 - Vaspin and FGF21. We showed that a successful weight reduction is often followed by weight regain and that this is associated with negative metabolic consequences. The limitation of our study is the small size of the cohort. Therefore a final evaluation of the examined relations is not yet possible. For the nematode *C.elegans*, we could show that the frequency of fasting periods is a life extending factor that should not be underestimated. We assume that the mechanisms behind the negative metabolic consequences of an intended weight reduction are phylogenetically younger and therefore not yet present in the nematode. In an unbiased analyses of the changes in metabolic profiles in different nematodes, we were able to prove the importance of the tryptophan pathway for longevity in the nematode.

## Literaturverzeichnis

1. WHO, *Obesity and overweight Fact sheet N°311*. 2012.
2. Low, S., M.C. Chin, and M. Deurenberg-Yap, *Review on epidemic of obesity*. Ann Acad Med Singapore, 2009. **38**(1): p. 57-9.
3. von Ruesten, A., et al., *Trend in obesity prevalence in European adult cohort populations during follow-up since 1996 and their predictions to 2015*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27455.
4. Reis, J.P., et al., *Overall obesity and abdominal adiposity as predictors of mortality in u.s. White and black adults*. Ann Epidemiol, 2009. **19**(2): p. 134-42.
5. Reis, J.P., et al., *Comparison of overall obesity and body fat distribution in predicting risk of mortality*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(6): p. 1232-9.
6. Potenza, M.V. and J.I. Mechanick, *The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology*. Nutr Clin Pract, 2009. **24**(5): p. 560-77.
7. Grundy, S.M., et al., *Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition*. Circulation, 2004. **109**(3): p. 433-8.
8. Keeseey, R.E. and M.D. Hirvonen, *Body weight set-points: determination and adjustment*. J Nutr, 1997. **127**(9): p. 1875S-1883S.
9. Sorensen, T.I., et al., *Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings*. BMJ, 1989. **298**(6666): p. 87-90.
10. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S5-S10.
11. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S81-90.
12. Langhans, W., *Metabolic and glucostatic control of feeding*. Proc Nutr Soc, 1996. **55**(1B): p. 497-515.
13. Woods, S.C. and D.A. D'Alessio, *Central control of body weight and appetite*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S37-50.
14. Muller, M.J., A. Bosy-Westphal, and S.B. Heymsfield, *Is there evidence for a set point that regulates human body weight?* F1000 Med Rep, 2010. **2**: p. 59.
15. Farias, M.M., A.M. Cuevas, and F. Rodriguez, *Set-point theory and obesity*. Metab Syndr Relat Disord, 2011. **9**(2): p. 85-9.
16. Ahima, R.S. and S.Y. Osei, *Adipokines in obesity*. Front Horm Res, 2008. **36**: p. 182-97.
17. Antuna-Puente, B., et al., *Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity*. Diabetes Metab, 2008. **34**(1): p. 2-11.
18. Kadoglou, N.P., et al., *The association of physical activity with novel adipokines in patients with type 2 diabetes*. Eur J Intern Med, 2012. **23**(2): p. 137-42.
19. Rabe, K., et al., *Adipokines and insulin resistance*. Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 741-51.
20. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism*. J Appl Physiol, 2007. **103**(3): p. 1093-8.
21. Kliewer, S.A. and D.J. Mangelsdorf, *Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(1): p. 254S-257S.
22. Itoh, N., *Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease*. Cell Tissue Res, 2010. **342**(1): p. 1-11.
23. Miyake, A., et al., *Fgf19 regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development*. Dev Biol, 2005. **288**(1): p. 259-75.
24. Kharitonov, A., et al., *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1627-35.
25. Inagaki, T., et al., *Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 415-25.

