

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Klinische Ernährung

Genetische und metabolische Regulation von Adiponectin:

Resultate von *in vitro* und humanen *in vivo* Studien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungswissenschaft“

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

vorgelegt von

Uta Elke Wegewitz

Potsdam, August 2007

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1606/>
[urn:nbn:de:kobv:517-opus-16062](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-16062)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-16062>]

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Spranger für die engagierte und motivierende Betreuung der Dissertation danken, durch die das Gelingen dieser Arbeit erst möglich wurde. Herrn Prof. Dr. Andreas F.H. Pfeiffer danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung Klinische Ernährung am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) in Potsdam-Rehbrücke promovieren zu können, sowie für die Organisation von Ausflügen und Feiern, die den Zusammenhalt der Abteilung gestärkt haben. Ebenfalls gedankt werden soll an dieser Stelle Prof. Dr. Pablo Steinberg für seine Bereitschaft, die Leitung dieser Promotion zu übernehmen und als Gutachter zu fungieren.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Joachim Spranger, namentlich Dr. Thomas Bobbert, Isabel Göhring, Antje Fischer, Nadine Huckauf, Andrea Stempel, André Kutz, Rita Schüler, Anke Aßmann und Janin Andres möchte ich für die gute und vor allem problemlose Zusammenarbeit danken, für fachliche und private Gespräche sowie für Hilfestellungen jeder Art.

Mein großer Dank gilt ebenfalls meinen „mitstreitenden“ Promovendinnen, Bürogewinnenden und Freundinnen Doreen Kuhlow und Susanne Heuer, die viel Spaß und Freude in den Berufsalltag transportieren konnten und wie ich die Herausforderung angenommen haben, in der Promotionszeit eine Familie zu gründen.

Nicht minder zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. Martin Osterhoff, der mich im Labor angeleitet und dabei immer ein offenes Ohr für Fragen jeder Art hatte, sowie Herrn Dr. Matthias Möhlig, Herrn Dr. Martin Weickert und Herrn Prof. Dr. Michael Ristow für hilfreiche Denkanstöße. Zusätzlich danke ich Kathrin Sprengel, Susann Richter und Andrea Ziegenhorn für die tagtäglichen Erleichterungen im Labor, und besonders Beate Jahn für die perfekte und liebevolle organisatorische Unterstützung im Promotionsalltag. Nicht zuletzt sei den Stoffwechselambulanzen sowohl am DIfE (Abteilung Klinische Ernährung) als auch am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin) sowie allen beteiligten technischen Mitarbeitern gedankt, da sie die Humanstudien betreuen und die klinischen Daten erheben haben.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt meinem Ehemann Dr. Hagen Wegewitz, der mich in allen Lebenslagen unterstützt hat und mir besonders in der Promotionszeit immer wieder Kraft und Mut gab. Weiterhin bin ich dankbar, zwei so gesunde und unkomplizierte Töchter zu haben, die für mich jeden Tag auf's neue ein unerschöpflicher Quell der Freude sind. Weiterhin haben meine Eltern und Schwiegereltern wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, indem sie bei Betreuungsnotständen, und natürlich auch darüber hinaus, stets für die Kinder da waren.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus.....	1
1.2 Charakterisierung des Adipokins Adiponectin	3
1.2.1 Struktur und Rezeptoren des Adiponectins.....	3
1.2.2 Charakteristika des Adiponectingens	6
1.2.3 Metabolische Wirkungen von Adiponectin	7
1.3 Adiponectin und Glukosemetabolismus.....	8
1.3.1 Adiponectin und Insulinsensitivität.....	8
1.3.2 Adiponectin als Risikomarker für Typ-2-Diabetes mellitus	10
1.3.3 Adiponectin und das Polyzystische Ovarsyndrom	10
1.4 Ziele der Arbeit	12
2 Studienkollektive, Methoden und Materialien.....	13
2.1 Studienkollektive	13
2.1.1 Querschnittsstudie MeSyBePo	13
2.1.1.1 Beschreibung der Studienkohorte.....	13
2.1.1.2 Phänotypisierung	13
2.1.1.3 Bestimmung der Laborparameter.....	16
2.1.1.4 Diagnostik der Polymorphismen im Adiponectinpromotor.....	16
2.1.2 PCOS Fall-Kontroll-Studie.....	17
2.1.2.1 Charakterisierung der Studienkohorte.....	17
2.1.2.2 Bestimmung der Laborparameter.....	17
2.1.3 Interventionsstudie Insulin und Oligomere.....	18
2.1.3.1 Charakterisierung der Probanden.....	18
2.1.3.2 Bestimmung der Laborparameter.....	18
2.1.4 Interventionsstudie Gewichtsreduktion	18
2.1.4.1 Charakterisierung der Probanden.....	18
2.1.4.2 Ernährungsintervention	18
2.1.4.3 Bestimmung der Laborparameter.....	19
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Allgemeine DNA-Grundtechniken	19
2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	20
2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	20

2.2.1.4	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol­fällung	20
2.2.2	Isolierung von DNA	21
2.2.2.1	Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA	21
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA für die Transfektion.....	21
2.2.3	Herstellung von rekombinanter DNA	22
2.2.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	22
2.2.3.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	23
2.2.3.3	Dephosphorylierung der DNA mit alkalischer Phosphatase	23
2.2.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.2.3.5	Transformation von kompetenten Bakterien.....	24
2.2.3.6	Isolierung von Klonen mit rekombinantem Plasmid	24
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.2.5	DNA-Sequenzierung nach Sanger	25
2.2.6	Expressionsstudien <i>in vitro</i>	26
2.2.6.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	26
2.2.6.2	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	27
2.2.6.3	Stimulation von HEK-Zellen	27
2.2.6.4	Dualer Luziferase-Assay	28
2.2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.2.7.1	Western Blot	29
2.2.7.2	Immunblot	30
2.2.7.3	Kompetitionsassay	31
2.2.7.4	Auswertung.....	31
2.2.8	Statistische Auswertung.....	32
2.3	Materialien	33
2.3.1	Bakterienstämme, Zelllinien und Medien	33
2.3.2	Primer, Vektoren, Plasmide	33
2.3.3	Enzyme, Antikörper, Längenstandards.....	34
2.3.4	Kommerzielle Reaktionssysteme	35
2.3.5	Chemikalien und Biochemikalien.....	35
2.3.6	Standardpuffer und -lösungen	37
2.3.7	Laborgeräte	37
2.3.8	Molekularbiologische Hilfsmittel / Verbrauchsmaterialien.....	38
2.3.9	Software.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Charakterisierung der MeSyBePo-Kohorte.....	40
3.2	Genetische Faktoren	42
3.2.1	Promotorpolymorphismen im Adiponectingen im MeSyBePo-Kollektiv ..	42
3.2.1.1	Promotorpolymorphismus -11377	42
3.2.1.2	Promotorpolymorphismus -11391	43

3.2.2	Einfluß der Promotorpolymorphismen auf den Adiponectinspiegel	44
3.2.2.1	Promotoraktivität des Adiponectins <i>in vitro</i>	45
3.2.2.1.1	Klonierung der Adiponectinpromotor-Konstrukte.....	45
3.2.2.1.2	Messung der Promotoraktivität im Luziferase-Assay	48
3.2.2.2	Promotoraktivität des Adiponectins <i>in vivo</i>	49
3.3	Metabolische Faktoren	52
3.3.1	Promotoraktivität <i>in vitro</i>	52
3.3.2	Metabolische Faktoren in der Querschnittsstudie MeSyBePo.....	55
3.3.3	Interventionsstudie Insulin.....	56
3.3.4	PCOS Fall-Kontroll-Studie	57
3.4	Adiponectin-Oligomere	62
3.4.1	Oligomere und Adipositas.....	62
3.4.1.1	Oligomerverteilung und Adipositas in MeSyBePo	62
3.4.1.2	Oligomere im Gewichtsabnahme-Kollektiv	68
3.4.2	Oligomerverteilung und Glukosestoffwechsel.....	71
3.4.2.1	Oligomere und gestörter Glukosestoffwechsel in MeSyBePo	71
3.4.2.2	Oligomere in der Interventionsstudie Insulin.....	77
4	Diskussion	82
4.1	Genetische Faktoren	82
4.2	Metabolische Faktoren	91
4.3	Adiponectin-Oligomere	99
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
7	Literaturverzeichnis	112

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

a	absolut
ADA	American Diabetes Association
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
BIA	Bioelektrische Impedanz-Analyse
BMI	Body Mass Index
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CIGMA	Continuous Infusion of Glucose with Model Assessment
CRP	C-reaktives Protein
DEXA	Dual-Energy X-ray Absorptiometry
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	<i>et alii</i> (lateinisch: und andere)
FCS	Fetal Calf Serum
FFA	Free Fatty Acid
FSH	follikelstimulierendes Hormon
Gly	Glycin
HbA1c	Glykohämoglobin
HDL	High-density Lipoprotein
HEK	Human embryonic kidney
HMW	High Molecular Weight
HOMA	Homeostasis Model Assessment
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
IFG	gestörte Nüchtern glukose (Impaired Fasting Glucose)
IGT	gestörte Glukosetoleranz (Impaired Glucose Tolerance)
IR	Insulinresistenz
LDL	Low-density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LMW	Low Molecular Weight
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeSyBePo	Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam
MMW	Medium Molecular Weight
NEFA	non-esterified fatty acids (=FFA)
NGT	normale Glukosetoleranz (Normal Glucose Tolerance)
<i>ob</i>	obese
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PBS	Phosphate buffered saline
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPAR	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
Quicki	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
SHBG	sexualhormonbindendes Globulin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SS	Steady-State
T2DM	Typ-2-Diabetes mellitus
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TZD	Thiazolidindion
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organization
WHR	Waist-to-Hip-Ratio

Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaar(e)
c	zenti-
°C	Grad Celsius
kal	Kalorien
d	dezi-
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo-
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
log	Logarithmus zur Basis n
m	Meter
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
μ	Mikro-
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen (potentia hydrogenii)
RLU	relative Lichteinheiten (relative light units)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sek	Sekunde
U	Unit (Einheit)
V	Volt
W	Watt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Aufbau des Adiponectins.	4
Abbildung 2	Multimerisierung des Adiponectins.	5
Abbildung 3	Das Adiponectin mit ausgewählten Polymorphismen.	7
Abbildung 4	Häufigkeiten der Parameter Alter, BMI und WHR innerhalb der MeSy-BePo-Studienkohorte mit 1208 Teilnehmern.	40
Abbildung 5	Häufigkeiten von Störungen des Glukosemetabolismus innerhalb der MeSyBePo-Kohorte mit 1208 Teilnehmern.	41
Abbildung 6	Genotypfrequenzen für den Promotorpolymorphismus -11377 im Adiponectin in der MeSyBePo-Kohorte.	42
Abbildung 7	Genotypfrequenzen für den Promotorpolymorphismus -11391 im Adiponectin in der MeSyBePo-Kohorte.	43
Abbildung 8	Sequenz des einklonierten Promotorfragments mit Markierung der beiden Polymorphismen -11377 C/G und -11391 G/A.	44
Abbildung 9	Ethidiumbromidgele der klonierten Konstrukte mit eingebautem Adiponectinpromotor.	47
Abbildung 10	Vektorkarte nach Klonierung des Adiponectinpromotors in den pGL3-Basic Vektor.	48
Abbildung 11	Genotypabhängige Aktivierung des Adiponectinpromotors im Zellkulturmodell.	49
Abbildung 12	Adiponectinspiegel im Serum in Abhängigkeit vom Genotyp zweier Promotorpolymorphismen.	51
Abbildung 13	Einfluß metabolischer Parameter auf die Promotoraktivität des Adiponectins in HEK-Zellen im Luziferase-Assay.	53
Abbildung 14	Korrelationsanalysen zwischen Serum-Adiponectin und anthropometrischen sowie klinischen Parametern in der MeSyBePo-Kohorte.	55
Abbildung 15	Relative Veränderungen der Insulin- und Adiponectinspiegel vor dem Clamp und unter Steady-State-Bedingungen in der Interventionsstudie Insulin.	57
Abbildung 16	Plasma-Adiponectinspiegel bei Frauen mit PCO-Syndrom im Vergleich zu den Kontrollen in der PCOS-Studie, stratifiziert nach dem BMI.	59
Abbildung 17	Beispielhafte Darstellung eines Western Blots mit den Oligomeren LMW*, MMW** und HMW*** sowie der Kompetitionsanalyse.	63
Abbildung 18	Gesamtadiponectin und Adiponectin-Oligomere im Serum in Abhängigkeit vom Geschlecht in einer Subkohorte von MeSyBePo.	64
Abbildung 19	Oligomerverteilung des Adiponectins im Serum in Abhängigkeit vom BMI in einer Subkohorte von MeSyBePo.	66
Abbildung 20	Korrelationsanalyse zwischen HDL-Cholesterol und dem Gesamtadiponectin bzw. dem hochmolekularen Oligomer (HMW) in einer Subkohorte von MeSyBePo.	72
Abbildung 21	Serum-Adiponectinspiegel im Verlauf eines oralen Glukosetoleranztests bei Probanden einer Subkohorte von MeSyBePo in Abhängigkeit vom Status ihres Glukosestoffwechsels.	74
Abbildung 22	Absolute Adiponectin-Oligomere im Verlauf des oralen Glukosetoleranztests bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz in einer Subkohorte von MeSyBePo.	75

Abbildung 23	Adiponectinspiegel vor dem Clamp im Vergleich zum Steady-State in der Interventionsstudie Insulin.	77
Abbildung 24	Analyse der Adiponectin-Oligomere während eines hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps bei den Teilnehmern der Interventionsstudie Insulin.	78
Abbildung 25	Darstellung der Serum-Adiponectinspiegel von Teilnehmern der Interventionsstudie Insulin, stratifiziert nach der Insulinsensitivität.	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen nach WHO 2004.	1
Tabelle 2	Geschlechtsspezifischer Taillenumfang und das Risiko Adipositas-assoziiierter Erkrankungen in kaukasischen Bevölkerungsgruppen nach WHO 2004.	1
Tabelle 3	Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus.	2
Tabelle 4	Zusammensetzung des Mastermixes für die Amplifikation des humanen Adiponectinpromotors sowie das dazugehörige PCR-Programm.	25
Tabelle 5	Gelzusammensetzung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.	30
Tabelle 6	Charakteristika der Teilnehmer an der Querschnittsstudie MeSyBePo.	41
Tabelle 7	Vergleich von ausgewählten anthropometrischen und klinischen Parametern zwischen Probanden mit unterschiedlichen Varianten für den Promotorpolymorphismus -11377 im additiven Modell.	43
Tabelle 8	Vergleich von ausgewählten anthropometrischen und klinischen Parametern zwischen Probanden mit unterschiedlichen Varianten für den Promotorpolymorphismus -11391 im dominanten Modell.	44
Tabelle 9	Darstellung von drei Varianten für die Kombination der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 im Adiponectingen, die in entsprechende Vektoren inkloniert wurden.	45
Tabelle 10	Einfluß der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel im Serum.	50
Tabelle 11	Einfluß der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel im Serum im adjustierten Modell.	51
Tabelle 12	Lineare Regressionsanalyse mit Serum-Adiponectin als unabhängigem Parameter in der MeSyBePo-Kohorte.	56
Tabelle 13	Charakteristika der Teilnehmer an der Interventionsstudie Insulin.	56
Tabelle 14	Vergleich ausgewählter Parameter zwischen der Kontrollgruppe und Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom in der PCOS-Studie.	58
Tabelle 15	Vergleich ausgewählter Parameter zwischen der Kontrollgruppe und Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom in der PCOS-Studie, stratifiziert nach dem BMI.	59
Tabelle 16	Lineare Regressionsanalyse mit Plasma-Adiponectin als unabhängigem Parameter in der PCOS-Kohorte.	60
Tabelle 17	Lineare Regressionsanalyse mit CIGMA% als unabhängigem Parameter bei Frauen mit einem PCO-Syndrom.	61
Tabelle 18	Vergleich ausgewählter Parameter zwischen Frauen und Männern in einer Subkohorte von MeSyBePo.	63

Tabelle 19	Korrelationen zwischen Adiponectin bzw. seinen Oligomeren und ausgewählten anthropometrischen und klinischen Parametern in einer Subkohorte von MeSyBePo.	65
Tabelle 20	Lineare Regressionsanalyse mit Serum-Adiponectin bzw. den absoluten Adiponectin-Oligomeren als unabhängigen Parametern in einer Subkohorte von MeSyBePo.	67
Tabelle 21	Vergleich ausgewählter anthropometrischer und klinischer Parameter vor und nach der Gewichtsreduktion im Gewichtsabnahme-Kollektiv.	68
Tabelle 22	Korrelationen zwischen Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$) bzw. seinen einzelnen Oligomeren und dem Körpergewicht bzw. HDL-Cholesterol vor und nach Gewichtsabnahme im Gewichtsabnahme-Kollektiv.	69
Tabelle 23	Lineare Regressionsanalyse im Gewichtsabnahme-Kollektiv mit HDL-Cholesterol als unabhängigem Parameter.	70
Tabelle 24	Vergleich ausgewählter anthropometrischer und klinischer Parameter bei Probanden einer Subkohorte von MeSyBePo in Abhängigkeit vom Status ihres Glukosestoffwechsels.	71
Tabelle 25	Vergleich der Adiponectin-Oligomere bei Probanden in einer Subkohorte von MeSyBePo in Abhängigkeit vom Status ihres Glukosestoffwechsels im oralen Glukosetoleranztest.	73
Tabelle 26	Regressionsanalysen mit Adiponectin bzw. seinen Oligomeren als abhängiger Variable in einer Subkohorte von MeSyBePo.	76
Tabelle 27	Lineare Regressionsanalyse mit dem Insulinresistenzindex HOMA_{IR} als unabhängigem Parameter in einer Subkohorte von MeSyBePo.	77
Tabelle 28	Korrelation zwischen der Insulinsensitivität (M-Wert) bzw. den freien Fettsäuren (FFA) und dem Gesamtadiponectin im Serum bzw. seinen Oligomeren in der Interventionsstudie Insulin.	79
Tabelle 29	Vergleich der Serum-Adiponectinspiegel sowie der Oligomerverteilung zwischen Personen mit geringer und mit hoher Insulinsensitivität bei den Teilnehmern der Interventionsstudie Insulin.	80

1 Einleitung

1.1 Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus

Die Prävalenz der Adipositas hat in den letzten 20 Jahren weltweit stark zugenommen. In Europa liegt sie zwischen 5 % und 20 % bei Männern und bei Frauen sogar bei bis zu 30 %.¹ Für die Gewichtsklassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird der Body Mass Index (BMI) verwendet, welcher sich aus dem Quotienten von Gewicht und Körpergröße zum Quadrat berechnet (kg/m^2) (Tabelle 1). Von Übergewicht spricht man ab einem BMI von 25, von Adipositas ab einem BMI größer 30 (Bray, 2006).

Tabelle 1. Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen nach WHO 2004.²

Klassifikation	BMI (kg/m^2)	Risiko für assoziierte Erkrankungen
Untergewicht	<18,5	gering (Risiken für andere Erkrankungen)
Normalgewicht	18,5-24,99	durchschnittlich
Übergewicht	25-29,99	leicht erhöht
Adipositas	≥ 30	
Adipositas Klasse I	30-34,99	erhöht
Adipositas Klasse II	35-39,99	stark erhöht
Adipositas Klasse III	≥ 40	sehr stark erhöht

Neben dem Übergewicht spielt auch die Verteilung des Körperfetts eine wichtige Rolle. So zeigen etliche Studien ein erhöhtes Risiko für metabolische Erkrankungen im Falle eines erhöhten viszeralen Fettdepots (Snijder et al., 2006b). Während der BMI keinen Rückschluß auf die Körperfettverteilung zuläßt, sind sowohl der Taillenumfang als auch die Waist-to-Hip-Ratio (WHR) für die Abschätzung der viszeralen Adipositas gut geeignet (Janssen et al., 2004; Snijder et al., 2006b). Da der Taillenumfang einfach zu messen ist und besser mit dem viszeralen Fettanteil korreliert als die WHR (Snijder et al., 2006b), empfiehlt die WHO eine zusätzliche Risikoanalyse für Adipositas-assoziierte Erkrankungen unter Verwendung des Taillenumfangs (Tabelle 2).

Tabelle 2. Geschlechtsspezifischer Taillenumfang und das Risiko Adipositas-assoziiierter Erkrankungen in kaukasischen Bevölkerungsgruppen nach WHO 2004.²

Taillenumfang (cm)		Risiko für Adipositas-assoziierte Erkrankungen
Frauen	Männer	
≥ 80	≥ 94	erhöht
≥ 88	≥ 102	stark erhöht

Zu den schwerwiegendsten Gesundheitsfolgen von Übergewicht und Adipositas gehören Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) sowie koronare Herz-

¹ WHO Europa, Faktenblatt EURO/13/05, <http://www.euro.who.int/document/mediacentre/fs1305g.pdf>

² Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation, Geneva, World Health Organization 2004, ISBN 9241208945.

krankheit. Für die Umschreibung einer Kombination all dieser Erkrankungen wurde der Begriff des Metabolischen Syndroms geprägt. In einer neuen Definition des Metabolischen Syndroms, vorgeschlagen durch die Internationale Diabetes-Föderation (IDF) im Jahr 2006, steht der Taillenumfang als Marker der viszeralen Adipositas im Mittelpunkt, wobei dieser bei Frauen unter 80 cm und bei Männern unter 94 cm liegen sollte.³ Aus den bereits genannten Folgen des Übergewichts ergeben sich zusätzlich umfangreiche sozio-ökonomische Konsequenzen. Pathogenetisch ist die Adipositas das Resultat eines gestörten Gleichgewichts zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch über einen längeren Zeitraum. Dabei wirken genetische Faktoren, bestimmte Verhaltensmuster, soziale Faktoren und verschiedene physiologische bzw. neurochemische Gegebenheiten zusammen. Die Energiehomöostase wird in sehr engen Grenzen neuroendokrin reguliert, wobei periphere Signale wie Leptin aus dem Fettgewebe oder Ghrelin aus dem Magen die Nahrungsaufnahme, aber auch den Energieverbrauch über hypothalamische Signalwege modifizieren können (Berthoud, 2006; Fry et al., 2007).

Der Diabetes mellitus ist biochemisch definiert durch erhöhte Blutzuckerspiegel. Die Empfehlungen zur Diagnose des Diabetes mellitus beruhen auf Vorschlägen der Amerikanischen Diabetes Assoziation (ADA), der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der IDF, sowie deren Überarbeitung durch die ADA. Diese diagnostischen Kriterien sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus. Dargestellt sind die Nüchternwerte und die 2 h-Werte im oralen Glukosetoleranztest (OGTT) für Glukose im venösen Plasma.⁴

		Plasmaglukose venös (mg/dl)		Plasmaglukose venös (mmol/l)	
		Nüchtern	2h-OGTT	Nüchtern	2h-OGTT
NGT	Normale Glukose-toleranz	< 100	< 140	< 5,6	< 7,0
IFG	Gestörte Nüchtern-glukose	100-125	-	5,6-6,9	-
IGT	Gestörte Glukose-toleranz	< 126 und	140-199	< 7,0 und	7,8-11,0
DM	Diabetes mellitus	≥ 126 und/oder ≥ 200		≥ 7,0 und/oder ≥ 11,1	

Man unterscheidet zwischen zwei Hauptformen des Diabetes mellitus, dem Typ-1-Diabetes und dem Typ-2-Diabetes. Der Typ-1-Diabetes ist eine Autoimmunkrankheit, die

³ The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf

⁴ Kerner, W., Brückel, J.: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. DDG Praxis-Leitlinie, Aktualisierung 12/2005. Diabetologie 2007; 2 Suppl 2: S 147-S 149. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, ISSN 1861-9002.

durch eine fortschreitende Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse charakterisiert ist (Gillespie, 2006). Der daraus resultierende Insulinmangel muß bei den betroffenen Patienten durch Zufuhr von körperfremdem Insulin ausgeglichen werden. Beim Typ-2-Diabetes produziert der Körper dagegen zunächst ausreichende Mengen an Insulin, es liegt aber eine unterschiedlich schwer ausgeprägte Störung der Insulinwirkung und der Insulinsekretion vor. Bei diesem Typ besteht keine autoimmune Zerstörung der β -Zellen. Eine Therapie durch eine entsprechende Diät, mehr Bewegung und die Gabe von oralen Antidiabetika kann die Manifestation der Krankheit oft verhindern. Früher wurde der Typ-2-Diabetes als Altersdiabetes bezeichnet, da er meist im mittleren oder höheren Erwachsenenalter auftritt. Heute erkranken jedoch auch immer mehr Kinder und Jugendliche an Typ-2-Diabetes (Cara und Chaiken, 2006; Weiss et al., 2006).

Unter den Diabetesformen stellt der Typ-2-Diabetes mellitus weltweit mit über 90 % die häufigste Form dar (Zimmet et al., 2001). Bei der Entstehung der Krankheit spielen neben der genetischen Disposition eine falsche Ernährung, mangelnde Bewegung und das Alter eine wichtige Rolle. Vor allem die Stammfettsucht gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Manifestation eines Typ-2-Diabetes mellitus.

Eine chronische Hyperglykämie führt durch die diabetesspezifische Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen an Augen, Nieren und Nervensystem, sowie durch die diabetesassoziierte Makroangiopathie zu Erkrankungen an Herz, Gehirn und den peripheren Arterien (Bate und Jerums, 2003).

1.2 *Charakterisierung des Adipokins Adiponectin*

1.2.1 **Struktur und Rezeptoren des Adiponectins**

In den letzten Jahren ist die Bedeutung des Fettgewebes zunehmend in den Fokus der Wissenschaft gerückt, da es neben seiner Funktion als Energiespeicher ein wichtiges endokrines Organ darstellt. Die Fettzellen sezernieren zahlreiche lokal oder systemisch wirkende bioaktive Moleküle, die sowohl den Energiestoffwechsel als auch die Insulinsensitivität beeinflussen und als Adipokine bezeichnet werden.

Eines dieser Adipokine ist das Adiponectin. Es wurde Mitte der neunziger Jahre durch vier unabhängige Gruppen beschrieben (Hu et al., 1996; Maeda et al., 1996; Nakano et al., 1996; Scherer et al., 1995) und ist daher auch als ACRP30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), GBP28 (gelatine binding protein 28) AdipoQ und ApM1 (adipose most abundant gene transcript 1) in der Literatur bekannt. Der Name Adiponectin hat sich für das humane Protein weitgehend durchgesetzt und wird daher in dieser Arbeit verwendet.

Adiponectin wird ausschließlich im weißen Fettgewebe exprimiert und kommt in relativ hohen Konzentrationen (2-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Serum vor (Scherer et al., 1995). Das humane Protein ist aus 244 Aminosäuren aufgebaut und läßt sich in vier Domänen unterteilen: Die

Signalsequenz am aminoterminalen Ende, gefolgt von einer Region ohne Homologien mit bekannten Proteinen, ein kollagener Bereich mit 22 Wiederholungen der Aminosäuresequenz Gly-X-Y (14x) oder Gly-X-Pro (8x) (Nakano et al., 1996), sowie einer globulären Domäne am Carboxylende, die Sequenzhomologien zum Komplementfaktor C1q sowie dem Kollagen VIII und X aufweist (Abbildung 1).

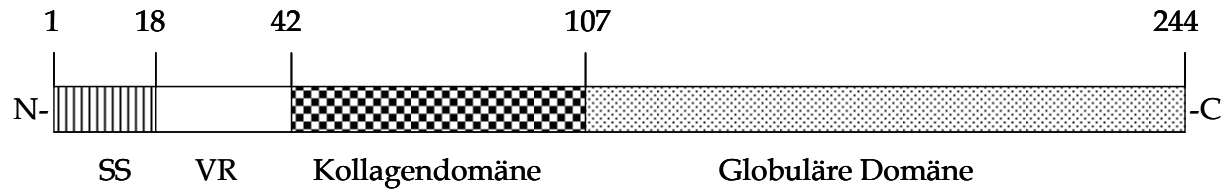


Abbildung 1. Schematischer Aufbau des Adiponectins. SS-Signalsequenz, VR-variable Region, N-Aminoterminales Ende, C-Carboxylende.

Aufgrund der kollagenen Region bildet das Protein stabile Tripelhelices aus. Die kristalline Struktur der globulären Domäne ähnelt der Struktur des Tumor-Nekrose-Faktors alpha (TNF α); beide Proteine weisen allerdings keinerlei Homologien in der Aminosäuresequenz auf. Die Translation startet mit dem Exon 2 und endet im Exon 3, so daß Exon 1 sowie Teile des Exon 3 untranslatiert bleiben (Takahashi et al., 2000; Yang und Chuang, 2006). Adiponectin unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, welche für eine Oligomerisierung oder für die Funktion des Proteins wichtig zu sein scheinen (Whitehead et al. 2006). So ist die Disulfidbrückenbindung zwischen Cysteinresten in der aminoterminalen Domäne essentiell für die Oligomerbildung (Pajvani et al., 2003; Tsao et al., 2003; Waki et al., 2003). Weitere Modifikationen stellen Hydroxylierungen von Prolin- und Lysinresten mit anschließender Glykosylierung dar, was möglicherweise eine Rolle bei der insulinsensitivierenden Funktion des Adiponectins spielt (Wang et al., 2002).

Es ist nicht bekannt, daß einzelne Adiponectin-Monomere *in vivo* vorkommen. Die Grundstruktur des Adiponectins stellt das Homotrimer dar, bei dem drei kollagene Domänen über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Scherer et al., 1995). Dies geschieht über die Cysteinreste jeweils vor und hinter der kollagenen Domäne (Nakano et al., 1996). Die Trimere assoziieren zu größeren Komplexen, wobei zwei Trimere das Hexamer darstellen und die hochmolekularen Komplexe aus bis zu sechs Trimeren bestehen. Im Plasma zirkuliert Adiponectin hauptsächlich in drei Formen, als Trimer (nachfolgend auch LMW-Adiponectin genannt aufgrund seines geringen Molekulargewichts), als Hexamer (nachfolgend auch MMW-Adiponectin genannt aufgrund seines mittleren Molekulargewichts) sowie als hochmolekularer Komplex (nachfolgend auch HMW-Adiponectin genannt) (Okamoto et al., 2006). Diese Oligomere sind in Abbildung 2 dargestellt.

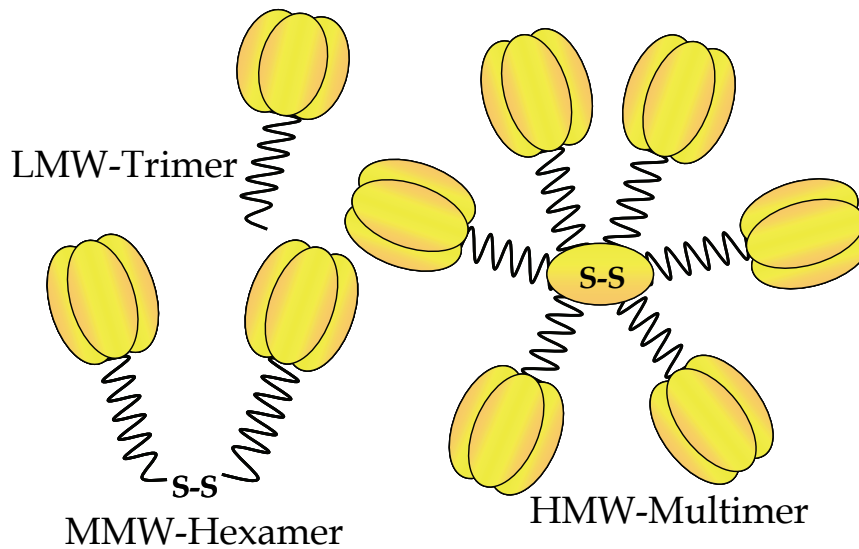


Abbildung 2. Multimerisierung des Adiponectins. Die hauptsächlich im Serum zirkulierenden Formen sind: Trimer=“Low Molecular Weight“; Hexamer= “Medium Molecular Weight“; HMW=“High Molecular Weight“; S-S Schwefelbrückenbindung.

Zusätzlich konnten in einer Arbeit geringe Mengen der globulären Domäne im Plasma detektiert werden (Fruebis et al., 2001). Es gibt erste Hinweise aus der Literatur, daß diese zirkulierenden Oligomere unterschiedliche biologische Funktionen ausüben können. So wurde postuliert, daß HMW-Adiponectin die aktivere Form des Proteins darstellt und eine entscheidende Rolle bei der Insulinsensitivität spielt (Fisher et al., 2005; Hara et al., 2006; Lara-Castro et al., 2006; Pajvani et al., 2004).

Für die Höhe der Adiponectinspiegel besteht ein Geschlechtsunterschied. So wurde in mehreren Studien belegt, daß Frauen signifikant höhere Adiponectinspiegel besitzen als Männer (Laughlin et al., 2006; Nishizawa et al., 2002). Als ursächlicher Faktor für diesen Dimorphismus wird das Sexualhormon Testosteron diskutiert (Laughlin et al., 2006; Page et al., 2005). Weiterhin gibt es Hinweise, daß sich die Oligomerverteilung ebenfalls zwischen den Geschlechtern unterscheidet. So wurde gezeigt, daß weibliche Mäuse einen höheren Anteil an HMW-Adiponectin aufwiesen als die männlichen Tiere (Xu et al., 2005).

Bisher sind zwei Adiponectinrezeptoren bekannt, deren Struktur von der Arbeitsgruppe um Toshimasa Yamauchi im Jahr 2003 aufgeklärt worden ist. Sie enthalten sieben Transmembrandomänen, unterscheiden sich jedoch funktionell und strukturell von anderen bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Yamauchi et al., 2003a). Während der Adiponectinrezeptor 1 (AdipoR1) überwiegend das globuläre Adiponectin bindet, ist die Affinität des Adiponectinrezeptors 2 (AdipoR2) für das globuläre und das gesamte Adiponectin ähnlich. AdipoR1 wird hauptsächlich in der Skelettmuskulatur exprimiert, AdipoR2 dagegen in der Leber (Yamauchi et al., 2003a). Während sich im Mausmodell das Expres-

sionsniveau beider Rezeptoren im Skelettmuskel sehr unterscheidet, sind die Differenzen beim Menschen geringer (Yamauchi et al., 2003a). Auch im Fettgewebe und in β -Zellen konnte eine Expression beider Rezeptoren nachgewiesen werden (Kharroubi et al., 2003; Tsuchida et al., 2004). Die Rezeptoren können Signalmoleküle wie den Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha (PPAR α), die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) aktivieren und modulieren darüber möglicherweise die metabolischen Effekte des Adiponectins, auf die nachfolgend noch näher eingegangen wird. Im Tiermodell wurde weiterhin gezeigt, daß eine Beeinflussung der Expression der Adiponectinrezeptoren durch Insulin über den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/FoxO1-abhängigen Signalweg möglich ist (Tsuchida et al., 2004). In Humanstudien konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression der Rezeptoren und der Insulinsensitivität ermittelt werden (Civitarese et al., 2004). PPAR γ -Agonisten wie das Thiazolidindion Rosiglitazon können ebenfalls die Expression der Rezeptoren modulieren (Tan et al., 2005). Neben Adiponectin ist auch Osmotin aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit in der Lage, an die Adiponectinrezeptoren zu binden (Iwashima et al., 2004), was die Möglichkeit einschließt, daß auch weitere Liganden dazu in der Lage sind (Whitehead et al., 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, daß T-Cadherin als Rezeptor für das Hexamer und die hochmolekulare Spezies des Adiponectins fungieren kann (Hug et al., 2004).

1.2.2 Charakteristika des Adiponectingens

Das Adiponectingen befindet sich auf dem Chromosom 3q27, welches durch Genom-Scans an 507 amerikanischen Familien mit der Entstehung des Metabolischen Syndroms (Kissebah et al., 2000) bzw. an 143 französischen Familien (Vionnet et al., 2000) sowie an 159 japanischen Familien mit der Entstehung des T2DM in Verbindung gebracht werden konnte (Mori et al., 2002). In verschiedenen Studien wurde das Adiponectingen selbst als möglicher Modulator der Adiponectinspiegel identifiziert, was durch Genvariationen innerhalb des Gens zu erklären sein dürfte (Guo et al., 2006; Pollin et al., 2005). Allerdings ergaben bisherige Assoziationsstudien unterschiedliche Resultate in Abhängigkeit von der ethnischen Zugehörigkeit der Studienpopulation. Es wird angenommen, daß die Adiponectinspiegel zu etwa 42 % bis 70 % durch hereditäre Faktoren vorbestimmt sind (Comuzzie et al., 2001; Vasseur et al., 2003). Unter den Arten von Sequenzvariationen kommen die Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) am häufigsten vor; dabei handelt es sich um den Austausch eines einzelnen Nukleotids im DNA-Molekül. Bei den im weiteren Verlauf der Arbeit genannten Polymorphismen handelt es sich ausschließlich um solche Einzelnukleotidpolymorphismen. Es konnten einige SNPs im Adiponectingen dargestellt werden, die eine genetische Regulation der Adiponectinspiegel nahelegen, unter ihnen die Promotor-SNPs -11377, -11391 und -10066 (Vasseur et al., 2002; Woo et al., 2006), SNP +276 im Intron 2 (Menzaghi et al., 2004; Mousavinasab et al., 2006; Woo et al., 2006)

sowie SNP Y111H (Kretowski et al., 2005) und SNP I164T (Kondo et al., 2002). Diese und einige weitere Polymorphismen des Adiponectingens sind in Abbildung 3 dargestellt.

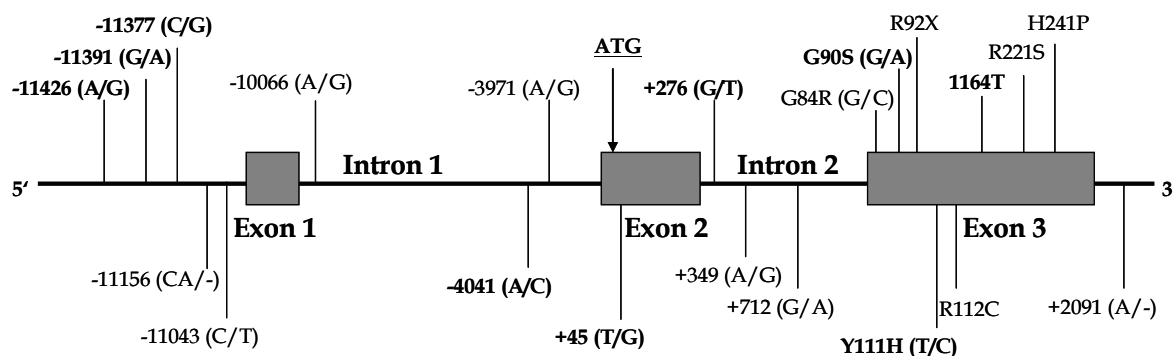


Abbildung 3. Das Adiponectingens mit ausgewählten Polymorphismen. Die Nummern beschreiben die Lage des Polymorphismus relativ zum Adenin des Startkodons ATG. Abbildung adaptiert nach Francis Vasseur (Vasseur et al., 2003).

Verschiedene Polymorphismen scheinen mit Komplikationen innerhalb des Metabolischen Syndroms assoziiert zu sein. Dabei unterscheiden sich jedoch sowohl die Häufigkeitsverteilungen der Allele als auch die Assoziationen zwischen den Polymorphismen und dem Risiko für Erkrankungen innerhalb des Metabolischen Syndroms in Abhängigkeit von der untersuchten Population (Vasseur et al., 2003). So konnten die Polymorphismen +45, +276 und -11377 mit dem Faktor Übergewicht in Zusammenhang gebracht werden. Assoziationen zum Typ-2-Diabetes mellitus zeigten die Polymorphismen +45, +276, I164T, G90S, Y111H, -11377, -11391, -11426 sowie -4034 (Yang und Chuang, 2006). Die Datenlage bezüglich koronarer Herzkrankheiten stellt sich sehr uneinheitlich dar. In Abhängigkeit vom ethnischen Hintergrund der Probanden bestehen Assoziationen zu den SNPs +45, +276, und I164T. Die Daten hinsichtlich eines Einflusses der Genvarianten auf den Fettstoffwechsel sowie den Endpunkt Bluthochdruck sind bisher unzulänglich, da nicht zu klären ist, ob die Auswirkungen unabhängig vom Körpergewicht sind (Yang und Chuang, 2006).

1.2.3 Metabolische Wirkungen von Adiponectin

Im Gegensatz zu anderen Adipokinen wie TNF α oder Resistin ist die Expression von Adiponectin bei Übergewicht oder Insulinresistenz vermindert. So konnten erniedrigte Adiponectinspiegel bei übergewichtigen und insulinresistenten Nagern gefunden werden (Hu et al., 1996). Auch Rhesusaffen mit Übergewicht oder Typ-2-Diabetes wiesen erniedrigte Adiponectinspiegel auf, wobei das Abfallen der Adiponectinspiegel mit einer sich entwickelnden Insulinresistenz einherging (Hotta et al., 2001). In Humanstudien wurden bei Patienten mit Komplikationen innerhalb des Metabolischen Syndroms ebenfalls erniedrigte Adiponectinspiegel festgestellt (Matsuzawa et al., 2004). Konkret konnten erniedrigte Spiegel bei Patienten mit Übergewicht (Arita et al., 1999; Hu et al., 1996), Typ-2-

Diabetes mellitus (Hotta et al., 2000), Dyslipidämien (Okamoto et al., 2006), kardiovaskulären Erkrankungen (Kumada et al., 2003; Nakamura et al., 2004; Yaturu et al., 2006) und Bluthochdruck (Adamczak et al., 2003; Huang et al., 2003; Iwashima et al., 2004) dokumentiert werden.

Neben den insulinsensitivierenden Wirkungen werden dem Adiponectin auch anti-entzündliche Effekte zugeschrieben, die eine positive Rolle im Rahmen von atherosklerotischen Krankheiten spielen können. So wurden in Humanstudien negative Korrelationen zwischen Adiponectin und dem C-reaktiven Protein, einem Marker für systemische Entzündungen und Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten, gefunden (Matsubara et al., 2003; Ouchi et al., 2003). In prospektiven Studien konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Adiponectin und dem Risiko von koronaren Herzkrankheiten festgestellt werden (Lawlor et al., 2005; Lindsay et al., 2005). Auch in einer neuen Metastudie war keine eindeutige Aussage möglich (Sattar et al., 2006), so daß weitere Arbeiten zur Klärung des Sachverhalts nötig sind.

1.3 *Adiponectin und Glukosemetabolismus*

1.3.1 **Adiponectin und Insulinsensitivität**

Die insulinsensitivierende Wirkung von Adiponectin wurde erstmals im Jahr 2001 durch drei verschiedene Gruppen publiziert (Berg et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). In Mausmodellen konnte die Gabe von Adiponectin eine durch fettreiche Diät induzierte Insulinresistenz verbessern, vermutlich durch Aktivierung der AMP-Kinase (Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2001). Joachim Fruebis und Mitarbeiter konnten ebenfalls im Mausmodell zeigen, daß das globuläre Fragment des Adiponectins die Glukosespiegel im Plasma durch eine gesteigerte Fettsäureoxidation im Muskel senken konnte und eine Gewichtsabnahme bei den Tieren induzierte (Fruebis et al., 2001). Ein Abfall der Blutglukosespiegel durch die akute Gabe von Adiponectin wurde auch von der Arbeitsgruppe um Phillip Scherer bei Wildtyp-Mäusen und Tieren mit einem Typ-2-Diabetes gezeigt (Berg et al., 2001). Als Ursache wird die Hemmung von Enzymen der hepatischen Glukoneogenese sowie die verringerte endogene Glukoseproduktion vermutet.

Weitere Untersuchungen wurden an transgenen Mäusen und an Adiponectin-defizienten Mäusen durchgeführt. In transgenen *ob/ob* Mäusen konnte die Gabe von Adiponectin eine Verbesserung der Insulinresistenz und einer bestehenden Diabeteserkrankung bewirken (Yamauchi et al., 2003b). Insbesondere das komplette Protein war in der Lage, die insulinvermittelte endogene Glukoseproduktion zu verringern, die anderen Formen hatten dagegen keinen Effekt auf die hepatische Glukoneogenese. Naoto Kubota und Kollegen konnten zeigen, daß Mäuse mit einer Adiponectindefizienz unter normaler Diät Anzeichen von Insulinresistenz und Glukoseintoleranz aufwiesen (Kubota et al., 2002). Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch in einer neueren Arbeit beschrieben werden (Nawrocki

et al., 2006). In einer weiteren Studie wurde unter normaler Diät allerdings keine Insulinresistenz bei Adiponectin-KO-Mäusen beobachtet, während die Tiere bei einer fettreichen Diät eine Insulinresistenz entwickelten (Maeda et al., 2002). Die Gruppe um Ke Ma und Mitarbeiter konnte dagegen überhaupt keinen Einfluß der Adiponectindefizienz auf den Glukosestoffwechsel feststellen (Ma et al., 2002). Hinsichtlich der tierexperimentellen Daten bleibt somit der Einfluß eines kompletten Adiponectinverlusts auf den Glukosestoffwechsel umstritten.

Bezüglich der beiden Adiponectinrezeptoren ergaben Studien mit Rezeptor-KO-Mäusen gegensätzliche Effekte. Während die Ausschaltung des AdipoR1 bei Mäusen Übergewicht und Glukoseintoleranz induzierte, wiesen die KO-Tiere für den AdipoR2 keinerlei Veränderung des Phänotyps auf, sondern zeigten nach fettreicher Diät sogar eine verbesserte Glukosetoleranz (Bjursell et al., 2007). Auch in einer weiteren Studie unterschieden sich AdipoR2-KO-Mäuse phänotypisch nicht von den Wildtyp-Mäusen, wiesen allerdings nach andauernder fettreicher Diät eine durch die Insulinresistenz induzierte verminderte β -Zell-Funktion auf (Liu et al., 2007). In einer neueren Arbeit wurde in AdipoR2-KO-Mäusen eine normale Glukosetoleranz festgestellt; gleichzeitig hatten die Tiere jedoch erhöhte Insulinspiegel im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Yamauchi et al., 2007). In der gleichen Arbeit wurde weiterhin gezeigt, daß die Tiere nach Ausschaltung beider Adiponectinrezeptoren insulinresistent und glukoseintolerant waren.

Über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen für die insulinsensitivierende Wirkung des Adiponectins bestehen mehrere Erklärungsansätze. So bindet das Adiponectin an einen seiner beiden Rezeptoren und stimuliert darüber die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase in der Leber oder in der Skelettmuskulatur, verbunden mit einer Hemmung der Glukoneogenese (Yamauchi et al., 2002). Die Stimulation der AMPK wird vorwiegend über den AdipoR1 vermittelt, während AdipoR2 eher in die Aktivierung des PPAR α -Signalwegs involviert ist (Yamauchi et al., 2007). Die Oxidation der Fettsäuren und der damit verbundenen Abnahme der Triglyzeridspiegel wird über beide Signalwege vermittelt (Yamauchi et al., 2007).

PPAR γ ist ein wichtiger Regulator der Differenzierung von Adipozyten, und seine Agonisten, die Thiazolidindione (TZDs), verbessern die Insulinsensitivität (Okamoto et al., 2006; Spiegelman, 1998). In Zellkulturexperimenten konnten die TZDs den Adiponectinpromotor aktivieren, was zu einer erhöhten Expression und Sekretion von Adiponectin in 3T3-L1-Adipozyten führte (Maeda et al., 2001). Auch beim Menschen geht die medikamentöse Behandlung mit Thiazolidindionen zur Verbesserung der Insulinsensitivität meist mit einem Anstieg der Adiponectinspiegel einher. Dies konnte sowohl bei Patienten mit T2DM als auch bei gesunden Probanden beobachtet werden (Combs et al., 2002; Yang et al., 2002; Yu et al., 2002). Insgesamt ergibt sich aus der Datenlage, daß die Verbesserung der Insulinsensitivität durch Behandlung mit TZDs zumindest teilweise durch den Anstieg der Adiponectinspiegel zu erklären ist. Weiterhin werden die Adiponectinspiegel

durch TNF α erniedrigt (Maeda et al., 2002), welches seinerseits Insulinresistenz verursachen kann.