26. Bergmann, K. and G. Sypniewska, *Diabetes as a complication of adipose tissue dysfunction. Is there a role for potential new biomarkers?* Clin Chem Lab Med, 2013. **51**(1): p. 177-85.
27. Bluher, M., *Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance.* Endocrine, 2012. **41**(2): p. 176-82.
28. Huntington, J.A., *Serpin structure, function and dysfunction.* J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 26-34.
29. Law, R.H., et al., *An overview of the serpin superfamily.* Genome Biol, 2006. **7**(5): p. 216.
30. Hida, K., et al., *Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10610-5.
31. Guilherme, A., et al., *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 367-77.
32. Hotamisligil, G.S., *Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1999. **107**(2): p. 119-25.
33. Bays, H.E., *"Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis.* Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S26-37.
34. Bluher, M., *The inflammatory process of adipose tissue.* Pediatr Endocrinol Rev, 2008. **6**(1): p. 24-31.
35. Bluher, M., *Adipose tissue dysfunction in obesity.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(6): p. 241-50.
36. Wada, J., *[Vaspin and insulin resistance].* Rinsho Byori, 2008. **56**(8): p. 705-11.
37. Kloting, N., et al., *Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 430-6.
38. Youn, B.S., et al., *Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes.* Diabetes, 2008. **57**(2): p. 372-7.
39. Hauner, H., *Adipositas-Leitlinie.* 2007.
40. Dansinger, M.L., et al., *Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight loss and heart disease risk reduction: a randomized trial.* JAMA, 2005. **293**(1): p. 43-53.
41. Scholz, G.H., et al., *[Proper Weight Loss with Intelligence (MIRA). 2 programs for weight reduction in general practice trial].* MMW Fortschr Med, 2002. **144**(40): p. 28-32.
42. Dobe, M., et al., *[The Obeldicks concept. An example for a successful outpatient lifestyle intervention for overweight or obese children and adolescents].* Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2011. **54**(5): p. 628-35.
43. Schaefer, A., et al., *An effective lifestyle intervention in overweight children: one-year follow-up after the randomized controlled trial on "Obeldicks light".* Clin Nutr, 2011. **30**(5): p. 629-33.
44. Hauner, H., *ambulante Gewichtsreduktionsprogramme,* in *Ernährungsumschau.* 2010, DGE.
45. Ahern, A.L., et al., *Weight Watchers on prescription: an observational study of weight change among adults referred to Weight Watchers by the NHS.* BMC Public Health, 2011. **11**: p. 434.
46. Berg, A., et al., *Exercise based lifestyle intervention in obese adults: results of the intervention study m.o.B.I.L.I.s.* Dtsch Arztebl Int, 2008. **105**(11): p. 197-203.
47. Du, H. and E. Feskens, *Dietary determinants of obesity.* Acta Cardiol, 2010. **65**(4): p. 377-86.
48. Anderson, R.M., D. Shanmuganayagam, and R. Weindruch, *Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys.* Toxicol Pathol, 2009. **37**(1): p. 47-51.
49. Fontana, L., L. Partridge, and V.D. Longo, *Extending healthy life span--from yeast to humans.* Science, 2010. **328**(5976): p. 321-6.
50. Ristow, M. and S. Schmeisser, *Extending life span by increasing oxidative stress.* Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 327-36.
51. Calabrese, V., et al., *Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity.* Mol Aspects Med, 2011. **32**(4-6): p. 279-304.
52. Cruzen, C. and R.J. Colman, *Effects of caloric restriction on cardiovascular aging in non-human primates and humans.* Clin Geriatr Med, 2009. **25**(4): p. 733-43, ix-x.