Nachdem in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, daß niedrige Adiponectinspiegel eine Insulinresistenz hervorrufen können, stellt sich die Frage, ob Insulin ebenfalls einen Effekt auf das Adiponectin ausübt. Erste Hinweise darauf gaben Zellkulturversuche mit 3T3-L1-Adipozyten, bei denen die Adiponectin-Genexpression auf Transkriptionsebene durch Zugabe von Insulin herunterreguliert war (Fasshauer et al., 2002). Somit wird postuliert, daß auch erhöhte Insulinspiegel eine Hypoadiponectinämie induzieren könnten.

1.3.2 Adiponectin als Risikomarker für Typ-2-Diabetes mellitus

In vielen Studien konnte ein enger Zusammenhang zwischen Adiponectin und einem Typ-2-Diabetes mellitus festgestellt werden. Die erste Studie dazu wurde von Hotta und Kollegen durchgeführt, die bei Patienten mit Typ-2-Diabetes geringere Adiponectinspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden (Hotta et al., 2000). In einer bereits erwähnten Studie mit Rhesusaffen sanken die Adiponectinspiegel mit der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes ab (Hotta et al., 2001). In einer retrospektiven Studie mit Pima-Indianern konnte festgestellt werden, daß Menschen mit einem initial geringeren Adiponectinspiegel ein höheres Risiko haben, an Diabetes zu erkranken (Lindsay et al., 2002). Dies konnte auch in einer japanischen Population bestätigt werden, bei der Studienteilnehmer mit den geringsten Adiponectinspiegeln innerhalb von fünf Jahren häufiger an Diabetes erkrankten als Probanden mit den höchsten Spiegeln (Daimon et al., 2003). Eine Fall-Kontroll-Studie zeigte weiterhin, daß initial hohe Adiponectinspiegel bei gesunden Menschen mit einem geringeren Risiko für Typ-2-Diabetes assoziiert sind (Spranger et al., 2003). Weitere klinische Studien konnten Adiponectin als unabhängigen Faktor für eine Entwicklung von T2DM ermitteln (Choi et al., 2004; Snehalatha et al., 2003; Snijder et al., 2006a). Die Datenlage indiziert einen Zusammenhang zwischen Adiponectin und der Entwicklung einer Insulinresistenz bzw. eines Typ-2-Diabetes.

1.3.3 Adiponectin und das Polyzystische Ovarsyndrom

Das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) zählt bei geschlechtsreifen Frauen zu den häufigsten Endokrinopathien mit einer geschätzten Prävalenz von 5 % (Asunción et al., 2000; Azziz et al., 2004; Carmina und Lobo, 1999; Ducluzeau et al., 2003). Zu den klinischen Merkmalen des phänotypisch variablen und heterogenen PCOS zählen Hyperandrogenämie, Anovulation und polyzystische Ovarien. Zusätzlich kommt es bei einem großen Teil der PCOS-Patientinnen zu metabolischen Störungen wie Adipositas und Insulinresistenz (Carmina und Lobo, 1999; Franks, 1995). Die Prävalenz eines Metabolischen Syndroms bei Frauen mit PCOS beträgt ca. 40 %, was ungefähr doppelt so hoch ist wie in adjustierten Kontrollgruppen (Apridonidze et al., 2005; Glueck et al., 2003). In prospektiven Studien konnte bei Frauen mit einem PCOS ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung

einer gestörten Glukosetoleranz und die Erkrankung an Typ-2-Diabetes gezeigt werden (Ehrmann et al., 1999; Legro et al., 1999). Eine Behandlung der metabolischen Störungen, insbesondere die Verbesserung der Insulinsensitivität, führte zu einer Abschwächung der Hyperandrogenämie und einer vermehrten Fruchtbarkeit (De Leo et al., 2003; Dereli et al., 2005). Diese Beobachtungen deuten auf einen engen Zusammenhang zwischen den reproduktiven und den metabolischen Störungen hin. Da Adiponectin eng mit der Insulinresistenz (Pellmé et al., 2003; Yamamoto et al., 2002) und auch mit dem Übergewicht assoziiert ist (Arita et al., 1999), wurde dieser Zusammenhang auch bei Frauen mit einem PCOS näher untersucht. Hier wurden die Adiponectinspiegel jedoch eher durch das Übergewicht als durch eine Insulinresistenz bestimmt (Ducluzeau et al., 2003; Orio et al., 2003; Panidis et al., 2003). Da das Auftreten einer Insulinresistenz bei Patientinnen mit PCOS jedoch nicht ausschließlich durch das Übergewicht erklärt werden konnte (Apridonidze et al., 2005), wurden in dieser Arbeit die Zusammenhänge zwischen Adiponectin, Übergewicht und Insulinresistenz in einem Kollektiv von 62 Frauen mit einem PCOS und 35 gesunden Probandinnen genauer untersucht. Weiterhin könnten die Adiponectinspiegel durch eine Hyperandrogenämie moduliert werden (Nishizawa et al., 2002), was in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde.

1.4 Ziele der Arbeit

Erniedrigte Adiponectinspiegel findet man bei Personen mit verschiedenen Krankheiten innerhalb des Metabolischen Syndroms wie Adipositas, Typ-2-Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen. Eine verbesserte glykämische Kontrolle sowie eine Gewichtsreduktion führen zu einer Normalisierung der Adiponectinspiegel, was eine enge Verbindung zwischen Adiponectin und der metabolischen Kontrolle impliziert. Weiterhin ist bekannt, daß genetische Variationen im Adiponectin selbst die Adiponectinspiegel modulieren können. Zusätzlich ist das Protein zur Oligomerisierung befähigt, wobei die einzelnen Oligomere unterschiedliche biologische Funktionen auszuüben scheinen. Somit stellten sich für diese Arbeit folgende Fragen:

Welche Faktoren beeinflussen die zirkulierenden Adiponectinspiegel, und welche Rolle spielen insbesondere das Übergewicht oder ein gestörter Glukosestoffwechsel?

Welche konkreten Zusammenhänge bestehen zwischen Adiponectin, Übergewicht und Insulinresistenz bei Frauen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom?

Welche Interaktionen gibt es zwischen den Adiponectin-Oligomeren und dem Glukose- oder dem Fettstoffwechsel? Wie wirkt sich eine Gewichtsreduktion oder eine kurzzeitige Hyperinsulinämie auf die Oligomerverteilung aus?

Sind die Oligomere gegenüber dem Gesamtprotein spezifischer mit Parametern des Glukosemetabolismus oder denen des Übergewichts assoziiert?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurde primär das Studienkollektiv „Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam“ (MeSyBePo) genutzt. Neben den üblichen metabolischen Parametern wurden die Promotorpolymorphismen ADIPOQ -11377 C/G und ADIPOQ -11391 G/A des Adiponectins bestimmt und die zirkulierenden Adiponectinspiegel gemessen. In einer Subkohorte wurde zusätzlich die Oligomerverteilung des Proteins analysiert. Einige Probanden unterzogen sich einem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp, so daß die Auswirkung einer Hyperinsulinämie auf das zirkulierende Adiponectin und die Oligomere untersucht werden konnte. Spezifische Fragestellungen wurden zusätzlich in einem Gewichtsabnahmekollektiv und bei Frauen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom untersucht.

2 Studienkollektive, Methoden und Materialien

2.1 Studienkollektive

2.1.1 Querschnittsstudie MeSyBePo

2.1.1.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die Studie „Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam“, kurz MeSyBePo, ist eine fortlaufende Querschnittsstudie, die sowohl am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke als auch an der Charité-Campus Benjamin Franklin in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin realisiert wird. Die Studie soll Zusammenhänge zwischen den Erkrankungen innerhalb des Metabolischen Syndroms klären. Für die Studie liegen entsprechende Ethikvoten der Länder Berlin und Brandenburg vor. Die Probanden mit einem Mindestalter von 18 Jahren wurden durch lokale Zeitungsannoncen, Informationsblätter in Arztpraxen und Apotheken sowie über das Internet rekrutiert. Sie wurden über den Untersuchungsablauf aufgeklärt; von allen Studienteilnehmern lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Neben der Dokumentation der individuellen Anamnese wurden anthropometrische Parameter wie Gewicht, Größe, Hüftumfang und Hautfaltendicke gemessen und der Blutdruck ermittelt. Ausgewählte Biomarker im Blut wurden im Labor mit Routinemethoden bestimmt. Bei allen Teilnehmern wurde der Grundumsatz gemessen und ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Mit besonderer Einwilligung einiger Probanden konnte zusätzlich ein Clamp zur Messung der Insulinsensitivität durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit waren 1208 Probanden in die Studie eingeschlossen.

2.1.1.2 Phänotypisierung

Körpergröße, Gewicht und BMI

Die zentimetergenaue Messung der Körpergröße erfolgte am barfüßigen, aufrecht stehenden Probanden an einer Meßlatte. Der Blick des Probanden war dabei nach vorn gerichtet. Das Körpergewicht wurde mit einer geeichten digitalen Waage auf 100 g genau bestimmt. Die Probanden waren dabei ausschließlich mit Unterwäsche bekleidet. Die Berechnung des Body Mass Index (BMI) erfolgte mit nachstehender Formel:

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht (kg)} / [\text{Körpergröße (m)}]^2.$$

Taillenumfang, Hüftumfang und Waist-to-Hip-Ratio

Mit einem flexiblen Maßband erfolgte die Messung des Umfangs von Taille und Hüfte. Durch Division von Taillenumfang (cm) und Hüftumfang (cm) wurde die Waist-to-Hip-Ratio (WHR) berechnet.

Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte nach einer 15-minütigen Ruhephase am Oberarm des sitzenden Probanden mittels eines automatischen Blutdruckmeßgeräts (OMRON, Japan). Dabei wurde die Messung dreimal im Abstand von 5 min durchgeführt. Es wurde schließlich der Mittelwert aus der zweiten und dritten Messung gebildet (Schulze et al., 2000).

Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)

Zur Bestimmung der Glukosetoleranz unterzogen sich die Probanden jeweils einem oralen Glukosetoleranztest. Dazu war es nötig, daß die Probanden mindestens 10 h über Nacht fasteten und lediglich Wasser trinken durften. Vor Testbeginn wurde den Probanden Blut aus einer Unterarmvene entnommen, um die Nüchterninsulinkonzentration und weitere Parameter zu bestimmen. Die Teilnehmer wurden gebeten, innerhalb von 5 min 75 g Glukose gelöst in 300 ml Wasser (Dextro O.G.T. 300 ml, Roche, Grenzach-Wylen, Deutschland) zu sich zu nehmen. Im Rahmen des OGTT wurde der Blutzucker im kapillären Vollblut nach 0', 30', 60', 90', 120' und 180 min nach der Glukoseoxidase-methode im Analysator „SUPER GL“ (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Deutschland) gemessen. Weiterhin wurden die Insulinwerte im Serum mittels ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Schweden) bestimmt, um im Anschluß Parameter für die Abschätzung der Insulinresistenz zu kalkulieren.

Der OGTT wird verwendet, um die Glukosetoleranz des gesamten Körpers zu evaluieren (Matsuda und DeFronzo, 1999). Eine Unterscheidung zwischen hepatischer und peripherer Insulinsensitivität ist schwierig, da die Unterdrückung der hepatischen Glukoseproduktion im OGTT nur gering ist (Monzillo und Hamdy, 2003).

Hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp

Der Clamp ist eine Methode zur Messung der Insulinsensitivität auf Grundlage einer von de Fronzo beschriebenen Technik (DeFronzo et al., 1979). Bei konstanter Insulininfusion ist die infundierte Glukosemenge, die zur Aufrechterhaltung eines normalen Blutzuckerspiegels erforderlich ist, ein Maß für die Insulinsensitivität. Im Clamp bestimmt man überwiegend die periphere Insulinsensitivität. Aufgrund der gleichzeitigen Infusion von Insulin und Glukose wird angenommen, daß die hepatische Glukoseproduktion komplett gehemmt ist und somit die infundierte Glukose im Steady-State die Menge der in den peripheren Geweben metabolisierten Glukose reflektiert (Monzillo und Hamdy, 2003).

Die Probanden erhielten nach einer zehnstündigen nächtlichen Nüchternphase während des ganzen Clamps eine intravenöse Infusion von 40 mU/m²/min humanen Insulins (Actrapid, Novo Nordisk, Bagsvaard, Dänemark) und variable Infusionen von 10 %iger Glukoselösung (Serag Wiessner, Naila, Deutschland). Dabei wurde die zu infundierende Insulinmenge im Verhältnis zur Körperoberfläche des Probanden berechnet. Die Glukoseinfusionsrate wurde alle fünf Minuten durch Messung des Blutzuckers eingestellt und der

Blutzuckerspiegel auf einem Niveau zwischen 4,0 mmol/l und 4,9 mmol/l gehalten. Eine konstante Glukoseinfusion über 20 min wurde als Steady-State-Rate angenommen. Nach Erreichen dieses Gleichgewichtszustands entspricht die infundierte Glukosemenge der Menge an Glukose, die vom Körper metabolisiert wird. Diese Metabolisierungsrate quantifiziert die Insulinsensitivität des Probanden und wird als M-Wert angegeben. Der M-Wert berechnet sich als mg Glukoseinfusion/min/kg Körpergewicht. Je höher der M-Wert, desto höher ist auch die Insulinsensitivität. Die Kaliumkonzentration des Blutes wurde vor und während des Clamps kontrolliert, um einer insulininduzierten Hypokalämie vorzubeugen. Eine Kaliumsubstitution war in den hier durchgeführten Studien nicht notwendig. Die Messung der kapillären Blutglukose erfolgte nach der Glukose-Oxidase-Methode mithilfe eines Meßautomaten (Dr. Müller Super GL, Freital, Deutschland).

Indizes der Insulinsensitivität

Homeostasis Model Assessment (HOMA)

Das HOMA-Modell ist ein mathematisches Modell der Interaktion von Insulin und Glukose und erlaubt mit einfachen Mitteln eine Aussage über die Insulinsensitivität des Probanden, wobei hohe Werte eine geringe Insulinsensitivität bedeuten (Matthews et al., 1985). Der HOMA-Index stellt den am häufigsten verwendeten Parameter zur Abschätzung der (vorwiegend peripheren) Insulinresistenz und β -Zellfunktion dar und wird aus den Nüchternwerten der Glukose (G_0) in mmol/l und des Insulins (I_0) in μ U/ml berechnet:

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = I_0 \times G_0 / 22,5$$

Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (Quicki)

Der Quicki-Index ist ein Parameter zur Abschätzung der Insulinsensitivität und wird ebenfalls aus Nüchternglukose- und Nüchterninsulinkonzentration berechnet (Katz et al., 2000):

$$\text{Quicki} = 1 / [\log(I_0) + \log(G_0)]$$

Continuous Infusion of Glucose with Model Assessment (CIGMA)

Das CIGMA-Modell stellt eine weitere Methode zur Berechnung der Glukosetoleranz, Insulinresistenz und der β -Zellfunktion dar. Es basiert auf den Insulin- und den Steady-State-angenäherten Glukosekonzentrationen nach kontinuierlicher Glukoseinfusion. Dabei werden geringe basale Insulinspiegel als Fehlerquelle für die Berechnung der Insulinresistenz umgangen (Hosker et al., 1985; Monzillo und Hamdy, 2003). Die CIGMA-Werte wurden mithilfe des Computerprogramms HOMA-CIGMA Version 2 berechnet, welches freundlicherweise von Dr. J. C. Levy zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.1.3 Bestimmung der Laborparameter

Für die Analyse verschiedener Blutparameter wurde das Blut der Probanden zunächst für 10 min mit 1000 x g bei 4 °C zentrifugiert und somit das Serum bzw. das EDTA-Plasma abgetrennt. Nach Aliquotierung erfolgte die Lagerung bei -80 °C bis zur Weiterverwendung.

Folgende Parameter des Fettstoffwechsels wurden kolorimetrisch bestimmt (COBAS MIRA, Roche Diagnostics): Gesamtcholesterol (ABX Pentra Cholesterol CP, ABX Diagnostics, Bedfordshire, UK), HDL-Cholesterol (ABX Pentra HDL Direct CP, ABX Diagnostics, Bedfordshire, UK), Triglyzeride (ABX Pentra Triglycerides CP, ABX Diagnostics, Göppingen, Deutschland) sowie die freien Fettsäuren (NEFA, Wako, Neuss, Deutschland). Das LDL-Cholesterol wurde mit der Friedewald-Formel berechnet (Friedewald et al., 1972):

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

Der HbA1c wurde mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie; Menari Diagnostics, Neuß, Deutschland) gemessen.

Adiponectin im Serum wurde mittels ELISA bestimmt (Biovendor, Nashville, USA). Die Insulinbestimmung erfolgte ebenfalls mittels ELISA (Merckodia AB, Uppsala, Schweden).

2.1.1.4 Diagnostik der Polymorphismen im Adiponectinpromotor

Zunächst wurde die genomische DNA aus dem Vollblut der Studienteilnehmer durch Magnetpartikelbindung mittels AGOWA®-mag-Maxi-DNA-Isolation-Kit (AGOWA GmbH) extrahiert. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die isolierte DNA-Menge wurde anschließend quantifiziert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Nach Etablierung von geeigneten Primern wurde ein spezifischer DNA-Abschnitt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Nach Kontrolle der DNA mittels Gelelektrophorese wurden die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. In Anlehnung an die „single nucleotide primer-extension“ (SNuPE)-Methode wurde der sogenannte SNP detection primer (S-Primer) exakt ein Basenpaar vor dem zu detektierenden Polymorphismus an das aufgereinigte Amplifikat angelagert. Dieser S-Primer wurde um genau ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid verlängert, welches in der nachfolgenden Sequenzierung am MegaBACE 1000 Sequenzer detektiert wurde.

Konkret wurden innerhalb dieser Arbeit zwei Promotorpolymorphismen im Adiponectin-gen bestimmt, zum einen der SNP ADIPOQ -11377 C/G (rs266729), zum anderen der SNP ADIPOQ -11391 G/A (rs17300539).⁵

⁵ Quelle der rs-Nummern: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp>

2.1.2 PCOS Fall-Kontroll-Studie

2.1.2.1 Charakterisierung der Studienkohorte

Es wurden 62 Frauen mit einem diagnostizierten Polyzystischen Ovarsyndrom in die Studie eingeschlossen. Die Kriterien für die Diagnosestellung eines PCOS umfaßten (1) das Vorhandensein einer chronischen ovulatorischen Dysfunktion wie Oligo- oder Amenorrhoe, (2) klinische Anzeichen einer Hyperandrogenämie wie Hirsutismus oder Akne, (3) den biochemischen Befund einer Hyperandrogenämie, definiert als Androgenspiegel (DHEAS, Gesamttestosteron, 17-OH-Progesteron, Androstendion) oberhalb der Höchstgrenze des jeweiligen Assays und/oder erhöhter LH/FSH Quotient und (4) der Ausschluß von anderen Erkrankungen. Bei zwei Patientinnen wurde eine Hashimoto Thyreoiditis diagnostiziert. Bei diesen Patientinnen erfolgte die Substitution von Schilddrüsenhormonen. Alle anderen Probanden hatten keinerlei Erkrankungen und nahmen keine Medikamente ein. Neun übergewichtige und insulinresistente Frauen aus dem PCOS-Kollektiv erhielten für 6 Monate dreimal täglich 850 mg Metformin und wurden nochmals untersucht.

2.1.2.2 Bestimmung der Laborparameter

Alle Frauen kamen innerhalb der ersten zehn Tage nach der Menstruation zur Untersuchung, wenn eine leichte Oligomenorrhoe vorlag, bei schwerer Oligo- oder Amenorrhoe waren die Untersuchungszeitpunkte zufällig. Die Blutabnahme erfolgte morgens nach einer Nüchternzeit von etwa 12 h. Die Blutproben wurden zentrifugiert und die Seren bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Insulinsensitivität erfolgte durch Kalkulation des HOMA-Modells und einer zweistündigen Glukoseinfusion mit dem CIGMA-Test.

Die Blutglukose wurde mit der Glukose-Dehydrogenase-Methode bestimmt (Hoffmann La Roche, Grenzach). Die Messung von Adiponectin im Plasma erfolgte durch einen Radioimmunoassay.

Im Rahmen dieser Studie wurden folgende endokrine Parameter im Serum erhoben: Insulin, luteinisierendes Hormon (LH), Progesteron, follikelstimulierendes Hormon (FSH), Östradiol, 17-OH-Progesteron, Gesamttestosteron, Sexhormon-bindendes Globulin (SHBG), Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS) und Androstendion. Alle serologischen Parameter wurden mit kommerziell erhältlichen Immunoassay-Kits bestimmt.

Zur Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde das Verfahren der Röntgenabsorptionsmessung (Dual-Energy X-ray Absorptiometry, DEXA, Lunar, USA) angewendet. Die unterschiedliche Absorption der Röntgenstrahlung durch verschiedene Körpergewebe erlaubt deren Differenzierung. Im Rahmen dieser Studie wurde die Gesamtkörperfettmasse in Gramm bestimmt sowie die Fettmasse des Rumpfs (Ausschluß der Kopffregion und der Extremitäten).

2.1.3 Interventionsstudie Insulin und Oligomere

2.1.3.1 Charakterisierung der Probanden

In die Studie wurden 10 weibliche und 13 männliche Probanden eingeschlossen, die Teil der MeSyBePo-Kohorte waren. Das Vorhandensein von Diabetes mellitus, Gefäßkrankheiten sowie Leber- und Nierenproblemen konnte ausgeschlossen werden. Weitere Ausschlusskriterien waren Alkoholmißbrauch sowie die regelmäßige Einnahme von Medikamenten.

Die anthropometrischen Daten wurden wie oben beschrieben erhoben. Die Probanden unterzogen sich zusätzlich einem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp.

2.1.3.2 Bestimmung der Laborparameter

Blutproben wurden vor und nach dem Clamp entnommen, in EDTA- oder Serummonovetten überführt, zentrifugiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. In den Blutproben wurden Glukose, Insulin, freie Fettsäuren, Gesamtcholesterol, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglyzeride mit dem COBAS MIRA der Firma Roche (Lörrach) gemessen. Insulin im Serum wurde mittels ELISA gemessen (DRG, Marburg). Die Bestimmung der Serum-Adiponectinkonzentration erfolgte ebenfalls mithilfe der ELISA-Methode (Biovendor, Nashville, USA). Die Adiponectin-Oligomere wurden mittels Western Blot bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.7).

2.1.4 Interventionsstudie Gewichtsreduktion

2.1.4.1 Charakterisierung der Probanden

An der Gewichtsreduktionsstudie nahmen insgesamt 17 übergewichtige Probanden teil, darunter 15 Frauen und 2 Männer. Die Intervention erstreckte sich über 6 Monate. Zu Beginn der Studie wurden alle Teilnehmer gründlich untersucht und im Falle einer Erkrankung von Leber, Niere oder Gefäßen von der Intervention ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlusskriterium stellte der insulinabhängige Diabetes mellitus dar. Eine der Teilnehmerinnen wies eine pathologische Nüchternglukose auf und wurde diätetisch behandelt. Zwei weitere Probanden mit Typ-2-Diabetes wurden mit Gliniden und Metformin bzw. mit Sulfonylharnstoffen behandelt. Thiazolidindione wurden nicht eingenommen.

2.1.4.2 Ernährungsintervention

Vor Beginn der Studie führten alle Studienteilnehmer ein Ernährungsprotokoll über 3 Tage. Der Ruheumsatz wurde mittels indirekter Kalorimetrie gemessen. Unter Berücksichtigung der individuellen Ernährungsgewohnheiten erhielten die Probanden eine Ernährungsberatung, bei der sie Empfehlungen für eine Reduktion der täglichen Energieaufnahme bekamen. Diese lag um 400 kcal bis 600 kcal unter dem jeweiligen Gesamt-

energieverbrauch (gemessener Grundumsatz + körperliche Aktivität). Den Probanden wurde eine eiweißreiche Mischkost empfohlen, die sich aus 50 % Kohlenhydraten, 30 % Fett und 20 % Proteinen zusammensetzte. Innerhalb der 6-monatigen Intervention trafen sich die Probanden wöchentlich für 2,5 Stunden über einen Zeitraum von 20 Wochen. An den ersten zehn Terminen führten Ernährungsberater für jeweils 90 min Gruppenschulungen mit praktischen Kochübungen durch. Während der folgenden neun Treffen wurden unter der Leitung einer Psychologin unter anderem Entspannungsübungen praktiziert. Eine letzte Schulung wurde von einem Arzt abgehalten, der die Probanden mit medizinischen Aspekten vertraut machte. Bei jeder Zusammenkunft wurden die letzten 60 Minuten für leichte Gymnastikübungen oder Wassergymnastik genutzt.

2.1.4.3 Bestimmung der Laborparameter

Die anthropometrischen Daten der Probanden wurden wie oben beschrieben erhoben. Zusätzlich wurde eine Bioelektrische Impedanz-Analyse (BIA) an den ruhenden Probanden durchgeführt. Dabei wird das „Drei-Kompartimentmodell“ zugrunde gelegt, in dem die Fettmasse (FM) sowie die fettfreie Masse Berücksichtigung findet, wobei letztere aus der Extrazellulärmasse (ECM) und der Körperzellmasse (BCM) besteht. Die Bioelektrische Impedanz-Analyse beruht auf unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeiten der einzelnen Gewebetypen und ermöglicht eine weitgehende Analyse der Körperzusammensetzung. Dazu wurden je zwei Elektroden am rechten Handrücken und am rechten Fußrücken plazierte und mit einem Schwachstrom ein elektromagnetisches Feld im Körper aufgebaut. Es folgte eine dreimalige Messung des Wechselstromwiderstandes Z (Impedanz) mit nachfolgender Bestimmung des Mittelwerts. Die Grundumsatzrate wurde nach einer 20-minütigen Ruhephase ermittelt. Die Messung erfolgte nach Erreichen des Steady-States für 5-10 Minuten. Alle Studienteilnehmer unterzogen sich zusätzlich einem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp (siehe Abschnitt 2.1.1.2). Die Insulinsensitivität (M-Wert) wurde berechnet als Glukoseinfusionsrate (mg/min) während des Steady-States, geteilt durch das Körpergewicht des jeweiligen Probanden.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine DNA-Grundtechniken

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Auf der Grundlage des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot d \cdot c$ ist es möglich, die Konzentration eines gelösten Stoffs zu bestimmen. Dabei mißt man in einem Spektralphotometer bei einer gegebenen Schichtdicke d die Absorption dieses Stoffs bei einer charakteristischen Wellenlänge, welche normalerweise dem Absorptionsmaximum entspricht. Der Extinktionskoeffizient ist dabei eine gegebene Stoffkonstante.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolge durch die Messung ihrer Absorption, verglichen mit dem Leerwert des jeweiligen Lösungsmittels, bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA bestimmt, wobei der Quotient der Extinktionen bei 260/280 nm bei größter Reinheit 1,8 beträgt.

2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können im Agarosegel mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeiten der negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Beweglichkeit von linearer DNA ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Das Ethidiumbromid in der Gelmatrix interkaliert in die Doppelhelix der DNA und erzeugt eine sichtbare Fluoreszenz im rot-orangen Bereich (560 nm) bei Anregung mit UV-Licht (260-360 nm).

In dieser Arbeit wurden 1 %ige Gele verwendet. Hierzu wurde Agarose eingewogen, mit TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Der Agaroselösung wurden 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml zugesetzt und in eine horizontale Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach Polymerisation der Gelmatrix erfolgte das Einsetzen der Gelkammer in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur und das Entfernen des Probenkamms. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt und neben Molekulargewichtsstandards in die Geltaschen pipettiert. Die DNA wurde bei einer konstanten Spannung von 100-120 V für ca. 60 min aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mithilfe eines LAS-1000 Image Readers (Fuji). Durch Vergleich der Laufstrecken der DNA-Fragmente mit den Längenstandards konnte die Größe der DNA-Fragmente annähernd bestimmt werden.

2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Aufreinigung der DNA aus dem Gel wurde das „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche benutzt und nach Angaben des Herstellers verfahren. Die DNA wurde mit H₂O_{bidest} eluiert und konnte für nachfolgende Experimente wie Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet werden.

2.2.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wird verwendet, um störende Proteine und Lipide aus der DNA-Lösung zu entfernen, so z.B. für nachfolgende Restriktionen. Phenol denaturiert die Proteine, während Chloroform neben der Proteindenaturierung auch die Phasengrenze stabilisiert. Die anschließende Ethanolfällung dient der Aufkonzentrierung der DNA sowie der Entfernung von Phenol- und Chloroformresten. Beim nachfolgenden

Waschen der DNA mit 70 %igem Ethanol werden Salze und kleine organische Moleküle entfernt.

Der Einsatz von Phenol und Chloroform erfolgte im Verhältnis 1:1. Da Volumina kleiner 100 µl schwer zu extrahieren sind, wurde die DNA-Lösung zu Beginn immer auf mindestens 100 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Zu dem DNA-Ansatz wurde eine gleiche Menge wassergesättigtes Phenol (pH 8) gegeben und mithilfe des Vortex gut gemischt. Anschließend erfolgte der Zusatz der gleichen Menge Chloroform und ein erneutes Mischen. Es schloß sich die Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 min bei voller Leistung (16.400 rpm) an, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und erneut mit Chloroform versetzt, so daß die restlichen Phenolreste entfernt wurden. Es erfolgte ein erneutes Abnehmen der wäßrigen Phase, die wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die DNA wurde in der Regel mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und der 2,5-fachen Menge an absolutem Ethanol gefällt. Die Mischung wurde für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 16.400 rpm und 4 °C konnte der Überstand sorgfältig abgenommen und mit 70 %igem Ethanol gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde erneut der Überstand abgenommen, das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in einer adäquaten Menge H₂O_{bidest} aufgenommen und resuspendiert.

2.2.2 Isolierung von DNA

2.2.2.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab erfolgte mithilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kits“ von Roche nach Anweisung des Herstellers. Dafür wurden aus einer 5 ml Übernachtskultur 2 ml Bakteriensuspension eingesetzt. Die Elution von den Säulchen erfolgte mit H₂O_{bidest}. Anschließend wurde eine Restriktionsanalyse mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt, um die erfolgreiche Isolation des gewünschten Plasmids zu belegen.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA für die Transfektion

Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983; Birnboim und Doly, 1979). Dieses Verfahren wird benutzt, um große Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit zu erhalten, die sich insbesondere für Anwendungen wie Transfektionen und Sequenzierungen eignen. Das verwendete Protokoll ist eine Modifikation der Methodik von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) sowie Ish-Horowicz und Burke (Ish-Horowicz und Burke, 1981). Dabei werden die Bakterien unter Anwesenheit von SDS und NaOH lysiert, wobei SDS die Bakterienproteine denaturiert und NaOH sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA denaturiert. Die Lösung wird mit Kaliumacetat neutralisiert. Die Proteine sowie die chromosomale DNA sind in

Komplexen zwischen SDS und Kalium eingeschlossen, die mittels Zentrifugation sedimentiert und entfernt werden. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann dann mittels Ethanol gefällt werden. Die 500 ml Bakteriensuspension wurde bei 5.000 rpm für 12 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 10 ml Lösung I resuspendiert, zusätzlich wurden 10 ml Lösung I mit 16 mg/ml Lysozym zugegeben. Es schloß sich eine Inkubationsphase von 15 min bei Raumtemperatur an. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 40 ml einer frisch hergestellten Lösung II. Die gesamte Suspension wurde durch Invertieren homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Lyse zu stoppen, wurden 30 ml der kalten Lösung III zugesetzt, kräftig gemischt und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der Bakterienzellreste erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 min mit 7.500 rpm bei 4 °C. Die renaturierte Plasmid-DNA-Lösung wurde anschließend filtriert und mit 55 ml Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Plasmid-DNA-Pellet in einer Lösung aus 1,93 g Ammoniumacetat in 8 ml TE-Puffer, resuspendiert und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min mit 15.000 x g bei 4 °C wurde der Überstand in neue Gefäße überführt und mit dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol gefällt. Anschließend wurde wieder zentrifugiert, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte über einen Caesiumchlorid-Gradienten. Hierzu wurden genau 1,1 g Caesiumchlorid sowie 80 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) je ml TE/DNA-Lösung zugegeben und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Nach der Ultrazentrifugation mit 70.000 rpm bei 20 °C über Nacht erfolgte das Abpipettieren der entsprechenden Ethidiumbromid-gefärbten Bande, in der die zirkuläre Plasmid-DNA enthalten war. Für eine größtmögliche Reinheit der Plasmid-DNA wurde die Ultrazentrifugation wiederholt. Anschließend konnte das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit TE-gesättigtem Butanol entfernt werden. Durch die Dialyse gegen TE-Puffer wurde das CsCl aus der DNA-Lösung beseitigt und die DNA durch Zugabe von einem Zehntel Ammoniumacetat (3 mol/l, pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 min mit 10.000 rpm bei 4 °C wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und dieser Waschschrift wiederholt. Das Pellet wurde getrocknet und in 200 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der DNA bei -20 °C.

2.2.3 Herstellung von rekombinanter DNA

2.2.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die kurze DNA-Sequenzen erkennen und innerhalb oder neben diesen spezifischen Sequenzen die doppelsträngige DNA mittels Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten. Restriktionen werden durchgeführt, um Vek-

toren vor der elektrophoretischen Auftrennung zu linearisieren oder um DNA-Fragmente für Klonierungen zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer nach den Vorgaben des Herstellers der jeweiligen Restriktionsenzyme verfahren. Der Verdau vollzog sich bei 37 °C für eine Stunde im empfohlenen Puffer. Dabei wurden in der Regel 1-5 Enzymeinheiten pro µg DNA eingesetzt. Anschließend konnte das Reaktionsgemisch in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Wenn keine unmittelbare Auftrennung im Gel erfolgte, wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms gestoppt, oder wenn dies nicht möglich war, durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung aufgereinigt. Wurde eine Restriktion mit zwei Enzymen mit verschiedenen Reaktionsbedingungen notwendig, erfolgte zunächst der Verdau mit einem Enzym, eine Ethanol-fällung der DNA und die anschließende Inkubation mit dem zweiten Enzym. Der Restriktionsansatz wurde in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und bei Bedarf die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die DNA-Isolierung wurde das „High Pure PCR Produkt Purification Kit“ von Roche verwendet und genau nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Eluierung erfolgte jeweils in 50 µl H₂O_{bidest.} Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Dephosphorylierung der DNA mit alkalischer Phosphatase

Um die Eigenligation der Vektorenden zu vermeiden, ist eine Dephosphorylierung des Vektors sinnvoll. Die alkalische Phosphatase bewirkt dabei die Hydrolyse von 5'-Phosphatresten der DNA. Nach Restriktion und Fällung des Vektors wurde dieser in 27 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen und mit 3 µl Phosphatasepuffer sowie 1 µl CIP (Calf Intestine Phosphatase) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Phosphatase anschließend bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Die Aufreinigung des dephosphorylierten Vektors erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung.

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Das kovalente Verknüpfen von zwei DNA-Strängen mittels einer Phosphodiester-Brückenbindung nennt man Ligation. Durch diese Reaktion ist es möglich, rekombinante DNA herzustellen. Für die hier durchgeführten Ligationsreaktionen wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die T4-Ligase ist in der Lage, unter Verwendung von ATP sowohl glatte als auch überhängende („klebrige“) Enden zu verbinden. Für die Reaktion wurden der linearisierte Vektor und das DNA-Fragment im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

Der Ligationsansatz enthielt 1 µl Ligationspuffer, 1 µl T4-Ligase und hatte ein Gesamtvolumen von 10 µl. Die Inkubation erfolgte für 20-24 h bei 16 °C.

2.2.3.5 Transformation von kompetenten Bakterien

200 µl kompetente *E. coli* Bakterien wurden unmittelbar vor dem Gebrauch auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 ng Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 90 sek bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Danach schloß sich die Zugabe von 500 µl sterilem LB-Medium an sowie die Inkubation dieser Suspension für weitere 15 min bei 37 °C. Im folgenden wurden die Bakterien bei 500 rpm für 2 min zentrifugiert und in 200 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert. Je nach Bedarf wurden 10-100 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Transformation von *E. coli* JM109 mit pGEM-Vektoren erfolgte mit dem Kit „pGEM-T Vector systems“ von Promega nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.6 Isolierung von Klonen mit rekombinantem Plasmid

Vereinzelte Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen 10 µl-Eppendorf Pipettenspitze gepickt und damit 5 ml steriles LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in 13 ml Sarstedt-Röhrchen mit luftdurchlässigem Deckel angeimpft. Die Röhrchen wurden anschließend im Warmluftschüttler bei 37 °C und starkem Schütteln von 200 rpm über Nacht inkubiert. Eine spezielle Variante der Isolierung von transformierten Bakterienkolonien stellt die Blau-Weiß-Selektion dar. Der pGEM-Vektor ist so konzipiert, daß die multiple Klonierungsstelle zwischen dem Promotor und dem Gen für die β-Galaktosidase (*lacZ*-Gen) liegt. Wird die Fremd-DNA nicht eingebaut, kann von dem davorliegenden *lac*-Promotor aus das Enzym β-Galaktosidase exprimiert werden. Dieses Enzym wiederum kann den dem Wachstumsmedium zugesetzten farblosen Substrat X-Gal in das entsprechende Indoxylderivat umwandeln, welches an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Wird also die Fremd-DNA erfolgreich in die multiple Klonierungsstelle eingebaut, kann die β-Galaktosidase nicht exprimiert werden, da der Promotor nun zu weit vom *lacZ*-Gen entfernt liegt. Diese Klone bleiben somit weiß und können gepickt werden. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird zusätzlich als Induktor zum Medium hinzugegeben, um die Wirkung des *lac*-Repressors aufzuheben, welcher die Expression des *lacZ*-Gens unterdrückt.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um *in vitro* spezifische DNA-Fragmente enzymatisch zu vervielfältigen (Saiki et al., 1985). Dem PCR-Ansatz werden zwei einander entgegengerichtete sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) im Überschuß beigefügt. Nach der Auftrennung der doppelsträngigen DNA mittels thermischer Denaturierung erfolgt die Abkühlung des Gemischs und damit die Anlagerungsreaktion (Annealing) der Oligo-

nukleotide an den jeweils komplementären Strang. Die Oligonukleotide stellen das freie 3'-OH-Ende für die anschließende DNA-Synthese durch die Polymerasen bereit. Die Polymerasen lagern sich an diese freien 3'-Enden an und synthetisieren zu den Einzelsträngen wieder die Komplementärstränge in 5'- nach 3'-Richtung (Elongation). Dieses führt zu einer exponentiellen Akkumulation der Ziel-DNA.

Eine PCR-Reaktionsmischung enthält die DNA-Matrize, zwei antiparallele Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie einen geeigneten PCR-Puffer. Für das Gelingen der PCR ist die Konzentration von Magnesiumchlorid von entscheidender Bedeutung, da es die Stabilität der Polymerase sowie die Anlagerungsspezifität der Primer beeinflusst. Die Temperatur der Annealing-Reaktion ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer, die Länge der Extensionszeit hängt von der Größe des Amplifikates ab. Man rechnet mit einer Minute pro 1 kb DNA. Als Matrize wird eine genomische DNA-Menge von >100 ng eingesetzt.

Für die Isolation des Adiponectinpromotors aus humaner DNA wurden jeweils 100 ng DNA eingesetzt. Für die Amplifizierung des 2100 kb großen Promotorabschnitts kamen die Primer „Adiponectinpromotor vorwärts“ und „Adiponectinpromotor rückwärts“ zum Einsatz. Der Mastermix sowie das Programm für die Durchführung der PCR sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Kontrolle der Promotoramplifikate erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel. Für die nachfolgende Klonierung wurde das PCR-Produkt direkt aus dem Reaktionsgefäß aufgereinigt.

Tabelle 4. Zusammensetzung des Mastermixes für die Amplifikation des humanen Adiponectinpromotors sowie das dazugehörige PCR-Programm.

Mastermix einfach		PCR-Programm		
cDNA	2 µl	1	HOLD 96°	ENTER
H ₂ O _{bidest}	37,5 µl	2	T = 96°	0:02:00 Denaturierung
PCR-Puffer 10x	5 µl	3	T = 96°	0:00:45 Denaturierung
MgCl ₂	2 µl	4	T = 60°	0:01:00 Annealing
Primer vorw.	1 µl	5	T = 72°	0:02:00 Elongation
Primer rückw.	1 µl	6	GOTO 3	REP 45
dNTPs	1 µl	7	T = 72°	0:10:00 Ende der Elongation
Taq	0,5 µl	8	HOLD 4°	ENTER Lagerung
Σ	50 µl			

2.2.5 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung der DNA wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Hierbei werden in einem PCR-ähnlichen Verfahren komplementäre Einzelstränge zu den DNA-Matrizen erzeugt. Im Gegensatz zu einer PCR wird jeweils nur ein einzelner Primer verwendet, wobei die Menge der Sequenzierungsprodukte linear zur Zyklusmenge ansteigt. Das Reaktionsgemisch enthält neben normalen Desoxyribonukleosidtriphosphaten eine geringe Menge an modifizierten Nukleotiden, die sogenannten Terminatoren. Diese Didesoxy-Terminatoren (2',3'-Didesoxyribo-

nukleosidtriphosphate ddG, ddA, ddT, ddC) sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Prober et al., 1987; Zagursky und McCormick, 1990) und zeichnen sich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe jeweils am 2'- und 3'-C-Atom aus. Im Falle einer Verlängerung durch die Polymerase führt das Vorhandensein der ddNTPs zum Strangabbruch, da die Phosphodiesterbindung in Ermangelung der Hydroxylgruppe nicht mehr ausgebildet werden kann. Aufgrund der Anwesenheit der Terminatoren erhält man ein Gemisch zahlreicher, nahezu normalverteilter DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge, die durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung in einer hochauflösenden Gelelektrophorese zu detektieren sind.

Die Sequenzierung im MegaBACE 1000 Gerät beruht auf der Kapillartechnik, wobei die Gelelektrophorese in 35 µm dünnen Glaskapillaren stattfindet, die mit einer Polyacrylamid-Matrix beladen sind. Durch Anlegen einer hohen Spannung wird ein Teil der markierten DNA-Proben elektrokinetisch in die Kapillaren injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fluorescein absorbiert die Lichtenergie vom Laserstrahl und überträgt diese auf die Fluoreszenzfarbstoffe desselben Terminatormoleküls. Da die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe ihre Absorptionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen haben, können die jeweiligen Nukleotide, die zum Strangabbruch geführt haben, spezifisch detektiert werden.

Die Aufbereitung der Proben für die Sequenzierung erfolgte nach Anleitung der Firma Amersham. Zunächst wurde die DNA in der Sequenzierungsreaktion vervielfältigt. Dabei sollte die Menge an doppelsträngiger DNA zwischen 0,2 und 2 µg pro Reaktionsansatz liegen. Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 pmol/µl eingesetzt. Die Proben durchliefen 20-30 Zyklen mit folgenden Bedingungen: 95 °C für 20 s, 50°C für 15 s, 60 °C für 1 min. Nach der Sequenzierung wurde die DNA nach Angaben des Herstellers gefällt, in „Loading Buffer“ aufgenommen, in 96-well-Platten pipettiert und sequenziert. Für eine komplette Sequenzierung des Adiponectinpromotors im Vektor wurden drei Primerpaare (SNP „Sequenzierprimer vorwärts/rückwärts“ sowie „Durchsequenzierung 2 bzw. 3 vorwärts/rückwärts“, siehe Abschnitt 2.3.2) verwendet, um die gesamte Länge des Promotors abzudecken.

2.2.6 Expressionsstudien *in vitro*

2.2.6.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) und murinen Fibroblasten (3T3-L1-Zellen) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter kontrollierten und sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Das Zellkulturmedium bestand für beide Zelllinien aus 90 % DMEM, 10 % FCS sowie einem Antibiotikum. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3 bis 4 Tage unter der Sterilbank bei 70-80 %iger Konfluenz der Zellen. Dazu wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette

abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit 0,25 % Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, um die Trypsinierung zu stoppen. Nach Verdünnung mit Medium im Verhältnis 1:4 bis 1:8 wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Für alle Experimente im Rahmen dieser Dissertation wurden Zellpassagen von P5 bis P50 verwendet.

2.2.6.2 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion wurde mithilfe des „FuGENE 6 Transfection Reagent“ der Firma Roche durchgeführt, einem nicht-liposomalen Multikomponenten-Transfektionsreagenz. Das Transfektionsreagenz bildet dabei mit der DNA Komplexe, die anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen geerntet und deren Zellvitalität über den Trypan-Blau-Ausschlußtest kontrolliert. Anschließend erfolgte die Aussaat in 24-well-Platten, wobei die Zellzahl von der Zellart abhängig war. Um eine Konfluenz von 50 % bis 80 % zum Zeitpunkt der Transfektion zu erreichen, wurden bei der Untersuchung von HEK-Zellen 50.000 Zellen ausgesät, bei den 3T3-L1-Zellen aufgrund ihres schnelleren Wachstums jedoch nur 15.000 Zellen pro well. Die Transfektion erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Es wurde ein Verhältnis von 3:1 von FuGENE Reagenz (μl) zu DNA (μg) gewählt. Die Zellen wurden für weitere 24 h mit dem Transfektionsreagenz kultiviert, bevor nachfolgende Reporteragen-Assays durchgeführt wurden. Im Rahmen der Untersuchung metabolischer Stimuli auf die transkriptionelle Aktivität des Adiponectin-promotors schloß sich eine Inkubation der Zellen mit verschiedenen Reagenzien an.

2.2.6.3 Stimulation von HEK-Zellen

HEK-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Insulin, Rosiglitazon, Fettsäuren oder $\text{TNF}\alpha$ inkubiert, oder im Falle der Stimulation mit Glukose in Zellmedien mit unterschiedlicher Glukosekonzentration. Dazu wurden zunächst die Zellkulturmedien (jeweils mit gestripptem FCS, welches durch Inkubation mit Aktivkohle-Dextran-Lösung für 30 min bei 50 °C und anschließender Zentrifugation [30 min, 10.000 g, 4 °C] und Sterilfiltration hergestellt wurde) mit dem jeweiligen Stimulus unter sterilen Bedingungen hergestellt, die alten Medien von den Platten abgesaugt und 500 μl des entsprechenden neuen Mediums pro well aufgebracht. Es folgte eine weitere Inkubation für 24 h bzw. im Falle der Fettsäuren für 48 h im Brutschrank, bevor der Luziferase-Assay durchgeführt wurde.

Glukose

Es wurden zwei verschiedene Zellkulturmedien hergestellt, eines mit einer physiologischen Glukosekonzentration von 5,5 mmol/l und eines mit hoher Glukosekonzentration von 25 mmol/l. Dazu wurde die Glukose direkt im Medium gelöst.

Insulin

Bovines Insulin wurde eingewogen und mit 1x PBS eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM/l hergestellt. Es erfolgte eine Verdünnung von 1:10 bzw. 1:100 mit PBS,

so daß zwei Lösungen mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 10 $\mu\text{mol/l}$ entstanden. Die Zellen wurden anschließend 1:1000 mit beiden Insulinlösungen inkubiert, wodurch die Endkonzentration von Insulin im Zellkulturmedium 100 nmol/l bzw. 10 nmol/l betrug. Als Kontrolle diente 1x PBS.

Rosiglitazon

Rosiglitazon wurde mit sterilfiltriertem DMSO gelöst und eine Stammlösung von 10 mM/l hergestellt. Es erfolgte eine weitere Verdünnung mit DMSO auf 5 mM/l und eine Inkubation der Zellen mit der Gebrauchslösung im Verhältnis 1:1000, so daß sich eine Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ Rosiglitazon bzw. 0,1 % DMSO ergab. Als Kontrolle diente Rosiglitazon-freies Medium mit 0,1 % DMSO.