53. Lowe, M.R., K. Miller-Kovach, and S. Phelan, *Weight-loss maintenance in overweight individuals one to five years following successful completion of a commercial weight loss program*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. **25**(3): p. 325-31.
54. Sacks, F.M., et al., *Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(9): p. 859-73.
55. Nguyen, N., et al., *A review of unmet needs in obesity management*. *Obes Surg*, 2012. **22**(6): p. 956-66.
56. Stalonas, P.M., M.G. Perri, and A.B. Kerzner, *Do behavioral treatments of obesity last? A five-year follow-up investigation*. *Addict Behav*, 1984. **9**(2): p. 175-83.
57. Sorensen, T.I., et al., *Intention to lose weight, weight changes, and 18-y mortality in overweight individuals without co-morbidities*. *PLoS Med*, 2005. **2**(6): p. e171.
58. Sjostrom, L., *Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery*. *J Intern Med*, 2013. **273**(3): p. 219-34.
59. Pedersen, S.D., *The Role of Hormonal Factors in Weight Loss and Recidivism after Bariatric Surgery*. *Gastroenterol Res Pract*, 2013. **2013**: p. 528450.
60. Obesity, S.S.G.f.M., *Richtlinien zur operativen Behandlung von Übergewicht*. 2010.
61. O'Brien, P.E., et al., *Long-term outcomes after bariatric surgery: fifteen-year follow-up of adjustable gastric banding and a systematic review of the bariatric surgical literature*. *Ann Surg*, 2013. **257**(1): p. 87-94.
62. Hutter, M.M., et al., *First report from the American College of Surgeons Bariatric Surgery Center Network: laparoscopic sleeve gastrectomy has morbidity and effectiveness positioned between the band and the bypass*. *Ann Surg*, 2011. **254**(3): p. 410-20; discussion 420-2.
63. Heneghan, H.M., et al., *Effect of bariatric surgery on cardiovascular risk profile*. *Am J Cardiol*, 2011. **108**(10): p. 1499-507.
64. Ricci, C., et al., *Early Impact of Bariatric Surgery on Type II Diabetes, Hypertension, and Hyperlipidemia: A Systematic Review, Meta-Analysis and Meta-Regression on 6,587 Patients*. *Obes Surg*, 2013.
65. Sjostrom, L., et al., *Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(7): p. 653-62.
66. Neovius, M., et al., *Health care use during 20 years following bariatric surgery*. *JAMA*, 2012. **308**(11): p. 1132-41.
67. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. *Circulation*, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
68. Assmann, G., P. Cullen, and H. Schulte, *Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study*. *Circulation*, 2002. **105**(3): p. 310-5.
69. Expert Panel on Detection, E. and A. *Treatment of High Blood Cholesterol in, Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. *JAMA*, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
70. Alberti, K.G., et al., *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. *Lancet*, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
71. Schulze, M.B., et al., *An accurate risk score based on anthropometric, dietary, and lifestyle factors to predict the development of type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(3): p. 510-5.
72. Nakade, M., et al., *Behavioral change during weight loss program and one-year follow-up: Saku Control Obesity Program (SCOP) in Japan*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2012. **21**(1): p. 22-34.
73. Stehr, M.D. and T. von Lengerke, *Preventing weight gain through exercise and physical activity in the elderly: a systematic review*. *Maturitas*, 2012. **72**(1): p. 13-22.
74. Wixon, J., et al., *Caenorhabditis elegans*. *Yeast*, 2000. **17**(1): p. 37-42.

75. Williams, M.J., et al., *What model organisms and interactomics can reveal about the genetics of human obesity*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(22): p. 3819-34.
76. Zheng, J. and F.L. Greenway, *Caenorhabditis elegans as a model for obesity research*. Int J Obes (Lond), 2012. **36**(2): p. 186-94.
77. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
78. Brenner, S., *In the beginning was the worm*. Genetics, 2009. **182**(2): p. 413-5.
79. Emmons, S.W., *Mechanisms of C. elegans development*. Cell, 1987. **51**(6): p. 881-3.
80. Olsen, A., M.C. Vantipalli, and G.J. Lithgow, *Using Caenorhabditis elegans as a model for aging and age-related diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1067**: p. 120-8.
81. Kaletsky, R. and C.T. Murphy, *The role of insulin/IGF-like signaling in C. elegans longevity and aging*. Dis Model Mech, 2010. **3**(7-8): p. 415-9.
82. Byerly, L., R.C. Cassada, and R.L. Russell, *The life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans. I. Wild-type growth and reproduction*. Dev Biol, 1976. **51**(1): p. 23-33.
83. Hirsh, D., D. Oppenheim, and M. Klass, *Development of the reproductive system of Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1976. **49**(1): p. 200-19.
84. Chalfie, M., *Caenorhabditis elegans development*. Curr Opin Cell Biol, 1989. **1**(6): p. 1122-6.
85. Rankin, C.H., *Nematode behavior: the taste of success, the smell of danger!* Curr Biol, 2006. **16**(3): p. R89-91.
86. Shtonda, B.B. and L. Avery, *Dietary choice behavior in Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 1): p. 89-102.
87. Greer, E.L., et al., *An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in C. elegans*. Curr Biol, 2007. **17**(19): p. 1646-56.
88. Kenyon, C.J., *The genetics of ageing*. Nature, 2010. **464**(7288): p. 504-12.
89. Hansen, M., et al., *Lifespan extension by conditions that inhibit translation in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2007. **6**(1): p. 95-110.
90. Houthoofd, K., et al., *Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2002. **37**(12): p. 1371-8.
91. Kaeberlein, T.L., et al., *Lifespan extension in Caenorhabditis elegans by complete removal of food*. Aging Cell, 2006. **5**(6): p. 487-94.
92. Lee, G.D., et al., *Dietary deprivation extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2006. **5**(6): p. 515-24.
93. Houthoofd, K., et al., *No reduction of metabolic rate in food restricted Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2002. **37**(12): p. 1359-69.
94. Lakowski, B. and S. Hekimi, *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13091-6.
95. Panowski, S.H., et al., *PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of C. elegans*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 550-5.
96. Bishop, N.A. and L. Guarente, *Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in C. elegans*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 545-9.
97. Houthoofd, K., et al., *Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol, 2003. **38**(9): p. 947-54.
98. Klass, M.R., *Aging in the nematode Caenorhabditis elegans: major biological and environmental factors influencing life span*. Mech Ageing Dev, 1977. **6**(6): p. 413-29.
99. Bass, T.M., et al., *Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(10): p. 546-52.
100. Gruber, J., S.Y. Tang, and B. Halliwell, *Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of Caenorhabditis elegans*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 530-42.
101. Viswanathan, M., et al., *A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining C. elegans life span*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 605-15.