Fettsäuren

Die freien Fettsäuren Palmitat, Oleat und Linoleat wurden zunächst an fettfreies BSA gebunden. Dazu wurden 10 g BSA in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurde eine Lösung mit einem Gesamtvolumen von 10 ml hergestellt, die 10 mmol/l der jeweiligen Fettsäure sowie 10 mmol/l NaOH und den BSA-haltigen Krebs-Ringer-HEPES-Puffer enthielt. Die Lösung wurde unter Stickstoffatmosphäre verpackt und über Nacht bei 37 °C gerührt, anschließend bei 10.000 g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Zuletzt erfolgte eine Konzentrationsmessung der albumingebundenen Fettsäuren im COBAS MIRA.

Die Fettsäuren wurden zum Zellkulturmedium mit einer Endkonzentration von 200 mmol/l gegeben. Als Kontrolle diente fettfreies BSA. Die Inkubation erfolgte für 48 h im Brutschrank.

TNF α

TNF α lag als Verdünnung (50 $\mu\text{g/ml}$) in 1x PBS vor. Daraus wurden zwei Stammlösungen mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ in 1x PBS hergestellt. Die Zellen wurden dann 1:1000 mit TNF α inkubiert, was einer Endkonzentration von 20 ng/ml bzw. 40 ng/ml entsprach. Als Kontrolle diente 1x PBS.

2.2.6.4 Dualer Luziferase-Assay

Der duale Luziferase-Reporterassay dient der Messung der eukaryotischen Genexpression. Beim dualen Assay werden gleichzeitig zwei verschiedene Reporterenzyme exprimiert und gemessen. Zum einen handelt es sich um das experimentelle Reporterenzym Firefly-Luziferase (aus dem Leuchtkäfer), dessen Expression von den gegebenen experimentellen Bedingungen abhängt, zum anderen um das kotransfizierte Kontrollreporterenzym Renilla-Luziferase (aus der Leuchtqualle), das als interne Kontrolle dient und Schwankungen der Zellvitalität, Transfektionseffizienz sowie der Effizienz der Zellyse ausgleicht. Beide Enzyme katalysieren Oxidationsreaktionen, bei denen biolumineszente Lichtemissionen erzeugt werden, welche im Luminometer in Form von relativen Lichteinheiten (RLU, relative light unit) gemessen werden.

In dieser Arbeit wurde der pGl3-Basic-Vektor (Promega) als experimentelles Reportergenkonstrukt verwendet, da er das Gen für die Firefly-Luziferase enthält. Als Kontrollvektor diente der phRL-TK-Vektor (Promega), welcher das Gen der Renilla-Luziferase kodiert. Für die Durchführung der Versuche kam das Kit „Dual-Luciferase Reporter Assay“ der Firma Promega zur Anwendung. Nach Transfektion der Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen. Um restliche Mediumreste zu beseitigen, erfolgte das Waschen der Zellen mit 1x PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 80 µl „Passive Lysis Buffer“ (PLB) lysiert und dann für mindestens 15 min auf einen Plattenschüttler gestellt. Die lysierten Zellen in PLB wurden in ein Reaktionsgefäß übernommen und bei maximaler Umdrehungszahl für 2 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 20 µl auf eine 96-well-Platte pipettiert und zur Messung in den Fluoreszenzreader „Wallac Victor2“ gegeben. Das Programm beinhaltete die Zugabe von 35 µl „Luciferase Assay Buffer II“, ein Schütteln von 2 sek und eine Pause von 2 sek, gefolgt von der Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität, Zugabe von 35 µl „Stop & Glo“-Substrat in Puffer, gefolgt von einem 2 sek langen Schütteln und einer Pause von 10 sek, mit anschließender Messung der Renilla-Luziferase-Aktivität. Für die Berechnung wurden die relativen Lichteinheiten der Firefly-Luziferase durch den Wert für die Renilla-Luziferase geteilt. Anschließend wurde die Promotoraktivität des Leervektors als 100 % angenommen und mit der Aktivität der Promotorkonstrukte verglichen.

2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.2.7.1 Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, oder auch Western Blot genannt) wurde zur Auftrennung von Proteingemischen verwendet. Das stationäre Trennmedium Polyacrylamid ist chemisch inert und übt kaum zwischenmolekulare Wechselwirkungen auf Proteine aus. Proteine tragen sowohl positive als auch negative Ladungen, welche von den ionisierbaren funktionellen Gruppen stammen und die Fähigkeit ausmachen, im elektrischen Feld zu wandern. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrer Molekülgröße unabhängig von der Ladung aufgetrennt, da die SDS-Proteinkomplexe ein einheitliches Ladungs-Masse-Verhältnis besitzen.

Kurz vor dem jeweiligen Versuch wurden die Polyacrylamidgele gegossen. Die Gelzusammensetzung ist in Tabelle 5 dargestellt. Zunächst erfolgte die Herstellung des Trenngels. Dieses mußte ca. 45 min polymerisieren, bevor es mit dem Sammelgel überschichtet werden konnte. Für die Polymerisierung des Sammelgels mußten erneut ca. 30 min einkalkuliert werden. Konnten die Gele nicht sofort verwendet werden, wurden sie maximal eine Nacht lang bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 5. Gelzusammensetzung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O _{bidest}	15 ml	6,8 ml
Lower Tris	9,5 ml	-
Upper Tris	-	3,0 ml
Acrylamid	12,5 ml	2,0 ml
SDS	375 µl	120 µl
APS	250 µl	120 µl
Temed	25 µl	20 µl

Mithilfe des Western Blots sollte die Oligomerverteilung des Adiponectins untersucht werden. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die humanen Serumproben 1:10 mit H₂O_{bidest} verdünnt. Auf eine Messung der Gesamtproteinkonzentration wurde verzichtet, da keine absolute Quantifizierung notwendig war und nur relative Anteile bestimmt werden sollten. In dieser Arbeit kamen nicht-reduzierende und nicht-Hitze-denaturierende Bedingungen zum Einsatz, um die Oligomerkomposition der Proteine in einem möglichst nativen Zustand zu belassen. Dafür mußte die Serumprobe zunächst 1:4 mit einem 4x Probenpuffer in Anlehnung an Hironori Waki (Waki et al., 2003) verdünnt werden, der ohne DTT und Mercaptoethanol hergestellt wurde, um das Aufbrechen von Schwefelbrückenbindungen im Protein zu vermeiden. Auf eine Hitzedenaturierung vor dem Auftragen auf das Gel konnte ebenfalls verzichtet werden. Es wurden jeweils 20 µl Probe und 3 µl Längenstandard auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte in Proteingel-Laufpuffer für 2 h bei einer Spannung von 100 V.

2.2.7.2 Immunblot

Unter dem Proteinblotting versteht man die elektrophoretische Übertragung der Proteine eines Gels auf eine Membran (hier PVDF). Die Proteine werden immobilisiert und damit das elektrophoretische Bandenmuster auf der Membran fixiert. Der Transfer der Proteine wurde mittels Elektroblothing vollzogen. Dabei kam die Semi-Dry-Blotting Variante zum Einsatz, bei welcher der Transfer der Proteine horizontal zwischen zwei Graphitplatten stattfindet. Die PVDF-Membran wurde vor der Elektrophorese mit Methanol aktiviert. Es wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (Kyhse-Andersen, 1984). Auf die untere Platte (Kathode) wurden fünf in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, darauf das vom Sammelgel befreite und in Kathodenpuffer getränkte Gel, gefolgt von der Membran in Anodenpuffer 2, gefolgt von vier Lagen in Anodenpuffer 2 getränkte und 2 Lagen in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere. Auf dieses „Sandwich“ wurde anschließend die Anodenplatte gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 100 mA und 20 V für 45 min.

Nach dem Transfer bleibt die Immunreaktivität der Proteine erhalten, wodurch man sie anschließend mit spezifischen Antikörpern nachweisen kann. Das Prinzip der immunologischen Identifizierung von Proteinen beruht zunächst auf der Zugabe des mono-

spezifischen Erstantikörpers vom Kaninchen, welcher mit dem gesuchten Protein Antigen-Antikörper-Komplexe bildet. Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten polyspezifischen Antikörpers gegen Kaninchen IgG, wobei erneut Antigen-Antikörperkomplexe entstehen. Da das zu identifizierende Protein nunmehr mit Peroxidase markiert ist, kann man die spezifischen Proteinbanden mittels einer Peroxidase-katalysierten luminometrischen Reaktion sichtbar machen.

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur (RT) bzw. über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper gegen Adiponectin (1:500 in TBS-T, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) inkubiert und anschließend 4x sorgfältig in TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten polyklonalen Ziege anti-Kaninchen Zweitantikörper (1:4.000 in TBS-T, DakoCytomation, Dänemark) für 1 h bei RT und ein erneutes Waschen der Membran. Als Detektionssystem diente das „Phototype®-HRP Western Blot Detection System“ von Cell Signaling/New England Biolabs. Die Detektionslösung wurde nach Firmenangaben hergestellt und die Membran darin für 1 min inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde anschließend entfernt, die Membran mit einer durchsichtigen Folie bedeckt und die Lichtemission im „Fujifilm Luminescent Image Analyzer“ detektiert und fotografiert.

2.2.7.3 Kompetitionsassay

Um den Nachweis zu erbringen, daß die dargestellten Proteinbanden im Western Blot das Ergebnis spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen sind, wurde ein Antikörper-Kompetitionsassay durchgeführt. Dazu wurde der Erstantikörper mit einem Exzess (molares Verhältnis 100:1) an spezifischem Antigen vorinkubiert, um die Sättigung aller möglichen Antikörper-Bindungen zu erreichen. Eine Inkubation mit der Kompetitionslösung resultiert danach ausschließlich in unspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen, deren Banden mit denen aus den Western Blots ohne vorherige Konkurrenz verglichen werden können.

Konkret wurden 2,5 µl Adiponectin-Antikörper (100 ng/µl, R&D Systems) mit 100 µl rekombinantem Adiponectin (100 ng/µl, R&D Systems) zunächst 2 h bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4 °C bei 16.400 rpm, wodurch die entstandenen Immunkomplexe pelletiert wurden. Der Überstand wurde mit TBS-T auf 2,5 ml aufgefüllt. Im Kontrollansatz wurde das rekombinante Protein durch 1x PBS ersetzt.

2.2.7.4 Auswertung

Die Auswertung der Western Blots erfolgte densitometrisch. Mithilfe der Software „AIDA“ wurden die spezifischen Oligomerbanden einer Probe eingerahmt und deren Intensitäten gemessen. Das Programm berechnete dabei das Integral aus der Intensität der

eingerahmten Bildpunkte über der gewählten Fläche. Zusätzlich erfolgte eine Korrektur des Wertes für den jeweiligen Hintergrund.

Die Intensitäten aller Proteinbanden einer Probe wurden summiert und deren jeweiliger Anteil an der Gesamtintensität berechnet. Neben diesen relativen Anteilen der Adiponec-tin-Oligomere wurden zusätzlich die absoluten Werte kalkuliert. Dazu wurde die mittels ELISA gemessene Adiponec-tinkonzentration als 100 % gesetzt und aus den relativen An-teilen der Oligomere die absoluten Adiponec-tinmengen der jeweiligen Oligomer-Fraktion errechnet.

2.2.8 Statistische Auswertung

Für die Datenanalyse wurde das Computerprogramm SPSS für Windows Version 12,0 verwendet (SPSS, Chicago, IL, USA). Die Angaben erfolgten als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler.

Die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests überprüft und erfolgte unter Verwendung der folgenden Internetseite:

http://www.kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetik/applets/kitest.htm

Alle Variablen wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine Normalverteilung geprüft. Waren die Parameter nicht normalverteilt, wurden sie logarithmiert und anschließend nochmals auf eine Normalverteilung geprüft.

Mittelwertvergleiche normalverteilter Größen erfolgten mittels T-Test (beim Vergleich zweier Variablen) oder einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (beim Vergleich mehrerer Variablen). Im Falle von nicht normalverteilten Variablen wurden entweder der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von zwei Stichproben oder der H-Test nach Kruskal-Wallis zum Vergleich von mehreren Stichproben verwendet.

Bei den genetischen Analysen in der MeSyBePo-Kohorte wurden signifikante Mittelwertunterschiede mit anschließender linearer Regression für die Parameter Alter, Geschlecht und BMI adjustiert.

Bei den Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson im Falle von normalverteilten Variablen berechnet, im Falle von nicht normalverteilten Variablen jedoch der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman.

Multivariate lineare Regressionsanalysen wurden durchgeführt, um Faktoren herauszufiltern, die einen unabhängigen Einfluß auf eine gewählte abhängige Variable haben. Dabei kam innerhalb der MeSyBePo-Studie jeweils das Rückwärtsverfahren zum Einsatz, bei dem schrittweise alle nicht signifikanten Variablen ausgeschlossen werden. Ansonsten erfolgte die Analyse mit dem Einschlußverfahren.

Ein zweiseitiges Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

2.3 Materialien

2.3.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Medien

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α TM	Invitrogen (Library Efficiency® DH5 Competent Cells) Genotyp: F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -)
<i>E. coli</i> JM109	Promega (JM109 Competent Cells, High Efficiency) Genotyp: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), F', traD36, proAB ⁺ , laqI ^q Z Δ M15], λ -

Escherichia coli ist ein stäbchenförmiges Bakterium mit einem zirkulären Chromosom von ca. 3 Millionen Basenpaaren, das in Minimalmedien wächst. In angereichertem Medium beträgt die Verdopplungszeit 20-30 Minuten.

Bakterienmedien

LB-Medium	1 % Casein-Hydrolysat, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,0
LB-Agar-Amp-Platten	LB-Medium mit 1,25 % Bacto-Agar und 100 μ g/ml Medium Ampicillin
LB-Agar-Amp-IPTG-X-Gal-Platten	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar, 100 μ g/ml Medium Ampicillin, 0,5 mM/1 IPTG und 80 μ g/ml X-Gal

Die Medien wurden autoklaviert und das Antibiotikum erst nach Abkühlung auf unter 50 °C zugegeben. Die Platten mit Ampicillin wurden bei 4 °C gelagert, da Ampicillin bei Raumtemperatur seine Wirksamkeit verliert.

Zelllinien

HEK-293-Zellen	Humane Embryonale Nierenzellen, ATCC Nummer: CRL-1573 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-77, 1977)
3T3-L1-Zellen	Maus-Fibroblasten-Zelllinie

Zellmedien

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Tavanic	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Bad Soden
Trypsin-EDTA	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Trypan-Blau-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt

2.3.2 Primer, Vektoren, Plasmide

Primer

(Herstellung der nachfolgenden Primer von der Firma Invitrogen [Carlsbad, Kalifornien])

Adiponectinpromotor vorwärts	ATT CGG TAC CAT AGG GAT TTT TAG TTA GAC AG
Adiponectinpromotor rückwärts	AAG CCT CGA GTG CAG TCA GAA TGG AAG T

SNP Sequenzierprimer vorwärts	TTG CCC TGC CTC TGT CTG AGA A
SNP Sequenzierprimer rückwärts	ACC CAG CTC TGG CCT AGA AGC A
Durchsequenzierung 2 vorwärts	CAC GCC CGG CTA TTT CTG CAT TT
Durchsequenzierung 2 rückwärts	TCA GGA GTT TGA GAC CAG T
Durchsequenzierung 3 vorwärts	CTG TGG TGT GAT AAT TGG CGT CC
Durchsequenzierung 3 rückwärts	CCC TCC CAT AGA TTT GCC CTA A
pGl3 up	CTT CGC TAT TAC GCC AGC CCA AG
pGl3 low	CAG CGT AAG TGA TGT CCA CCT CG
Adi SNPs up	GTC TTG TTG AAG TTG GTG CTG G
Adi SNPs low	ATA GAG CAC ATC CTC CAC TCT CTG
Adi 11377 S-Primer	CAT GTT TTG TTT TTG AAG
Adi 11391 S-Primer	GAA TGT GTG GCT TGC AAG AAC C

Vektoren und Plasmide

pGEM-T-easy-Vektor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pGl3-Basic-Vektor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
phRL-TK-Vektor	Promega Corporation, Madison, WI, USA

2.3.3 Enzyme, Antikörper, Längenstandards

Enzyme

Alkalische Phosphatase CIP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>KpnI</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
T4-DNA-Ligase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
<i>XhoI</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Antikörper

Anti-human Adiponectin/Acrp30 Antibody	R&D Systems
HRP-konjugierter Anti-Ziegen IgG	Dako Denmark A/S

DNA- und Protein-Längenstandards

100 bp DNA Ladder (0,5 µg/ml)	Fermentas Inc., Burlington, Kanada
1 kb DNA Ladder (0,5 µg/ml)	Fermentas Inc., Burlington, Kanada
Biotinylated Protein Ladder (10-200 kDa)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

2.3.4 Kommerzielle Reaktionssysteme

ABX Diagnostics Cholesterol	ABX Diagnostics, Göppingen
ABX Diagnostics Glucose HK 125	ABX Diagnostics, Göppingen
ABX Diagnostics HDL Cholesterol Direct	ABX Diagnostics, Göppingen
ABX Diagnostics Triglyzerides	ABX Diagnostics, Göppingen
Androstendion RIA	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
AutoSeq96-Dye-Terminator-Clean-up-Kit	Amersham Biosciences, NY, USA
DHEAS Chemoluminiszenz Immunoassay	Nichols Institute Diagnostics, Bad Nauheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Exogenes Humaninsulin, Actrapid	NOVO Nordisk Pharma GmbH, Mainz
FSH IRMA	BioChem Immunosystems, Freiburg
FuGENE 6™ Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glukose-Lösung Dextro O.G.-T. 300 ml	Hoffmann La Roche, Grenzach
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Human Adiponectin ELISA	BioVendor Laboratory Medicin, Inc. Brno, Tschechien
Human Adiponectin RIA	LincoResearch, St. Charles, USA
Insulin ELISA	Mercodia AB, Uppsala, Schweden
Insulin RIA	Pharmacia, Freiburg
LH Chemoluminiszenz Immunoassay	Bayer Diagnostics, Fernwald
Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MegaBACE™ DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA
MegaBACE™ SNUPe™ Genotyping Kit	Amersham Biosciences, NY, USA
NEFA C, ACS-ACOD-MEHA-Methode	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Östradiol RIA	Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim
Phototype®-HRP Western Blot Detection System	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
pGEM-T Vector systems	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Progesteron Chemoluminiszenz Immunoassay	Bayer Diagnostics, Fernwald
17-OH-Progesteron RIA	Schering, Berlin
SHBG RIA	Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim
Testosteron RIA	Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim

2.3.5 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid	Merck KGaA, Darmstadt
Adiponectin, human rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Agarose SeaKem® LE	Cambrex Bio Science Rockland Inc., USA
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin (D-[-]- α -Aminobenzylpenicillin Sodium Salt)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bisacrylamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
BSA, Fraction V, fatty acid free	PAA, Linz, Österreich

Butanol (1-Butanol)	Merck KGaA, Darmstadt
Caesiumchlorid	Boehringer Mannheim GmbH
Casein-Hydrolysat	Gibco/Life Technologies Paisley/Scotland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
D-Glukose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
dNTPs, 100 mM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat, Titriplex®III)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (absolut)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid, aqueous solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt (Select Yeast Extract)	Gibco/Life Technologies Paisley/Scotland
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt
Insulin (vom bovinen Pankreas)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Interleukin-1 β , human rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Interleukin-6, human rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Ladepuffer für DNA-Proben, 6x	Fermentas Inc., Burlington, Kanada
Linoleat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lysozym (Muramidase, from hen white egg)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Oleat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Palmitat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween-20)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Pyronin Y	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rosiglitazon	Glaxo Smith Kline, USA
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Select Agar	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TNF α , human rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.3.6 Standardpuffer und -lösungen

Acrylamid-Stammlösung (30%)	29,2% Arylamid, 0,8% Bisacrylamid
Aktivkohle-Dextran-Lösung	3,5 mmol/l NaCl, 125 mg Aktivkohle, 12,5 mg Dextran in 25 ml H ₂ O _{bidest}
Anodenpuffer I	300 mmol/l Tris-Base, 20 % Methanol
Anodenpuffer II	20 mmol/l Tris-Base, 20 % Methanol
Kathodenpuffer	100 mmol/l Arginin, 0,01 % SDS
Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	1 mmol/l CaCl ₂ , 5 mmol/l NaHCO ₃ , 25 mmol/l HEPES (pH 7,4), 135 mmol/l NaCl, 3,6 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l NaH ₂ PO ₄ , 0,5 mmol/l MgSO ₄ , 2,8 mmol/l D-Glukose, pH 7,4
Lösung I	50 mmol/l Glukose, 25 mmol/l Tris, 10 mmol/l EDTA, pH 7,9
Lösung II	0,2 N NaOH, 1 % SDS, in H ₂ O _{bidest}
Lösung III	3 mol/l Kaliumacetat in H ₂ O _{bidest} , pH 5,5
Lower Tris (1,5 M)	1,5 mol/l Tris-Base, pH 8,8
Proteingel-Laufpuffer (10x)	250 mmol/l Tris-Base pH 8,6, 1 % SDS, 2 mol/l Glycin
Protein-Probenpuffer (1x)	50 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8, 3 % SDS, 10 % Glycerol, 0,04 % Pyronin Y
TAE-Puffer (50x)	2 mmol/l Tris-Acetat, 0,05 mol/l EDTA, pH 8,0
TBS-T	10 mmol/l Tris-Base, 150 mmol/l NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 8
TE-Puffer	10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8
Upper Tris (0,5 M)	0,5 mol/l Tris-Base, pH 6,8

2.3.7 Laborgeräte

Autoklav	Varioklav®	H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Bakterienbrutschrank	BB 16	Heraeus Instruments, Hanau
Blot Apparatur	High Voltage Power Pack P30 und Graphitplatten	Biometra, Göttingen
COBAS MIRA		Roche Diagnostic, Mannheim
ELISA-Reader	Wallac Viktor2™, 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer Life and Analyt. Sciences, Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammern, Gelschlitten und Kämmen		Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Gelkammer vertikal	Mini PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heizplatte	RET basic	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Kamera Gel Imager Fujifilm	LAS-100 CH	Fuji Photo Film Co. Ltd, Japan
Kleinschüttler (Vortex)	VF2 (Janke & Kunkel)	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Kühlzentrifuge	5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop	Leitz DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Netzgeräte	Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
pH-Meter		Schott Geräte GmbH, Hofheim
Pipetten	diverse	Eppendorf AG, Hamburg

Schüttler Bakterien	Inkubationshaube TH 30 (Edmund Bühler)	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Schüttler Blot	Tumbling Table WT 12	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Sequenzier	MegaBACE 1000	Amersham Life Science, Freiburg
Spektrometer	GeneQuant pro	Biochrom, England
Sterilbank	Hera Safe HS 12	Kendro, Heraeus-Instruments, Asheville, USA
Thermocycler	Mastercycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall® Discovery™ M120 SE (Microultrazentrifuge)	Hitachi, Kendro Laboratory Products GmbH
Waage	LP 5200 P	Sartorius, Göttingen
Zellkulturinkubator	Hera Cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge	Sorvall® RC-5C Plus (Superspeed Refrigerated Centrifuge)	Kendro Laboratory Products, Newton, CT, USA

2.3.8 Molekularbiologische Hilfsmittel / Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane	Spectrum Laboratories Inc., CA, USA
Einmalspritzen	2 ml, 20 ml, 50 ml	Braun, Melsungen
Filter	Faltenfilter Filtrak ecoLab	NeoLab, Heidelberg
Filterpapier	Whatman 3MM Chr	Whatman International Ltd., Brentford, England
Lumineszenz-Platte	LIA-Platte, 96 well	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Neubauer Zählkammer		Fein-Optik, Bad Blankenburg
Parafilm	“M”	Pechiney, Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten	230 mm	Carl Roth AG & Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen	10', 100', 1000'	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
PVDF Transfermembran	Immobilon P	Millipore Corporation, Bedford, USA
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen	Röhre 13 ml 100x16 mm PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Rundbodengefäße	Oak Ridge Centrifuge Tube, PSF, 50 ml	Nalge Nunc International, USA
Schraubdeckelröhren	15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Spritzenkanülen	Sterican®	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Filtropur S 0.2	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Ultrazentrifugenröhrchen		Kendro Laboratory Products, Newton, CT, USA

Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturplatten	6 well, 24 well	TPP AG, Trasdingen, Schweiz
Zentrifugenflaschen	Kendro Sorvall® Bottles T.T. 500 ml	Kendro Laboratory Products, Newton, CT, USA

2.3.9 Software

AIDA (Advanced Image Data Analyzer) 2.11	Raytest Isotopenmessgeraete GmbH, Straubenhardt
Image Reader LAS-1000 Pro V2.1	Fuji Photo Film Co. Ltd, Japan
OligoPerfect™ Designer	Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
SPSS 12.0	SPSS Inc, Chicago, USA
Vector NTI	Infor Max, Oxford, UK
MegaBACE Sequence Analyzer Patch 2 Version 3.0	Amersham Life Science, Freiburg
MegaBACE SNP Profiler Version 1.0	Amersham Life Science, Freiburg
Wallac Workout 1.5	PerkinElmer Life and Analyt. Sciences, Waltham, MA, USA

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der MeSyBePo-Kohorte

Die Querschnittsstudie „Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam“, kurz MeSyBePo, wird seit dem Jahr 2002 in Berlin und Potsdam durchgeführt. Die Studie dauert weiterhin an, zum Zeitpunkt der Bearbeitung der Daten im Rahmen dieser Dissertation wurden insgesamt 1208 Probanden in die Analysen einbezogen, für die auch die Daten für die Promotorpolymorphismen des Adiponectingens vorlagen. Hinsichtlich des Geschlechts bestand das Studienkollektiv aus 796 Frauen und 412 Männern. Das Durchschnittsalter betrug $52,13 \pm 0,40$ Jahre. Die Teilnehmer hatten einen mittleren Body Mass Index (BMI) von $28,93 \pm 0,18$ kg/m² und eine durchschnittliche Waist-to-Hip-Ratio (WHR) von $0,90 \pm 0,01$ (Abbildung 4).

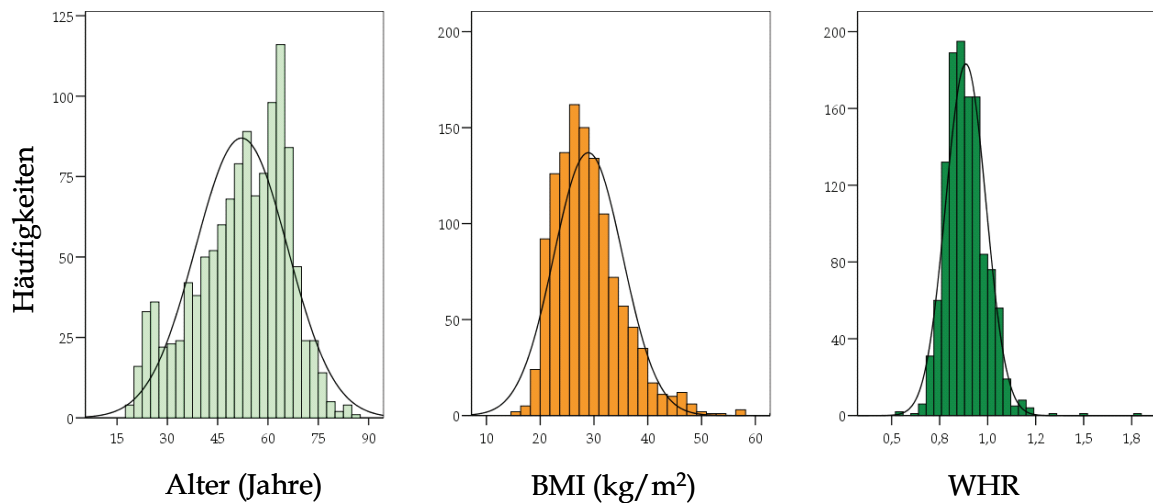


Abbildung 4. Häufigkeiten der Parameter Alter, BMI und WHR innerhalb der MeSyBePo-Studienkohorte mit 1208 Teilnehmern.

Weitere grundlegende Charakteristika der 1208 Studienteilnehmer innerhalb der MeSyBePo-Kohorte sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6. Charakteristika der Teilnehmer an der Querschnittsstudie MeSyBePo.

Parameter	Probanden (n=1208)
Geschlecht (w/m)	796/412
Nüchtern glukose (mg/dl)	96,16 ± 1,04
Nüchtern insulin (mU/l)	9,01 ± 0,20
HOMA _{IR}	2,21 ± 0,61
HbA1c (%)	5,50 ± 0,02
Gesamtcholesterol (mmol/l)	5,41 ± 0,03
HDL-Cholesterol (mmol/l)	1,43 ± 0,01
LDL-Cholesterol (mmol/l)	3,36 ± 0,04
Triglyzeride (mmol/l)	1,57 ± 0,14
FFA (mmol/l)	0,66 ± 0,05
Systole (mmHg)	125,68 ± 0,51
Diastole (mmHg)	77,53 ± 0,31
Serum-Adiponectin (µg/ml)	11,95 ± 0,23

Hinsichtlich des Glukosemetabolismus ließen sich die Studienteilnehmer in fünf verschiedene Gruppen einteilen: 1) Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT), 2) Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT), 3) Probanden mit gestörter Nüchtern glukose (IFG), 4) Probanden sowohl mit gestörter Glukosetoleranz als auch mit gestörter Nüchtern glukose (IGT+IFG) sowie 5) Patienten mit einem Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM). Die Häufigkeiten der genannten Störungen des Glukosemetabolismus sind in Abbildung 5 dargestellt. Dabei zeigte rund die Hälfte der MeSyBePo-Teilnehmer eine normale Glukosetoleranz, während 46 % einen gestörten Glukosemetabolismus (IGM) aufwiesen, darunter 28 % mit einer gestörten Glukosetoleranz und/oder einer gestörten Nüchtern glukose und knapp 20 % mit einem Typ-2-Diabetes mellitus.

	Häufigkeiten	Prozent (%)
NGT	652	54,0
IGT	175	14,5
IFG	98	8,1
IGT+IFG	63	5,2
T2DM	220	18,2
Gesamt	1208	100%

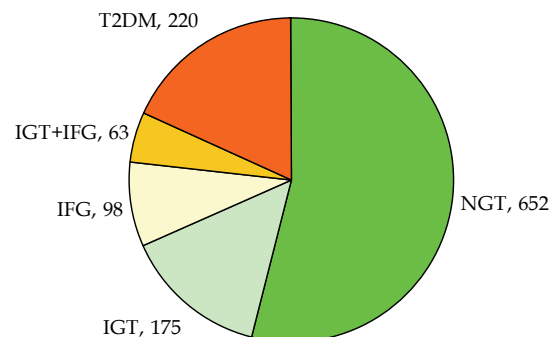


Abbildung 5. Häufigkeiten von Störungen des Glukosemetabolismus innerhalb der MeSyBePo-Kohorte mit 1208 Teilnehmern. NGT=normale Glukosetoleranz; IGT=gestörte Glukosetoleranz; IFG=gestörte Nüchtern glukose; T2DM=Typ-2-Diabetes mellitus.

3.2 Genetische Faktoren

3.2.1 Promotorpolymorphismen im Adiponectingen im MeSy-BePo-Kollektiv

3.2.1.1 Promotorpolymorphismus -11377

Die Genotypfrequenzen des Promotorpolymorphismus -11377 im Adiponectingen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium mit einem Chi-Quadrat von 0,4552. Sie betragen 54 % für den homozygoten Wildtyp, 40 % für die heterozygote Variante sowie 6 % für den homozygoten Polymorphismus (Abbildung 6). Die Allelfrequenz des selteneren G-Allels betrug 0,23.

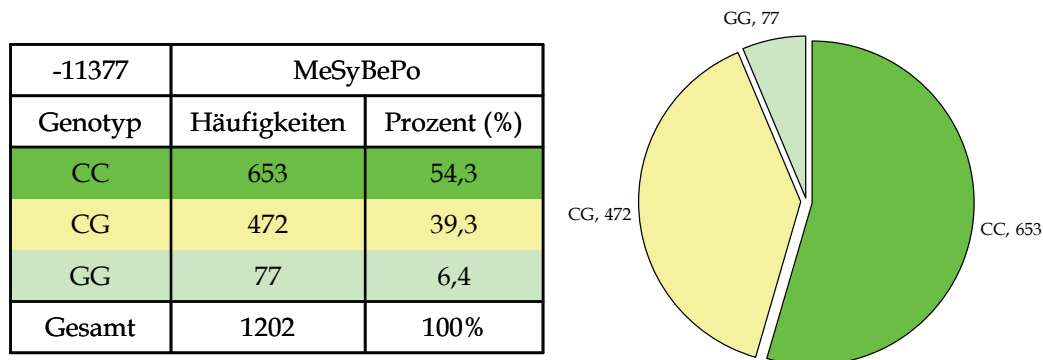


Abbildung 6. Genotypfrequenzen für den Promotorpolymorphismus -11377 im Adiponectingen in der MeSyBePo-Kohorte.

Anschließend wurde die Genotypenverteilung im Hinblick auf das Geschlecht sowie den Glukosestoffwechsel und das Übergewicht untersucht. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Genotyphäufigkeiten in Abhängigkeit von den drei genannten Faktoren ermittelt werden (Daten sind nicht dargestellt).

Weiterhin wurde untersucht, ob der Genotyp für den Promotorpolymorphismus -11377 einen Einfluß auf anthropometrische oder klinische Parameter der Probanden hat. Eine Auswahl an Parametern in Abhängigkeit vom Genotyp im additiven Modell ist in Tabelle 7 dargestellt. Beim additiven Modell geht jede Ausprägung der drei möglichen Genotypen in die Berechnung ein, während beim rezessiven Modell der homozygote Polymorphismus bzw. beim dominanten Modell der homozygote Wildtyp den anderen beiden Genotypen gegenübergestellt wird.

Tabelle 7. Vergleich von ausgewählten anthropometrischen und klinischen Parametern zwischen Probanden mit unterschiedlichen Varianten für den Promotorpolymorphismus -11377 im additiven Modell.

Parameter	CC	CG	GG	p-Wert
Geschlecht (m/w)	204/449	179/293	27/50	
Alter (Jahre)	52,00 ± 0,55	52,33 ± 0,64	51,92 ± 1,42	0,831
BMI (kg/m ²)	28,95 ± 0,26	28,75 ± 0,29	26,72 ± 0,32	0,439
WHR	0,90 ± 0,01	0,92 ± 0,02	0,88 ± 0,01	0,767
Nüchtern glukose (mg/dl)	95,39 ± 1,42	97,23 ± 1,80	95,97 ± 1,70	0,147
Nüchtern insulin (mU/l)	9,00 ± 0,27	8,86 ± 0,29	10,13 ± 1,02	0,341
HOMA _{IR}	2,19 ± 0,08	2,20 ± 0,10	2,52 ± 0,33	0,310
HbA1c (%)	5,48 ± 0,03	5,53 ± 0,03	5,44 ± 0,08	0,225
Cholesteroll (mmol/l)	5,40 ± 0,04	5,44 ± 0,05	5,36 ± 0,10	0,774
HDL Cholesteroll (mmol/l)	1,44 ± 0,02	1,41 ± 0,18	1,46 ± 0,04	0,392
LDL Cholesteroll (mmol/l)	3,35 ± 0,06	3,39 ± 0,05	3,22 ± 0,09	0,307
Triglyzeride (mmol/l)	1,45 ± 0,04	1,76 ± 0,34	1,46 ± 0,08	0,400
FFA (mmol/l)	0,61 ± 0,01	0,72 ± 0,11	0,56 ± 0,03	0,178
Systole (mmHg)	124,68 ± 0,67	126,76 ± 0,80	126,95 ± 2,24	0,113
Diastole (mmHg)	77,04 ± 0,42	78,28 ± 0,51	77,07 ± 1,16	0,147

Hinsichtlich anthropometrischer und klinischer Parameter ergaben sich somit keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Genotypen.

3.2.1.2 Promotorpolymorphismus -11391

Auch bei dem Promotorpolymorphismus -11391 im Adiponectingen befanden sich die Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg-Equilibrium mit einem Chi-Quadrat von 0,0287. Sie betragen für den Wildtyp 84 %, für die heterozygote Variante 15 % sowie knapp 1 % für den homozygoten Polymorphismus (Abbildung 7). Die Allelfrequenz des selteneren A-Allels betrug 0,084.

-11391 Genotyp	MeSyBePo	
	Häufigkeiten	Prozent (%)
GG	1013	83,9
GA	186	15,4
AA	8	0,7
Gesamt	1207	100%

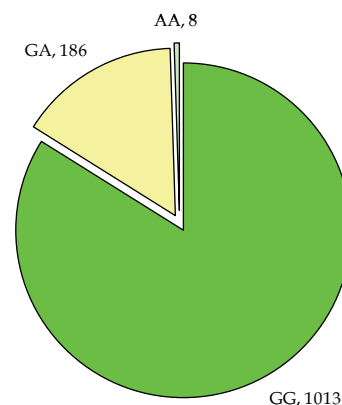


Abbildung 7. Genotypfrequenzen für den Promotorpolymorphismus -11391 im Adiponectingen in der MeSyBePo-Kohorte.

Die Verteilung der Genotypen unterschied sich nicht signifikant zwischen Männern und Frauen bzw. in Abhängigkeit vom Glukosemetabolismus oder dem Übergewicht (Daten sind nicht dargestellt).

In Tabelle 8 ist der Vergleich von verschiedenen anthropometrischen und metabolischen Parametern in Abhängigkeit vom Genotyp für den Polymorphismus -11391 im dominanten Modell dargestellt. Das dominante Modell wurde gewählt, da die Fallanzahl für die homozygote Polymorphismusvariante AA mit n=8 sehr klein war. Dabei wurden dem homozygoten Wildtyp GG jeweils der heterozygote sowie der homozygote Polymorphismus (GA und AA) gegenübergestellt.

Tabelle 8. Vergleich von ausgewählten anthropometrischen und klinischen Parametern zwischen Probanden mit unterschiedlichen Varianten für den Promotorpolymorphismus -11391 im dominanten Modell.

Parameter	GG	GA/AA	p-Wert
Geschlecht (m/w)	354/659	57/137	
Alter (Jahre)	51,94 ± 0,44	53,09 ± 0,93	0,341
BMI (kg/m ²)	29,04 ± 0,20	28,38 ± 0,43	0,187
WHR	0,91 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,921
Nüchternglukose (mg/dl)	95,69 ± 0,96	98,53 ± 4,16	0,751
Nüchterninsulin (mU/l)	9,17 ± 0,22	8,19 ± 0,40	0,087
HOMA _{IR}	2,24 ± 0,07	2,06 ± 0,16	0,135
HbA1c (%)	5,50 ± 0,02	5,48 ± 0,05	0,664
Cholesterol (mmol/l)	5,40 ± 0,04	5,46 ± 0,08	0,511
HDL Cholesterol (mmol/l)	1,42 ± 0,01	1,45 ± 0,03	0,428
LDL Cholesterol (mmol/l)	3,33 ± 0,03	3,48 ± 0,16	0,703
Triglyzeride (mmol/l)	1,59 ± 0,16	1,48 ± 0,06	0,249
FFA (mmol/l)	0,66 ± 0,05	0,62 ± 0,02	0,247
Systole (mmHg)	125,38 ± 0,55	127,20 ± 1,37	0,338
Diastole (mmHg)	77,45 ± 0,34	77,94 ± 0,78	0,582

Die genotypabhängigen Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich sämtlicher klinischer und anthropometrischer Parameter.

3.2.2 Einfluß der Promotorpolymorphismen auf den Adiponectinspiegel

Nachdem die Promotorpolymorphismen *in vivo* keinen Einfluß auf diverse anthropometrische und klinische Parameter der Probanden innerhalb der MeSyBePo-Kohorte aufwiesen, wurde untersucht, ob sie einen Einfluß auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel im Serum haben. Zunächst wurden Voruntersuchungen im Zellkulturmodell durchgeführt, um die Promotoraktivität des Adiponectins in Abhängigkeit vom jeweiligen Polymorphismus zu messen. Anschließend wurde in der MeSyBePo-Kohorte untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Adiponectinspiegel und den Promotorpolymorphismen gibt.

3.2.2.1 Promotoraktivität des Adiponectins *in vitro*

3.2.2.1.1 Klonierung der Adiponectinpromotor-Konstrukte

Isolierung der Promotoren mit verschiedenen Varianten für die Polymorphismen ADIPOQ -11377 C/G und ADIPOQ -11391 G/A

Für die Promotoraktivitätsstudien *in vitro* wurden die erforderlichen Adiponectinpromotor-Konstrukte kloniert. Dazu wurden 3 Probanden mit unterschiedlichen Varianten für die Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 aus der Datenbank ausgesucht und deren genomische DNA für die Klonierungsexperimente verwendet (Tabelle 9). Dabei waren die Probanden jeweils homozygot für die jeweilige Variante. Den Wildtyp repräsentierte Proband 1. Proband 2 hatte die homozygote Polymorphismusvariante AA an Stelle -11391, Proband 3 dagegen die homozygote Variante GG an Stelle -11377. Da ein homozygoter Polymorphismus an beiden Stellen *in vivo* extrem selten ist und die Bedeutung eines solch seltenen Polymorphismus in jedem Fall gering sein dürfte, wurde auf die Klonierung dieser GG/AA-Variante verzichtet.

Tabelle 9. Darstellung von drei Varianten für die Kombination der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 im Adiponectingen, die in entsprechende Vektoren einkloniert wurden.

Proband	-11377 (C/G)	-11391 (G/A)	Anmerkung
1	CC	GG	Wildtyp
2	CC	AA	SNP an Stelle -11391
3	GG	GG	SNP an Stelle -11377

Zunächst wurden unter Verwendung des Programms „Oligo“ passende Primer ausgesucht, mit deren Hilfe die Promotorabschnitte amplifiziert werden konnten. Um passende Restriktionsstellen in den Promotor einzubringen, wurden an die Primer jeweils ein Linker, die Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym sowie zusätzlich ein Überhang an Nukleotiden angehängt, um die Bindung des Enzyms zu gewährleisten. In PCR-Experimenten erfolgte dann die Amplifizierung der 2109 bp großen Promotorabschnitte des Adiponectins, wobei ab dem zweiten PCR-Zyklus die Bindungsstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* in das Promotorfragment integriert waren (Abbildung 8).

1	CATAGGGATT	TTTAGTTAGA	CAGATCTGGT	TCAAATCCTA	GACTTGTGCC
51	TIGAACAAAT	TAITTTACCT	CATTGAACTC	TAGATTCATT	ATTTGTA AAA
101	TGAAAGACAA	TAATAGTTAT	CTCCAAAGGA	AAGTTGAATA	TGATCATICA
151	TTTATTCATT	AATTCAACAT	TTATTATIGC	CTACTTTGTG	CCAGGTICTA
201	TTCTAGGAAC	TAAGGGATAC	AACTTTGAAT	AGGCAAAATC	TCTGCTCTCC
251	TGAAGTTTAC	TTTTTTTTTT	TTTTTTGAG	ACAGAGTTTC	ACTCTGTGCA
301	CCCAGGCTGG	AGCGCAATGG	TGCTCTTGG	TCACTGCAA	CTCCACCTCC
351	TGGGTCAAG	TGATTCTCTT	GTCTCAGCCT	CCCAAGTAGC	TGGGACTACA
401	GGTATGTGCC	ACCACGCCCG	GCTATTTCTG	CATTTTTAGT	AGAGATGGGG
451	TTTACCCATG	TGGCCAGAC	TGGTCTCAAA	CTCCTGATCT	CAGGTGATAT
501	GCCTGCTTGG	GCCTTCCAAA	GTACTGGGAT	TACAGGCCTG	AGCCACTGCA
551	CCTGACCTGA	AGTTTATGTT	CTATTAATA	GCAACAGACA	GTAACATAAA
601	CCAAAAATAA	ATAGGAAAAC	ACCATAACAA	AAATCAAACA	GTGATATAAT
651	TGAGAGTTGC	TICTATTTCT	TTTTGTTGIC	TTCTTGGTTC	AATCAGCCTG
701	CTAAACTATA	TGGAACCTCA	TTTTCATGGG	CCACTTATTT	AAGCCGGGGG
751	ACCTTGAAA	GTCTCTCATG	TCCTCATCT	CAACGGCCTA	ATGTGACTTC
801	TCTTGAATA	TTTGGACATT	AGCAGGAAGC	TGAGGCITTA	CATCAGATCT
851	TTACTTTAAT	GGTGGACTTG	ACTTTACTGG	TAGATTTTTA	GGCTCTGTGT
901	GGACTGTGGA	GATGATATCT	GGGGGGCAGG	CAGACACTTG	CCCTGCCTCT
951	GTCTGAGAAA	ATTCGTTTTT	GGATGTCTTG	TGAAAGTTGG	TGCTGGCATC
1001	CTAAGCCCTT	GCTGGGGTCC	TAATTTAATT	CATCAGAATG	TGTGGCTTGC
1051	AAGAACCAGC	TCAGATCCTG	CTCTCAAAA	ACAAAACATG	AGCGTGCCAA
1101	GAAAGTCCAA	GGTGTGAAT	GTGCCACTT	CAAGCCTAAA	CITTTAGGA
1151	ACACCTAAGT	GGTGGCAGC	TTCCAGTCT	CCAGGCTGCT	TCTAGGCCAG
1201	AGCTGGGTTT	CACAAGAGAC	AGAATAGGCA	TATATATGCT	TAAGGAACCTG
1251	GAAAAACAGG	CTCTCTCTCT	CTCACAACA	CACACACACA	CATACCAAGG
1301	TAGCTGTCAA	AATGTTATCC	GAAATTTTGG	AACCAAAAAA	TCTTGAAAGA
1351	TGGTATTTCCA	ATATCACATT	TTATGTAAGT	TTTCTATTAT	ATTAGATTCA
1401	AATTACGATT	CGAGGCCACA	AGCTTTAAGA	ATTCAGGGCC	TTTTTAACIT
1451	GCCAAGCCCC	ACACCACTCC	AGGAACCTCC	CCACACCCCA	GTCTCAGAA
1501	TTCATGTGCA	AGGICTTTCC	TAAATCCAGG	GTCCAGGTCA	GAGAGTGGAG
1551	GATGTGCTCT	ATTTCTTACC	TGATTGCAGA	CCCCTGTGAC	AGTGTCTCCT
1601	TCTGAAGCAC	TCACTGTCTG	AACGTACACA	GTCTCAGACT	TAATCATGCA
1651	CAGTGAGCAA	GACTGTGGTG	TGATAATTGG	CGTCCCTGAC	TTATTAGGGC
1701	AAATCTATGG	GAGGGGGAGA	CCTCCTGGAC	CACTGAGCAA	TTAATTCATT
1751	TACATTAGGA	AGTTTCTCCG	TCAGATGCAG	GAAAAAAATC	TGTTTTTCTT
1801	GCTGTGGTT	TGACTTTTGC	CCCATCTCT	GTTGCTGTTG	TAGGAGGCAA
1851	AATAAGGGTC	AAGGCCTGGA	AACACAAGTG	CTTTGACTGA	AGCTCCACTT
1901	GGCTTCCGAA	GCCCAAGCTG	GGTGTACCA	GGTCCCTAG	GGTGCAGGCT
1951	GTGGGCAACT	GCCAGGGACA	TGTGCCTGCC	CACCGGCCTC	TGGCCCTCAC
2001	TGAGTTGGCC	AATGGGAAAT	GACAATTGTG	AGGTGGGGAC	TGGCCCTCAC
2051	CGTGTGAGTACC	AGGCTGTGTA	GGCTGGGCCA	TCTCTCTCTC	ACTTCCATT
2101	TGACTGCA				

Abbildung 8. Sequenz des einklonierten Promotorfragments mit Markierung der beiden Polymorphismen -11377 C/G und -11391 G/A.

Klonierung der PCR-Produkte in den pGEM-T easy Vektor

Die Promotorfragmente mit den verschiedenen SNP-Varianten wurden über eine TA-Klonierungsstelle in den pGEM-T-easy-Vektor eingebaut. Dieser Vektor wurde ausgewählt, um den Adenosin-Überhang am 3'-Ende des PCR-Produkts durch die Taq-Polymerase mittels terminalem Thymidin-Überhang am 3' Ende an beiden Seiten des Vektors zu neutralisieren. Nachfolgend wurden kompetente *E. coli* Bakterien mit den Konstrukten transformiert. Die erfolgreiche Ligation des Promotorfragments konnte über eine Blau/Weiß-Selektion der Klone mit anschließender Übernachtskultur und Restriktionsanalyse kontrolliert werden. Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA isoliert und deren korrekte Größe im Ethidiumbromidgel dokumentiert (Abbildung 9 A). Die korrekten Promotorsequenzen wurden mittels Sequenzierung bestätigt.