102. Jia, K., D. Chen, and D.L. Riddle, *The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span*. Development, 2004. **131**(16): p. 3897-906.
103. Apfeld, J., et al., *The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3004-9.
104. Hobert, O., *Behavioral plasticity in C. elegans: paradigms, circuits, genes*. J Neurobiol, 2003. **54**(1): p. 203-23.
105. Perry, C.J. and A.B. Barron, *Neural Mechanisms of Reward in Insects*. Annu Rev Entomol, 2012.
106. Fischer, A., *Einfluss genetischer Variationen auf die Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen* 2008, Universität Potsdam.
107. Matsui, H., et al., *MB fraction of cumulative creatine kinase correlates with insulin secretion in patients with acute myocardial infarction: insulin as a possible determinant of myocardial MB creatine kinase*. Am Heart J, 1996. **131**(1): p. 24-31.
108. Huang, X.H., et al., *Relationship of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism to glucose intolerance, insulin resistance, and hypertension in NIDDM*. Hum Genet, 1998. **102**(3): p. 372-8.
109. Reaven, G.M., et al., *Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals*. Diabetes, 1993. **42**(9): p. 1324-32.
110. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
111. Wallace, T.M., J.C. Levy, and D.R. Matthews, *Use and abuse of HOMA modeling*. Diabetes Care, 2004. **27**(6): p. 1487-95.
112. Stiernagle, T., *Maintenance of C. elegans*. WormBook, 2006: p. 1-11.
113. Houthoofd, K., et al., *DAF-2 pathway mutations and food restriction in aging Caenorhabditis elegans differentially affect metabolism*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(5): p. 689-96.
114. Wang, J. and M.M. Barr, *RNA interference in Caenorhabditis elegans*. Methods Enzymol, 2005. **392**: p. 36-55.
115. Simmer, F., et al., *Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes C. elegans hypersensitive to RNAi*. Curr Biol, 2002. **12**(15): p. 1317-9.
116. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
117. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
118. Tabara, H., A. Grishok, and C.C. Mello, *RNAi in C. elegans: soaking in the genome sequence*. Science, 1998. **282**(5388): p. 430-1.
119. Tavernarakis, N., et al., *Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 180-3.
120. Kamath, R.S., et al., *Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Genome Biol, 2001. **2**(1): p. RESEARCH0002.
121. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
122. Timmons, L. and A. Fire, *Specific interference by ingested dsRNA*. Nature, 1998. **395**(6705): p. 854.
123. Chen, W.W., et al., *Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008. **116**(1): p. 65-8.
124. Schienkiewitz, A., et al., *Body mass index history and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(2): p. 427-33.