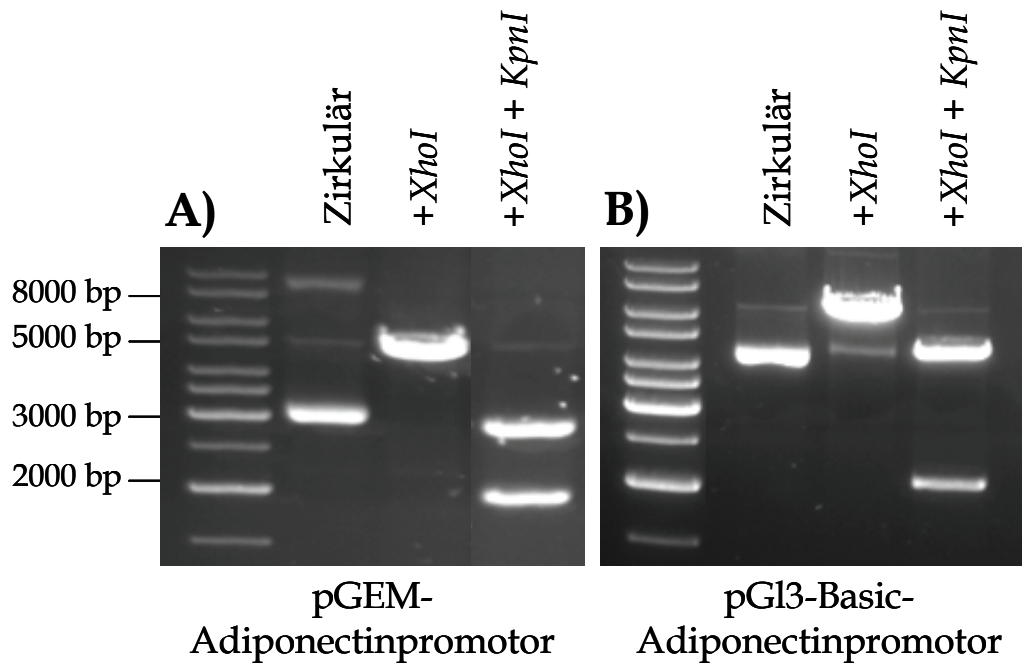


Abbildung 9. Ethidiumbromidgеле der klonierten Konstrukte mit eingebautem Adiponectinpromotor. Die Konstrukte sind jeweils zirkulär, linear sowie als Restriktion des Promotors dargestellt (von links nach rechts). A) nach Klonierung in den pGEM-T-easy-Vektor; B) nach Umklonierung in den pGl3-Basic-Vektor.

Umklonierung der Promotorfragmente in den pGl3-Basic-Vektor

Für die Konstruktion der Reporterengenkonstrukte wurden pGl3-Basic-Plasmide verwendet, da sie für das Firefly-Luziferasegen kodieren. Diese Vektoren enthalten keine eukaryotischen Promotorsequenzen, so daß die Expression der Luziferase durch das inklonierte DNA-Fragment reguliert wird. Da beide Vektoren nun über jeweils eine Schnittstelle für *KpnI* und *XhoI* verfügten, wurden sowohl das pGEM-Promotor-Konstrukt als auch der pGl3-Leervektor mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten, die Promotorfragmente aufgereinigt, dephosphoryliert und in den pGl3-Basic-Vektor ligiert. Die erfolgreiche Ligation wurde wiederum im Ethidiumbromidgel dokumentiert (Abbildung 9 B). Der Promotor konnte anschließend ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert werden.

Es wurden drei Konstrukte generiert, das Wildtyp-Konstrukt C/G (-11377/-11391) sowie die Konstrukte mit den Genvarianten C/A und G/G, bei denen jeweils ein Wildtyp und eine seltenere Polymorphismusvariante vorlagen. Die verschiedenen Promotorpolymorphismen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Eine schematische Darstellung des pGl3-Adiponectin-Konstrukts zeigt Abbildung 10.

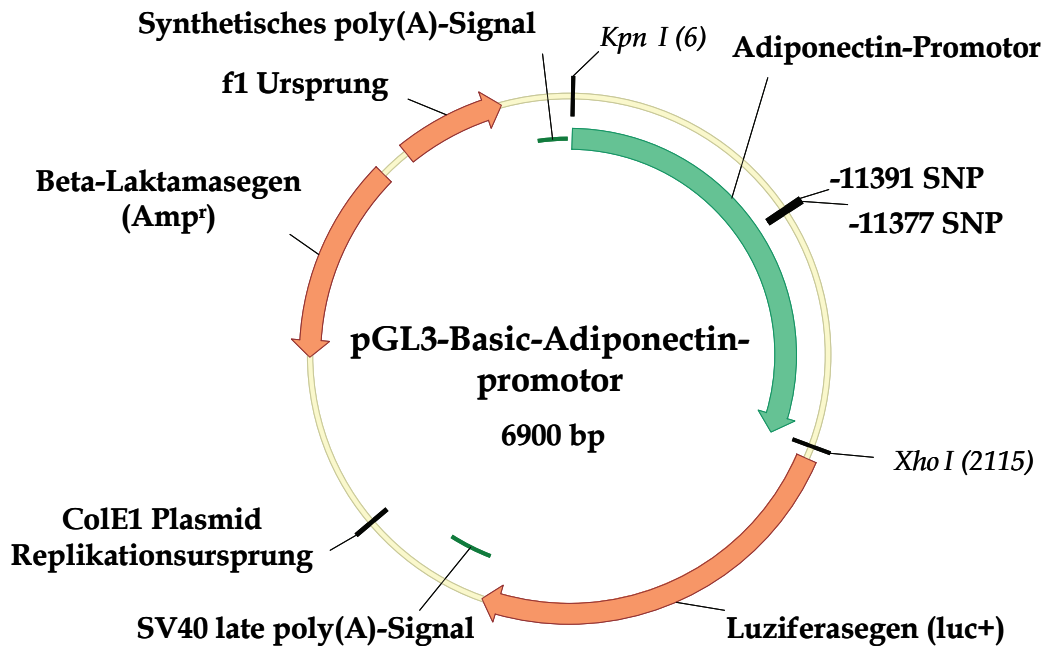


Abbildung 10. Vektorkarte nach Klonierung des Adiponectinpromotors in den pGL3-Basic-Vektor.

3.2.2.1.2 Messung der Promotoraktivität im Luziferase-Assay

Für die Durchführung des Dualen Luziferase-Reporter-Assays wurden HEK-Zellen und 3T3-L1-Zellen transient transfiziert und die Promotoraktivität der verschiedenen Konstrukte bestimmt. Dabei wurde die Aktivität des Leervektors pGL3-Basic als 100 % gesetzt und die relative Aktivitätsveränderung der klonierten Konstrukte im Vergleich zum Leervektor errechnet. Die Daten sind in Abbildung 11 dargestellt. In HEK-Zellen zeigten sowohl der Wildtyp-Promotor C/G mit 206 ± 23 % als auch die C/A-Variante mit 229 ± 20 % vergleichbare Aktivitäten. Im Gegensatz dazu konnte die Promotorvariante G/G die Expression des Luziferasegens mit 307 ± 27 % am besten induzieren ($p=0,021$ gegenüber dem Wildtyp). In 3T3-L1-Zellen verhielten sich die Promotorkonstrukte ähnlich. Während die Aktivierung der Luziferase-Genexpression durch das C/G-Konstrukt mit 422 ± 29 % und das C/A-Konstrukt mit 398 ± 21 % vergleichbar waren, erfolgte die höchste Aktivierung durch das G/G-Konstrukt mit 613 ± 56 % ($p=0,009$ gegenüber dem Wildtyp). Die Promotoraktivitäten zwischen beiden Varianten mit jeweils einem Polymorphismus unterschieden sich sowohl in HEK-Zellen als auch in 3T3-L1-Fibroblasten nicht signifikant voneinander.

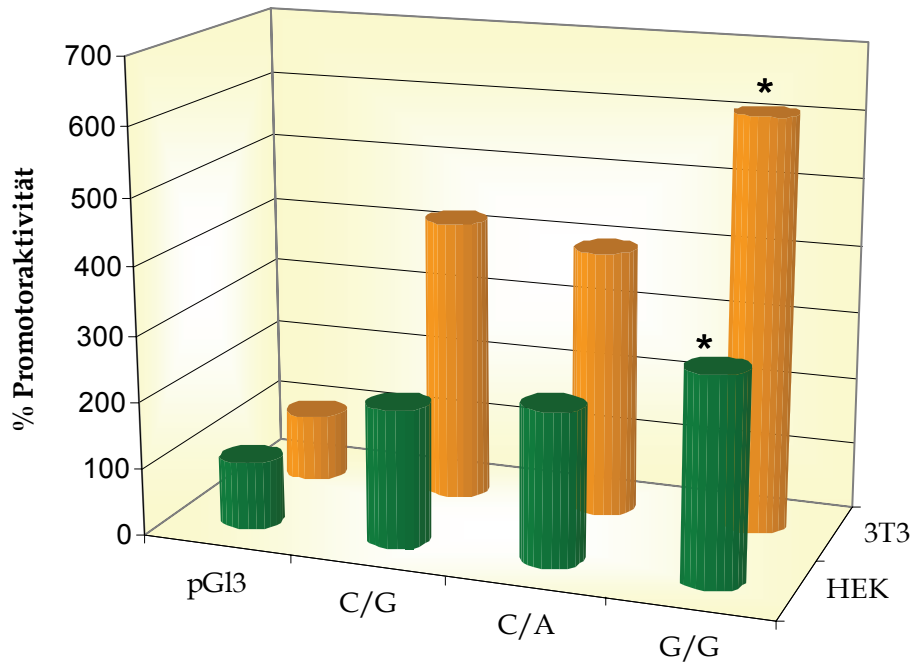


Abbildung 11. Genotypabhängige Aktivierung des Adiponectinpromotors im Zellkulturmodell. Es erfolgte die Untersuchung der Polymorphismen ADIPOQ -11377 C/G (in der Legende der Abbildung vor dem Schrägstrich dargestellt) und ADIPOQ -11391 G/A (in der Legende der Abbildung hinter dem Schrägstrich dargestellt) des Adiponectingens in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK, n=7, dargestellt im Vordergrund) und in 3T3-L1-Fibroblasten (3T3, n=4, dargestellt im Hintergrund). *Signifikanzniveau $p < 0,05$ gegenüber dem Wildtyp C/G.

3.2.2.2 Promotoraktivität des Adiponectins *in vivo*

Nachfolgend wurde innerhalb der MeSyBePo-Kohorte untersucht, ob die Promotorpolymorphismen einen Einfluß auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel im Serum haben. Dabei wurden sowohl das additive Modell als auch das dominante Modell für den jeweiligen Polymorphismus berechnet. Das rezessive Modell wurde nur für den Polymorphismus -11377 betrachtet, da die homozygote Variante des Allels A an Stelle -11391 sehr selten auftritt und in der MeSyBePo-Kohorte nur 3 Probanden in die Berechnung einbezogen werden konnten. Der Mittelwertvergleich der Adiponectinspiegel in Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp ergab für beide Polymorphismen signifikante Unterschiede im additiven Modell. Beim Polymorphismus -11377 war die seltenere Variante mit einer Absenkung der Adiponectinspiegel verbunden. Beim Polymorphismus -11391 dagegen war sie mit erhöhten Adiponectinspiegeln assoziiert (Tabelle 10). Während sich auch im dominanten Modell die Adiponectinspiegel in Abhängigkeit von der Genvariante an Stelle -11391 signifikant unterschieden, konnten für den Polymorphismus -11377 keine Unterschiede gefunden werden. Anders verhielt es sich beim rezessiven Modell, bei dem diejenigen Probanden, die Träger der homozygoten Variante GG waren, signifikant niedrigere Adiponectinspiegel aufwiesen als die Träger des C-Allels (Tabelle 10).

Tabelle 10. Einfluß der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel im Serum. Die Berechnung erfolgte im additiven sowie im dominanten und rezessiven Modell in der MeSyBePo-Kohorte.

<i>Additives Modell</i>				
-11377	CC (n=434)	CG (n=336)	GG (n=51)	p-Wert
Adiponectin (µg/ml)	12,35 ± 0,32	11,74 ± 0,36	9,87 ± 0,93	0,032
-11391	GG (n=705)	GA (n=113)	AA (n=3)	p-Wert
Adiponectin (µg/ml)	11,66 ± 0,25	13,68 ± 0,63	14,02 ± 3,84	0,010
<i>Dominantes Modell</i>				
-11377	CC (n=434)	CG/GG (n=386)		p-Wert
Adiponectin (µg/ml)	12,35 ± 0,32	11,49 ± 0,34		0,067
-11391	GG (n=705)	GA/AA (n=116)		p-Wert
Adiponectin (µg/ml)	11,66 ± 0,25	13,69 ± 0,62		0,002
<i>Rezessives Modell</i>				
-11377	CC/CG (n=770)	GG (n=51)		p-Wert
Adiponectin (µg/ml)	12,09 ± 0,24	9,87 ± 0,93		0,021

Anschließend wurden die Berechnungen wiederholt und die Ergebnisse für den BMI, das Alter und das Geschlecht korrigiert. Dabei blieb in allen drei Modellen die Abhängigkeit der Adiponectinspiegel vom jeweiligen Polymorphismus bestehen, lediglich die Signifikanzniveaus veränderten sich leicht (Tabelle 11). Zur besseren Veranschaulichung sind die Gesamtadiponectinspiegel in Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp nochmals in Abbildung 12 dargestellt.

Tabelle 11. Einfluß der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel im Serum im adjustierten Modell. Die Berechnung erfolgte im additiven sowie im dominanten und rezessiven Modell in der MeSyBePo-Kohorte, korrigiert für die Variablen Alter, BMI und Geschlecht.

<i>Additives Modell</i>				
-11377	CC	CG	GG	p-Wert
	(n=429)	(n=335)	(n=51)	
Adiponectin (µg/ml)	12,24 ± 0,30	11,92 ± 0,34	9,94 ± 0,87	0,046
-11391	GG	GA	AA	p-Wert
	(n=700)	(n=112)	(n=3)	
Adiponectin (µg/ml)	11,75 ± 0,24	13,28 ± 0,59	13,87 ± 3,60	0,047
<i>Dominantes Modell</i>				
-11377	CC	CG/GG		p-Wert
	(n=429)	(n=386)		
Adiponectin (µg/ml)	12,24 ± 0,30	11,66 ± 0,32		0,190
-11391	GG	GA/AA		p-Wert
	(n=700)	(n=115)		
Adiponectin (µg/ml)	11,75 ± 0,24	13,30 ± 0,58		0,014
<i>Rezessives Modell</i>				
-11377	CC/CG	GG		p-Wert
	(n=764)	(n=51)		
Adiponectin (µg/ml)	12,10 ± 0,23	9,94 ± 0,87		0,017

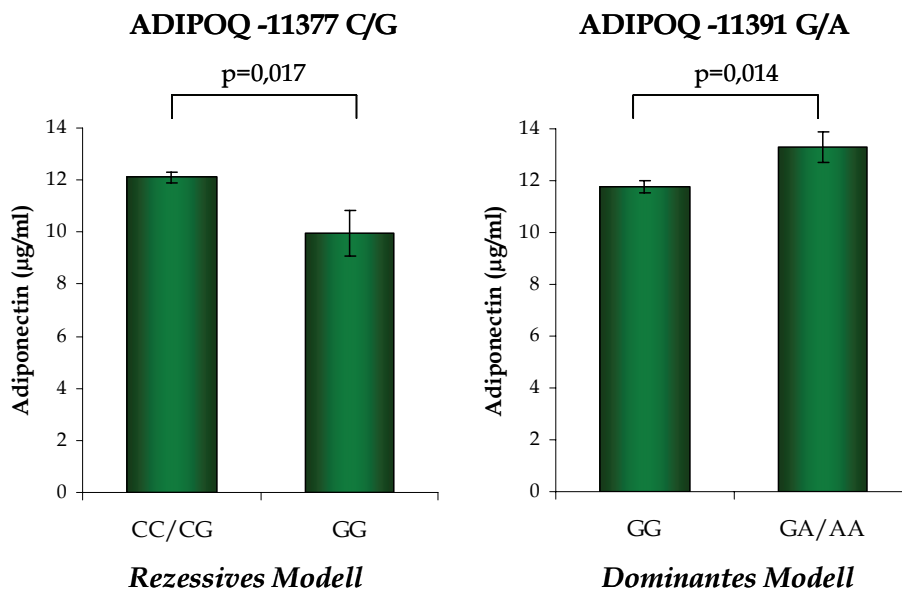


Abbildung 12. Adiponectinspiegel im Serum in Abhängigkeit vom Genotyp zweier Promotorpolymorphismen. Darstellung des SNPs ADIPOQ -11377 (C/G) im rezessiven Modell (n=764/51) bzw. des SNPs ADIPOQ -11391 (G/A) im dominanten Modell (n=700/115) in der MeSyBePo-Kohorte, adjustiert für die Variablen Alter, BMI und Geschlecht.

3.3 *Metabolische Faktoren*

Nach der Analyse genetischer Faktoren sollte geklärt werden, welche metabolischen Gegebenheiten die Adiponectinspiegel beeinflussen bzw. ob Adiponectin selbst mit spezifischen Parametern des Stoffwechsels assoziiert ist.

3.3.1 *Promotoraktivität in vitro*

Zunächst wurden Genexpressionsstudien durchgeführt, die den Einfluß von metabolischen Faktoren auf die Promotoraktivität des Adiponectingens klären sollten. Es wurde die Wirkung von Glukose, Insulin, Rosiglitazon, Fettsäuren und TNF α untersucht.

Um einen möglichen Einfluß der Glukose auf die Promotoraktivität zu prüfen, wurden HEK-Zellen nach transienter Transfektion mit den Promotorkonstrukten unter physiologischen Glukosekonzentrationen (5,5 mmol/l) sowie unter hohen Glukosekonzentrationen (25 mmol/l) für 24 h kultiviert. Die Messung der Promotoraktivität ergab eine tendenzielle Erhöhung der Promotoraktivität bei 25 mmol/l Glukose, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 13 A).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluß von Insulin auf die Promotoraktivität untersucht. Dazu wurden die transient transfizierten HEK-Zellen mit 10 nmol/l bzw. 100 nmol/l Insulin für 24 h inkubiert. Das Insulin hatte in diesem Modell keine modulierende Wirkung bezüglich der Aktivierung des Promotors (Abbildung 13 B).

Nachfolgend wurde untersucht, ob insulinsensitivierende Thiazolidindione im Zellkulturmodell die Aktivität des Adiponectinpromotors beeinflussen können. Eine Inkubation mit 5 μ mol/l Rosiglitazon für 24 h hatte keine Auswirkung auf die Promotoraktivität (Abbildung 13 C).

Zusätzlich wurde überprüft, ob einzelne freie Fettsäuren die Promotoraktivität des Adiponectins modulieren können. HEK-Zellen wurden mit den Promotorkonstrukten transfiziert und für 48 h mit Palmitinsäure (Palmitat), Ölsäure (Oleat) oder Linolsäure (Linooleat) in einer Konzentration von je 200 μ mol/l inkubiert. Die genannten Fettsäuren führten zu einer leichten Verringerung der Promotoraktivität, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 13 D).

Als Entzündungsmarker wurde die Wirkung von TNF α auf die Promotorkonstrukte in HEK-Zellen untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 24 h konnte keine Veränderung der Promotoraktivität nach Inkubation mit TNF α (20 nmol/l bzw. 40 nmol/l) gemessen werden (Abbildung 13 E).

Die höhere Aktivierung des Promotors mit der selteneren Variante für den Polymorphismus -11377 (G/G), beschrieben im Kapitel 3.2.2.1.2, konnte in allen Experimenten erneut bestätigt werden (Abbildung 13 A-E). Erste Versuche mit weiteren Zytokinen wie Interleukin-6 oder Interleukin-1 β ergaben ebenfalls keine Änderungen hinsichtlich der Promotoraktivität des Adiponectins (Daten sind nicht dargestellt).

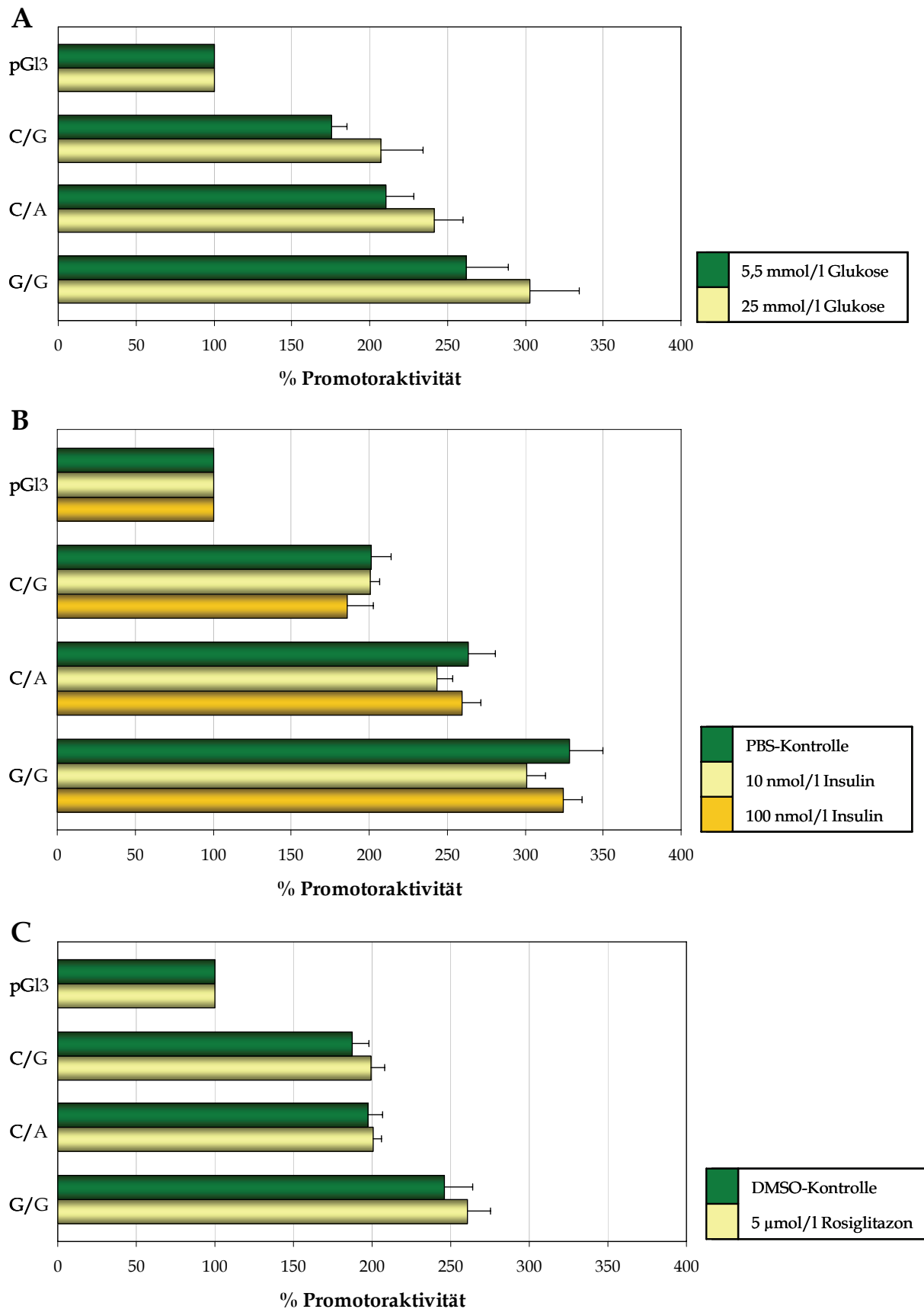


Abbildung 13 (A-C). Einfluß metabolischer Parameter auf die Promotoraktivität des Adiponektins in HEK-Zellen im Luziferase-Assay. A: Glukose (n=6); B: Insulin gegen PBS-Kontrolle (n=3); C: Rosiglitazon gegen DMSO-Kontrolle (n=3).