125. Steffen, A., et al., *Development and validation of a risk score predicting substantial weight gain over 5 years in middle-aged European men and women*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e67429.
126. Strasser, B., *Physical activity in obesity and metabolic syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1281**: p. 141-59.
127. Swinburn, B., G. Sacks, and E. Ravussin, *Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(6): p. 1453-6.
128. Heidemann, C., et al., *[Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 668-77.
129. Riboli, E., *The role of metabolic carcinogenesis in cancer causation and prevention: evidence from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Cancer Treat Res, 2014. **159**: p. 3-20.
130. Gonzalez, C.A. and E. Riboli, *Diet and cancer prevention: where we are, where we are going*. Nutr Cancer, 2006. **56**(2): p. 225-31.
131. Rathmann, W., et al., *Incidence of Type 2 diabetes in the elderly German population and the effect of clinical and lifestyle risk factors: KORA S4/F4 cohort study*. Diabet Med, 2009. **26**(12): p. 1212-9.
132. Narayan, K.M., et al., *Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden: U.S., 2005-2050*. Diabetes Care, 2006. **29**(9): p. 2114-6.
133. Zhang, X., et al., *Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1246-53.
134. An, S.Y., et al., *Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **96**(2): p. 196-203.
135. Li, H., J. Zhang, and W. Jia, *Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology*. Front Med, 2013. **7**(1): p. 25-30.
136. Dostalova, I., D. Haluzikova, and M. Haluzik, *Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator with potential therapeutic properties in obesity/type 2 diabetes mellitus*. Physiol Res, 2009. **58**(1): p. 1-7.
137. Mai, K., et al., *Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing fibroblast growth factor-21*. Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1532-8.
138. Mai, K., et al., *Physiological modulation of circulating FGF21: relevance of free fatty acids and insulin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(1): p. E126-30.
139. Coskun, T., et al., *Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice*. Endocrinology, 2008. **149**(12): p. 6018-27.
140. Badman, M.K., et al., *A very low carbohydrate ketogenic diet improves glucose tolerance in ob/ob mice independently of weight loss*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(5): p. E1197-204.
141. Fisher, F.M., et al., *Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2781-9.
142. Li, H., et al., *Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride*. J Hepatol, 2010. **53**(5): p. 934-40.
143. Seeger, J., et al., *Serum levels of the adipokine vaspin in relation to metabolic and renal parameters*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(1): p. 247-51.
144. Korner, A., et al., *Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children*. Int J Obes (Lond), 2011. **35**(4): p. 578-86.
145. Tan, B.K., et al., *Metformin decreases the adipokine vaspin in overweight women with polycystic ovary syndrome concomitant with improvement in insulin sensitivity and a decrease in insulin resistance*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1501-7.
146. Jian, W., et al., *Role of serum vaspin in progression of type 2 diabetes: a 2-year cohort study*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94763.

147. Esteghamati, A., et al., *Association of vaspin with metabolic syndrome: the pivotal role of insulin resistance*. *Diabetes Metab J*, 2014. **38**(2): p. 143-9.
148. Genc, H., et al., *Circulating vaspin and its relationship with insulin sensitivity, adiponectin, and liver histology in subjects with non-alcoholic steatohepatitis*. *Scand J Gastroenterol*, 2011. **46**(11): p. 1355-61.
149. von Loeffelholz, C., et al., *Circulating vaspin is unrelated to insulin sensitivity in a cohort of nondiabetic humans*. *Eur J Endocrinol*, 2010. **162**(3): p. 507-13.
150. Heiker, J.T., *Vaspin (serpinA12) in obesity, insulin resistance, and inflammation*. *J Pept Sci*, 2014. **20**(5): p. 299-306.
151. Wing, R.R., et al., *Intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(24): p. 2358-9.
152. Wang, X., et al., *Weight regain is related to decreases in physical activity during weight loss*. *Med Sci Sports Exerc*, 2008. **40**(10): p. 1781-8.
153. Nicklas, B.J., et al., *Lifestyle intervention of hypocaloric dieting and walking reduces abdominal obesity and improves coronary heart disease risk factors in obese, postmenopausal, African-American and Caucasian women*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003. **58**(2): p. 181-9.
154. Makris, A. and G.D. Foster, *Dietary approaches to the treatment of obesity*. *Psychiatr Clin North Am*, 2011. **34**(4): p. 813-27.
155. Jakicic, J.M. and K.K. Davis, *Obesity and physical activity*. *Psychiatr Clin North Am*, 2011. **34**(4): p. 829-40.
156. Gosselin, C. and G. Cote, *Weight loss maintenance in women two to eleven years after participating in a commercial program: a survey*. *BMC Womens Health*, 2001. **1**: p. 2.
157. Lowe, M.R., T.V. Kral, and K. Miller-Kovach, *Weight-loss maintenance 1, 2 and 5 years after successful completion of a weight-loss programme*. *Br J Nutr*, 2008. **99**(4): p. 925-30.
158. Kohl, L.F., R. Crutzen, and N.K. de Vries, *Online prevention aimed at lifestyle behaviors: a systematic review of reviews*. *J Med Internet Res*, 2013. **15**(7): p. e146.
159. Collins, C.E., et al., *A 12-week commercial web-based weight-loss program for overweight and obese adults: randomized controlled trial comparing basic versus enhanced features*. *J Med Internet Res*, 2012. **14**(2): p. e57.
160. Stunkard, A.J. and S.B. Penick, *Behavior modification in the treatment of obesity. The problem of maintaining weight loss*. *Arch Gen Psychiatry*, 1979. **36**(7): p. 801-6.
161. *Methods for voluntary weight loss and control. NIH Technology Assessment Conference Panel. Consensus Development Conference, 30 March to 1 April 1992*. *Ann Intern Med*, 1993. **119**(7 Pt 2): p. 764-70.
162. Wing, R.R. and S. Phelan, *Long-term weight loss maintenance*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **82**(1 Suppl): p. 222S-225S.
163. Lemmens, V.E., et al., *A systematic review of the evidence regarding efficacy of obesity prevention interventions among adults*. *Obes Rev*, 2008. **9**(5): p. 446-55.
164. Wing, R.R., et al., *Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(7): p. 1481-6.
165. Look, A.R.G., et al., *Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(2): p. 145-54.
166. Look, A.R.G. and R.R. Wing, *Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: four-year results of the Look AHEAD trial*. *Arch Intern Med*, 2010. **170**(17): p. 1566-75.
167. Field, A.E., et al., *Weight cycling, weight gain, and risk of hypertension in women*. *Am J Epidemiol*, 1999. **150**(6): p. 573-9.
168. Field, A.E., S. Malspeis, and W.C. Willett, *Weight cycling and mortality among middle-aged or older women*. *Arch Intern Med*, 2009. **169**(9): p. 881-6.
169. Stevens, V.L., et al., *Weight cycling and mortality in a large prospective US study*. *Am J Epidemiol*, 2012. **175**(8): p. 785-92.

170. Stefanska, A., et al., *Long-term weight gain and metabolic syndrome, adiponectin and C-reactive protein in women aged 50-60 years*. *Adv Med Sci*, 2010. **55**(2): p. 186-90.
171. Pincus, Z. and F.J. Slack, *Developmental biomarkers of aging in Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn*, 2010. **239**(5): p. 1306-14.
172. Lenaerts, I., et al., *Dietary restriction of Caenorhabditis elegans by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008. **63**(3): p. 242-52.
173. Greer, E.L. and A. Brunet, *Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in C. elegans*. *Aging Cell*, 2009. **8**(2): p. 113-27.
174. Honjoh, S., et al., *Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in C. elegans*. *Nature*, 2009. **457**(7230): p. 726-30.
175. Anson, R.M., B. Jones, and R. de Cabod, *The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding*. *Age (Dordr)*, 2005. **27**(1): p. 17-25.
176. Berridge, K.C. and M.L. Kringelbach, *Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008. **199**(3): p. 457-80.
177. Kwon, E.S., et al., *A new DAF-16 isoform regulates longevity*. *Nature*, 2010. **466**(7305): p. 498-502.
178. Kenyon, C., et al., *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. *Nature*, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
179. Fuchs, S., et al., *A metabolic signature of long life in Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol*, 2010. **8**: p. 14.
180. Martin, F.P., et al., *Metabotyping of Caenorhabditis elegans and their culture media revealed unique metabolic phenotypes associated to amino acid deficiency and insulin-like signaling*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(3): p. 990-1003.
181. Swire, J., et al., *The cellular geometry of growth drives the amino acid economy of Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci*, 2009. **276**(1668): p. 2747-54.
182. Sze, J.Y., et al., *Food and metabolic signalling defects in a Caenorhabditis elegans serotonin-synthesis mutant*. *Nature*, 2000. **403**(6769): p. 560-4.
183. Leibowitz, S.F. and J.T. Alexander, *Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight*. *Biol Psychiatry*, 1998. **44**(9): p. 851-64.
184. Haahr, M.E., et al., *Obesity is associated with high serotonin 4 receptor availability in the brain reward circuitry*. *Neuroimage*, 2012. **61**(4): p. 884-8.
185. Gems, D. and L. Partridge, *Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(3): p. 287-92.
186. Butler, J.A., et al., *Long-lived mitochondrial (Mit) mutants of Caenorhabditis elegans utilize a novel metabolism*. *FASEB J*, 2010. **24**(12): p. 4977-88.
187. Newgard, C.B., et al., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*. *Cell Metab*, 2009. **9**(4): p. 311-26.
188. Huffman, K.M., et al., *Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(9): p. 1678-83.
189. Barzilai, N., et al., *The critical role of metabolic pathways in aging*. *Diabetes*, 2012. **61**(6): p. 1315-22.

## Anhang

**A1 Parameterverteilung der Kohorte (Vaspin)** zu Studienbeginn sowie für alle Fälle mit späterer gestörter Glukosetoleranz, Daten angegeben als Anzahl n oder MW  $\pm$  Stabw Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur  $p \leq 0,0003$

Parameter	Kontrollen	Gestörte	p- Wert
	<b>Glukosetoleranz</b>		
Geschlecht (m/w)	99/223	21/29	
Alter (J)	54,9 $\pm$ 11,4	57,0 $\pm$ 9,21	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,9 $\pm$ 5,4	28,5 $\pm$ 5,4	n.s.
WHR	0,88 $\pm$ 0,115	0,92 $\pm$ 0,149	$\leq 0,001$
Gesamt Cholesterin (mmol/l)	5,60 $\pm$ 1,0	5,65 $\pm$ 0,9	n.s.
LDL -Cholesterin (mmol/l)	3,52 $\pm$ 0,9	3,54 $\pm$ 0,8	n.s.
HDL-Cholesterin (mmol/l)	1,46 $\pm$ 0,4	1,41 $\pm$ 0,3	0,033
Triglyzeride (mmol/l)	1,36 $\pm$ 0,7	1,50 $\pm$ 0,7	0,003
Glukose 0 min (mg/dl)	90,7 $\pm$ 12,1	90,4 $\pm$ 10,7	n.s.
Glukose 120 min (mg/dl)	109,3 $\pm$ 31,4	112,4 $\pm$ 20,4	$\leq 0,001$
HbA1c (%)	5,4 $\pm$ 0,50	5,4 $\pm$ 0,44	0,008
Systole (mmHg)	124 $\pm$ 17	127 $\pm$ 17	0,016
Diastole (mmHg)	77 $\pm$ 9	79 $\pm$ 9	0,001
Vaspin (pg/ml)	1,2 $\pm$ 1,22	1,1 $\pm$ 1,3	n.s.

## A 2 Life Span Assays N2 n1-n4, Deskriptive Statistik

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
N2 restrikt	25,46 ± 0,811	1		0,000	0,000	0,000	0,073	0,000
N2 ad libitum	10,27 ± 0,530	1			0,032	0,001	0,000	0,000
1xDR	19,03 ± 0,626	1				0,018	0,000	0,000
2xDR	21,05 ± 0,807	1					0,011	0,366
3xDR	23,85 ± 0,611	1						0,000
4xDR	21,33 ± 0,470	1						

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
N2 restrikt	25,74 ± 0,684	1		0,001	0,001	0,051	0,700	0,005
N2 ad libitum	22,67 ± 0,657	1			0,971	0,000	0,000	0,000
1xDR	22,83 ± 0,613	1				0,000	0,000	0,000
2xDR	28,03 ± 0,582	1					0,041	0,927
3xDR	26,73 ± 0,430	1						0,011
4xDR	28,68 ± 0,485	1						

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
N2 restrikt	29,77 ± 0,739	1		0,000	0,000	0,000	0,001	0,079
N2 ad libitum	23,40 ± 0,596	1			0,000	0,002	0,000	0,000
1xDR	21,66 ± 0,353	1				0,000	0,000	0,000
2xDR	25,24 ± 0,698	1					0,426	0,143
3xDR	26,51 ± 0,601	1						0,285
4xDR	28,28 ± 0,649	1						

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
N2 restrikt	29,16 ± 0,691	1		0,000	0,000	0,000	0,000	0,441
N2 ad libitum	20,27 ± 0,561	1			0,000	0,000	0,000	0,000
1xDR	24,07 ± 0,548	1				0,000	0,000	0,000
2xDR	18,63 ± 0,287	1					0,509	0,000
3xDR	17,67 ± 0,274	1						0,000
4xDR	28,52 ± 0,682	1						

### A 3 Life Span Assays CB1370 n1-n4, Deskriptive Statistik

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CB1370 restrikt	43,77 ± 1,074	1		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CB1370 ad libitum	32,02 ± 1,067	1			0,111	0,220	0,012	0,057
1xDR	33,70 ± 1,235	1				0,445	0,563	0,841
2xDR	35,98 ± 0,761	1					0,136	0,693
3xDR	37,44 ± 0,830	1						0,244
4xDR	36,77 ± 0,660	1						

Stamm	MW ± SEM	n	restrict	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CB1370 restrikt	38,44 ± 1,308	1		0,001	0,113	0,000	0,003	0,002
CB1370 ad libitum	37,18 ± 0,959	1			0,055	0,230	0,695	0,525
1xDR	37,50 ± 1,186	1				0,015	0,126	0,068
2xDR	29,85 ± 1,567	1					0,215	0,191
3xDR	35,73 ± 1,178	1						0,638
4xDR	36,71 ± 1,009	1						

Stamm	MW ± SEM	n	restrict	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CB1370 restrikt	45,17 ± 1,445	1		0,000	0,001	0,000	0,000	0,013
CB1370 ad libitum	34,04 ± 1,009	1			0,000	0,000	0,000	0,000
1xDR	38,56 ± 1,349	1				0,455	0,673	0,604
2xDR	40,25 ± 0,909	1					0,697	0,308
3xDR	40,28 ± 0,908	1						0,346
4xDR	40,63 ± 1,282	1						

Stamm	MW ± SEM	n	restrict	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CB1370 restrikt	40,98 ± 0,965	1		0,000	0,034	0,001	0,000	0,070
CB1370 ad libitum	35,58 ± 0,867	1			0,030	0,402	0,172	0,010
1xDR	38,38 ± 0,910	1				0,203	0,326	0,608
2xDR	37,21 ± 0,794	1					0,486	0,091
3xDR	38,12 ± 0,658	1						0,199
4xDR	39,09 ± 0,850	1						

#### A 4 Life Span Assays CF1038 n1-n4, Deskriptive Statistik

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CF1038 restrict	22,98 ± 0,434	1		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CF1038 ad libitum	18,26 ± 0,254	1			0,000	0,000	0,000	0,000
1xDR	20,14 ± 0,253	1				0,098	0,188	0,002
2xDR	20,17 ± 0,434	1					0,608	0,169
3xDR	20,51 ± 0,306	1						0,063
4xDR	20,77 ± 0,474	1						

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CF1038 restrict	22,86 ± 0,434	1		0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
CF1038 ad libitum	16,75 ± 0,368	1			0,000	0,000	0,000	0,000
1xDR	20,44 ± 0,311	1				0,809	0,906	0,019
2xDR	20,27 ± 0,351	1					0,918	0,017
3xDR	20,22 ± 0,405	1						0,024
4xDR	21,16 ± 0,445	1						

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CF1038 restrict	22,73 ± 0,431	1		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CF1038 ad libitum	18,84 ± 0,290	1			0,000	0,794	0,002	0,130
1xDR	15,96 ± 0,343	1				0,000	0,009	0,001
2xDR	18,80 ± 0,289	1					0,001	0,113
3xDR	17,59 ± 0,263	1						0,374
4xDR	17,84 ± 0,375	1						

Stamm	MW ± SEM	n	p-Wert	ad libitum	1xDR	2xDR	3xDR	4xDR
CF1038 restrict	22,73 ± 0,599	1		0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
CF1038 ad libitum	18,94 ± 0,326	1			0,159	0,009	0,000	0,013
1xDR	18,53 ± 0,274	1				0,001	0,000	0,189
2xDR	20,05 ± 0,422	1					0,113	0,000
3xDR	20,81 ± 0,446	1						0,000
4xDR	17,21 ± 0,444	1						



# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Franziska Schwarz

## **Lebenslauf**

Diese Seite enthielt persönliche Daten und ist aus diesem Grund nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

## Publikationen

Fibroblast Growth Factor 21 Predicts the Metabolic Syndrome and Diabetes Type 2 Mellitus in Caucasians.

Bobbert T, Schwarz F, Fischer-Rosinsky A, Pfeiffer AF, Möhlig M, Mai K, Spranger J.  
Diabetes Care. 2012 Aug

A distinct metabolic signature predicts development of fasting plasma glucose.

Hische M, Larhlimi A, Schwarz F, Fischer-Rosinsky A, Bobbert T, Assmann A, Catchpole GS, Pfeiffer AF, Willmitzer L, Selbig J, Spranger J.  
J Clin Bioinforma. 2012 Feb

Relation between fibroblast growth factor-21, adiposity, metabolism, and weight reduction.

Mai K, Schwarz F, Bobbert T, Andres J, Assmann A, Pfeiffer AF, Spranger J,  
Metabolism, 2011 Feb

Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness.

Bobbert T, Raila J, Schwarz F, Mai K, Henze A, Pfeiffer AF, Schweigert FJ, Spranger J,  
Atherosclerosis, 2010 Dec;

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Spranger für die Vergabe des Themas und für die Anregungen bei der Gestaltung der Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Antje Fischer-Rosinský für die Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit, sowie allen Kollegen und Freunden der Arbeitsgruppe und Nachbarlabore.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg stets unterstützt hat.