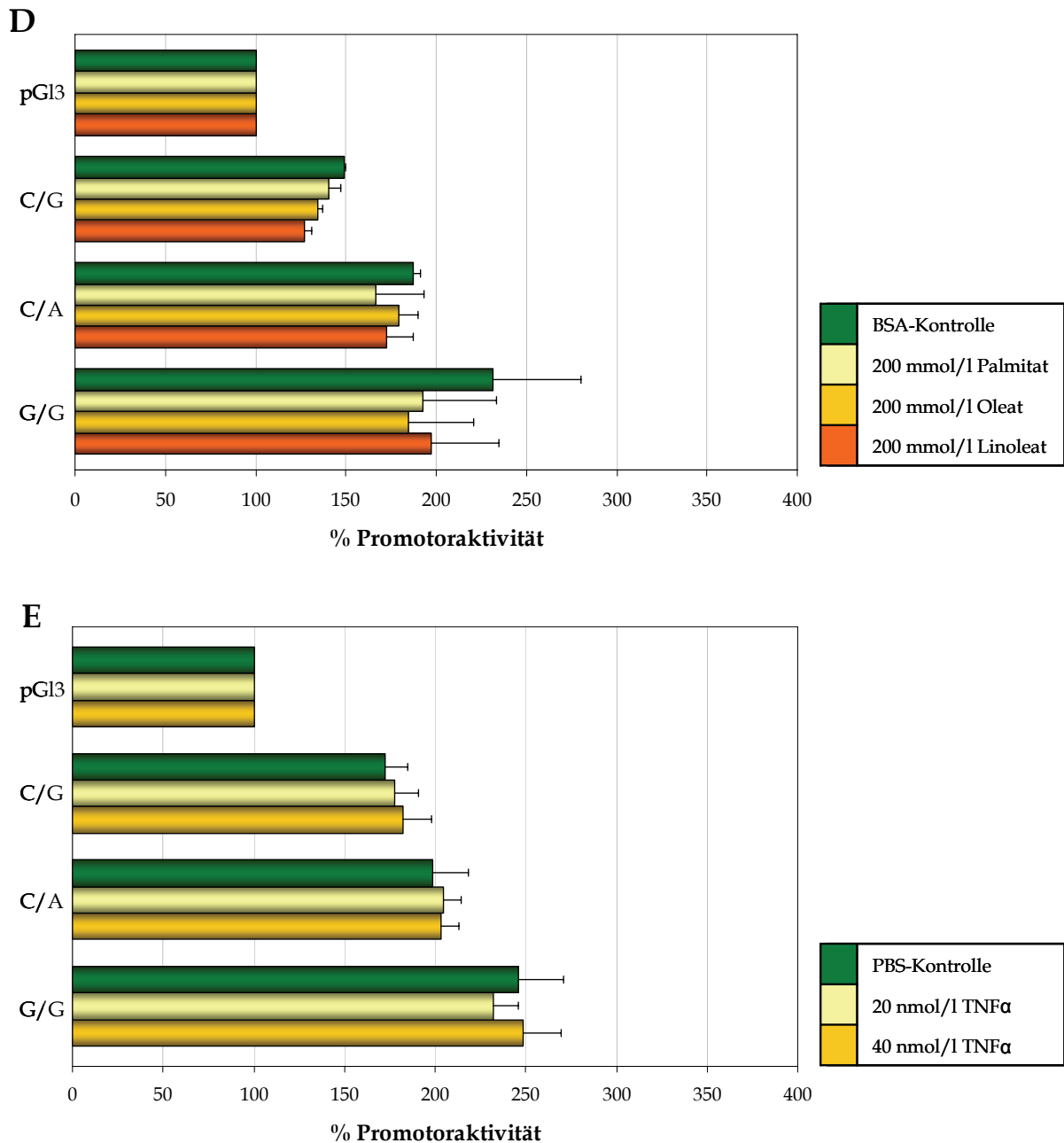


Abbildung 13, Fortsetzung (D-E). Einfluß metabolischer Parameter auf die Promotoraktivität des Adiponectins in HEK-Zellen im Luziferase-Assay. D: Fettsäuren gegen BSA-Kontrolle (n=2); E: TNF α gegen PBS-Kontrolle (n=4).

Nach den *in vitro* Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob sich hinsichtlich der metabolischen Effekte *in vivo* eine andere Datenlage ergibt. Dazu wurde sowohl die bereits vorgestellte Querschnittsstudie MeSyBePo herangezogen, als auch ein Frauenkollektiv mit PCO-Syndrom untersucht sowie eine Interventionsstudie durchgeführt, in welcher potentielle modulatorische Effekte von Insulin auf die Adiponectinspiegel analysiert werden sollten.

3.3.2 Metabolische Faktoren in der Querschnittsstudie MeSyBePo

Die grundlegenden Charakteristika der Kohorte wurden bereits in Tabelle 6 dargestellt. Um mögliche Zusammenhänge zwischen Adiponectin und metabolischen Parametern zu analysieren, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (Abbildung 14). Ein enger Zusammenhang bestand zwischen den Adiponectinspiegeln und dem Geschlecht ($r=0,353$; $p<0,001$). Hinsichtlich anthropometrischer Parameter wurden negative Assoziationen mit dem BMI und der WHR ermittelt. Zusammenhänge bestanden weiterhin zwischen Adiponectin und dem Glukosestoffwechsel. Dabei korrelierte Adiponectin negativ mit den Insulin- und Glukosespiegeln ($r=-0,325$; $p<0,001$; $r=-0,133$; $p<0,001$) sowie mit der Insulinresistenz (HOMA_{IR}), während es positiv mit der Insulinsensitivität (Quicki) korreliert war. Betrachtete man die Parameter des Fettstoffwechsels, fand man eine enge positive Verbindung zwischen Adiponectin und HDL-Cholesterol. Die Triglyzeridspiegel korrelierten dagegen positiv mit Adiponectin, während es keinen Zusammenhang zum LDL-Cholesterol ($r=-0,027$; $p=0,475$) und Gesamtcholesterol ($r=0,036$; $p=0,333$) gab.

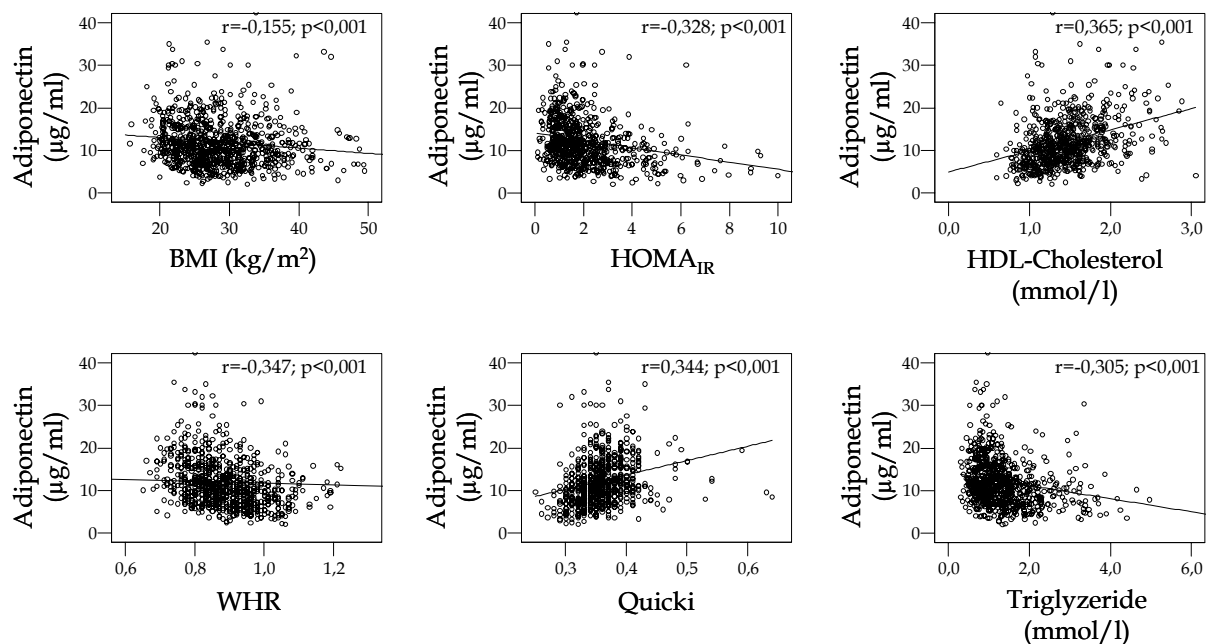


Abbildung 14. Korrelationsanalysen zwischen Serum-Adiponectin und anthropometrischen sowie klinischen Parametern in der MeSyBePo-Kohorte. Darstellung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson; $n=1208$.

Ein Abfall der zirkulierenden Adiponectinspiegel mit zunehmendem Gewicht konnte mit dem Ergebnis untermauert werden, daß übergewichtige Probanden ($\text{BMI}>25$) signifikant niedrigere Adiponectinspiegel aufwiesen als Personen mit einem $\text{BMI}<25$ ($11,47 \pm 0,30$ vs. $13,00 \pm 0,34$; $p=0,002$; $n=567/257$). Bezüglich der Beziehung zwischen abfallenden Gesamtsiegeln bei ansteigender Insulinresistenz wurde geprüft, ob Personen mit einem Typ-2-Diabetes niedrigere Adiponectinspiegel aufweisen als Personen mit normaler Glukosetoleranz. Tatsächlich waren die Adiponectinspiegel im Falle des Vorliegens einer

Diabeteserkrankung erniedrigt, das Signifikanzniveau wurde jedoch knapp verfehlt ($11,07 \pm 0,80$ vs. $12,34 \pm 0,28$; $p=0,059$; $n=146/460$).

Nachfolgende Regressionsanalysen dienten der Ermittlung unabhängiger Einflußfaktoren auf die Adiponectinspiegel. Einen signifikanten Einfluß auf das Adiponectin hatten danach das Geschlecht, das Alter, HDL-Cholesterol sowie die Insulinresistenz. Das Modell mit diesen vier Faktoren konnte jedoch nur 29 % der Variabilität der Adiponectinspiegel erklären (Tabelle 12), so daß es weitere Faktoren geben muß, welche die Adiponectinspiegel unabhängig beeinflussen können.

Tabelle 12. Lineare Regressionsanalyse mit Serum-Adiponectin als unabhängigem Parameter in der MeSyBePo-Kohorte. Rückwärtsanalyse, bei der nicht signifikante Parameter nach und nach ausgeschlossen wurden; $n=1208$.

Parameter	Standardisiertes Beta	Korrelation	Standardisiertes Beta x Korrelation x 100 (%)	p-Wert
Geschlecht	0,300	0,357	10,71	<0,001
HOMA _{IR}	-0,286	-0,334	9,55	<0,001
HDL-Cholesterol	0,185	0,349	6,46	<0,001
Alter	0,182	0,136	2,48	<0,001
R ² des Gesamtmodells			29,2	

3.3.3 Interventionsstudie Insulin

Um mögliche Effekte von Insulin auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel zu messen, wurde eine Interventionsstudie durchgeführt, bei der mittels eines hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps eine kurzzeitige Hyperinsulinämie induziert wurde. Die wesentlichen Charakteristika der Studienteilnehmer sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13. Charakteristika der Teilnehmer an der Interventionsstudie Insulin.

Parameter	Probanden (n=23)
Alter (Jahre)	46,9 ± 2,9
BMI (kg/m ²)	29,8 ± 1,4
M-Wert	4,8 ± 0,5
Nüchtern glukose (mg/dl)	89,5 ± 1,9
Nüchtern insulin (mU/l)	10,5 ± 1,1
HOMA _{IR}	2,3 ± 0,2
HbA1c (%)	5,2 ± 0,1
Gesamtcholesterol (mmol/l)	5,53 ± 0,23
HDL-Cholesterol (mmol/l)	1,27 ± 0,06
LDL-Cholesterol (mmol/l)	3,77 ± 0,17
Triglyzeride (mmol/l)	1,39 ± 0,15
FFA (mmol/l)	0,60 ± 0,05
Serum-Adiponectin (µg/ml)	8,74 ± 1,01

Während des Clamps blieb der kapilläre Blutglukosespiegel durch die variable Glukoseinfusion konstant bei $4,37 \pm 0,15$ mmol/l. Die mittlere Glukoseinfusionsrate bezogen auf das Körpergewicht betrug $7,55 \pm 0,28$ mg/kg Körpergewicht/min, was einer normalen Insulinsensitivität entspricht. Dagegen stiegen die Insulinspiegel von basalen $10,5 \pm 1,1$ mU/l auf $60,2 \pm 3,4$ mU/l während der Steady-State-Phase an ($p < 0,01$). Gleichzeitig bewirkte die kurzzeitig induzierte Hyperinsulinämie einen Abfall der zirkulierenden Adiponectinspiegel von $8,74 \pm 1,01$ μ g/ml vor dem Clamp auf $7,74 \pm 0,98$ μ g/ml unter stabilen Gleichgewichtsbedingungen ($p = 0,004$). Dies bedeutet eine Verringerung der Adiponectinspiegel um mehr als 10 % unter hyperinsulinämischen Bedingungen und ist in Abbildung 15 graphisch dargestellt.

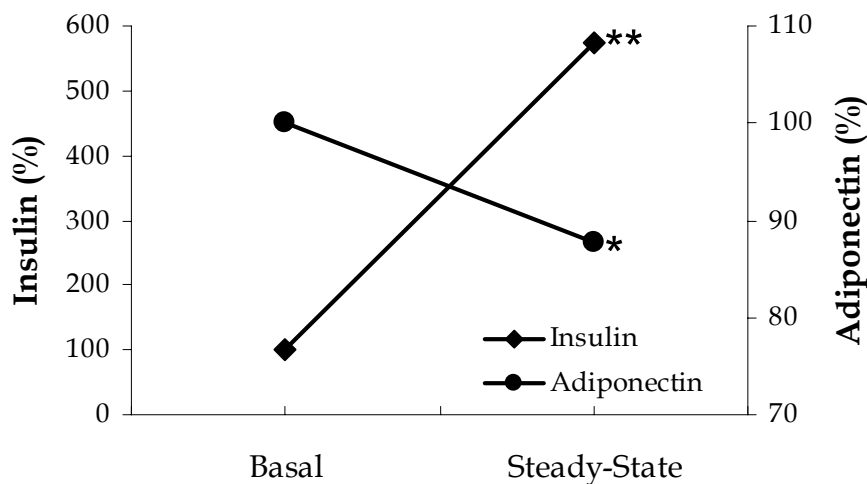


Abbildung 15. Relative Veränderungen der Insulin- und Adiponectinspiegel vor dem Clamp und unter Steady-State-Bedingungen in der Interventionsstudie Insulin. $n=23$; * $p < 0,05$.

3.3.4 PCOS Fall-Kontroll-Studie

Das polyzystische Ovarsyndrom ist unter anderem durch Übergewicht und Insulinresistenz charakterisiert. Diese Störungen können zu Typ-2-Diabetes und Atherosklerose führen. In der PCOS-Studie sollte geklärt werden, ob Adiponectin als insulinsensitivierender Faktor einen Einfluß auf den gestörten Glukosestoffwechsel bei Frauen mit einem PCO-Syndrom hat. Dazu wurden 62 Frauen mit PCOS sowie 35 gesunde weibliche Probanden hinsichtlich wichtiger Blutparameter untersucht. Die grundlegenden Charakteristika der Kohorte sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14. Vergleich ausgewählter Parameter zwischen der Kontrollgruppe und Patientinnen mit einem Polyzystisches Ovarsyndrom in der PCOS-Studie.

Parameter	Kontrollen (n=35)	PCOS (n=62)	p-Wert
Alter (Jahre)	30,4 ± 1,0	28,9 ± 0,6	0,240
BMI (kg/m ²)	25,1 ± 1,0	30,6 ± 0,9	0,001
WHR	0,78 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,058
Nüchtern glukose (mmol/l)	5,0 ± 0,1	4,4 ± 0,1	0,001
Nüchtern insulin (pmol/l)	56,3 ± 5,2	88,7 ± 7,1	<0,001
HOMA (%S)	111 ± 6	86 ± 7	0,001
LH/FSH	0,99 ± 0,08	2,00 ± 0,30	0,001
Progesteron (ng/ml)	2,37 ± 0,29	4,45 ± 1,28	0,107
17-OH-Progesteron (ng/ml)	1,48 ± 0,15	2,55 ± 0,24	0,001
DHEAS (µg/ml)	2,49 ± 0,27	2,83 ± 0,18	0,124
Androstendion (ng/ml)	1,29 ± 0,89	2,37 ± 0,11	<0,001
Testosteron (ng/ml)	1,70 ± 0,14	3,33 ± 0,17	<0,001
Estradiol (pg/ml)	48,4 ± 6,6	68,4 ± 11,9	0,687
SHBG (nmol/l)	77,5 ± 8,6	60,8 ± 6,3	0,068
Plasma-Adiponectin (µg/ml)	9,8 ± 0,6	7,6 ± 0,5	0,006

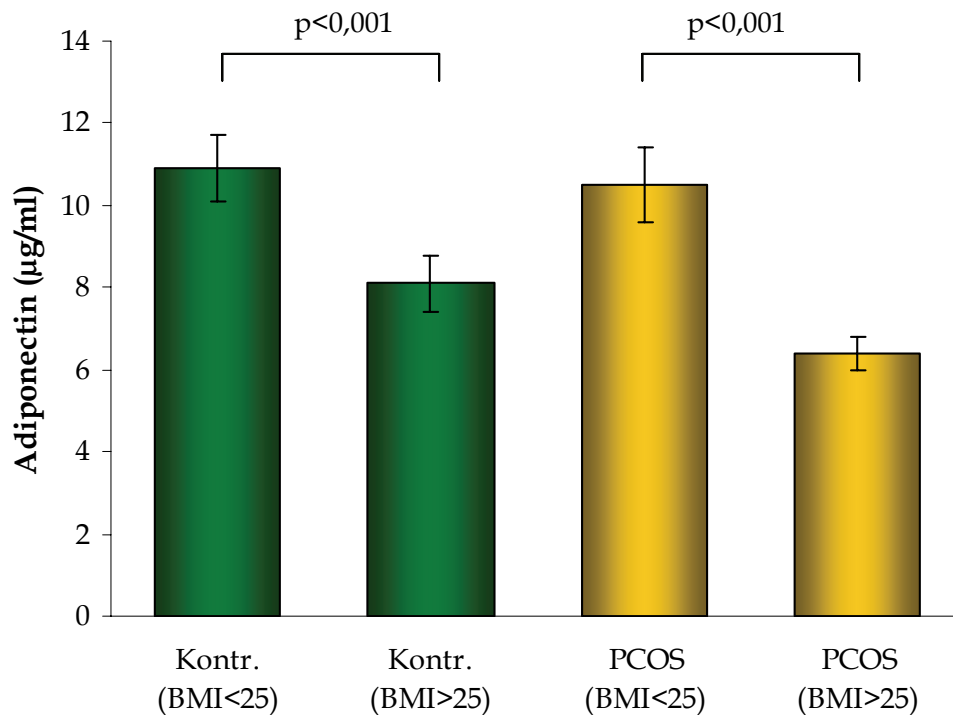
Frauen, die unter dem PCO-Syndrom litten, hatten erhöhte Spiegel an Testosteron, 17-OH-Progesteron sowie einen erhöhten LH/FSH-Quotienten. Weiterhin zeigten sie einen signifikant erhöhten BMI und waren insulinresistenter im Vergleich zu den gesunden Frauen, gemessen an höheren Nüchterninsulinwerten und dem HOMA-Index. Die Adiponectinspiegel im Plasma waren bei Frauen mit einem PCOS signifikant niedriger als bei gesunden Probandinnen (7,6 ± 0,5 µg/ml vs. 9,8 ± 0,6 µg/ml).

In vielen Studien wurde gezeigt, daß die Adiponectinspiegel mit dem BMI in engem Zusammenhang stehen. Aus diesem Grund wurden die Gruppen jeweils in Frauen mit einem BMI<25 und Frauen mit einem BMI>25 aufgeteilt. Die Charakteristika der nach dem BMI stratifizierten Gruppen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Vergleich ausgewählter Parameter zwischen der Kontrollgruppe und Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom in der PCOS-Studie, stratifiziert nach dem BMI.

Parameter	BMI<25		BMI>25	
	Kontrollen (n=21)	PCOS (n=17)	Kontrollen (n=14)	PCOS (n=46)
Alter (Jahre)	28,7 ± 1,2	28,6 ± 1,4	32,8 ± 1,5	29,0 ± 0,7
BMI (kg/m ²)	21,6 ± 0,4	21,7 ± 0,5	31,1 ± 1,1	33,9 ± 1,0
WHR	0,75 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,82 ± 0,02	0,82 ± 0,01
HOMA (%S)	119 ± 7	130 ± 14	99 ± 11	69,0 ± 5,0
LH/FSH	1,01 ± 0,09	1,79 ± 0,23	0,97 ± 0,14	2,08 ± 0,39
17-OH-Progesteron (nmol/l)	1,24 ± 0,06	2,33 ± 0,27	1,61 ± 0,30	2,61 ± 0,27
DHEAS (µmol/l)	6,39 ± 0,47	7,05 ± 0,91	6,47 ± 1,30	6,29 ± 0,55
Androstendion (nmol/l)	3,80 ± 0,24	7,88 ± 0,66	4,85 ± 0,56	8,34 ± 0,42
Testosteron (nmol/l)	1,42 ± 0,17	2,53 ± 0,24	2,08 ± 0,24	3,64 ± 0,21
Plasma-Adiponectin (µg/ml)	10,9 ± 0,8	10,5 ± 0,9	8,1 ± 0,7	6,4 ± 0,4

Die Adiponectinspiegel im Plasma waren in den übergewichtigen Gruppen signifikant niedriger als in den entsprechenden normalgewichtigen Kontrollgruppen (Abbildung 16). Zwischen den Frauen mit PCOS und den Kontrollen mit ähnlichem BMI gab es jedoch keine Unterschiede hinsichtlich des Adiponectins. Ein anschließender Vergleich der Adiponectinspiegel zwischen dem PCOS-Kollektiv und der Kontrollgruppe ergab nach Adjustierung für den BMI und das Alter keine signifikanten Unterschiede.

**Abbildung 16.** Plasma-Adiponectinspiegel bei Frauen mit PCO-Syndrom im Vergleich zu den Kontrollen in der PCOS-Studie, stratifiziert nach dem BMI. Kontrollen BMI<25 n=21; Kontrollen BMI>25 n=14; PCOS BMI<25 n=17; PCOS BMI>25 n=46.

Durch nachfolgende Korrelationsanalysen sollte eruiert werden, mit welchen Parametern die Adiponectinspiegel sowohl in der gesamten Studienkohorte als auch nur bei den Frauen mit PCOS in Zusammenhang stehen. Signifikante Korrelationen ergaben sich zwischen Adiponectin und BMI ($r=-0,516$; $p<0,001$), Nüchterninsulin ($r=-0,404$; $p<0,001$), HOMA %S ($r=-0,424$; $p<0,001$) und Testosteron ($r=-0,279$; $p<0,001$). Keinen signifikanten Zusammenhang gab es dagegen zwischen Adiponectin und Androstendion ($r=-0,112$; $p=0,325$), 17-OH-Progesteron ($r=-0,031$; $p=0,784$) sowie dem Verhältnis LH/FSH ($r=-0,033$; $p=0,753$). Ähnliche Ergebnisse ergaben die Korrelationsanalysen getrennt nach Frauen mit und ohne PCO-Syndrom.

Um unabhängige Einflußfaktoren auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel herauszufiltern, wurden multivariate lineare Regressionsanalysen mit der Adiponectinkonzentration als abhängiger Variable durchgeführt. Es wurden die Kovariaten BMI als Marker für das Übergewicht, HOMA %S als Marker für die Insulinresistenz sowie Testosteron in die Analyse eingeschlossen. Das Modell zeigte auf, daß der BMI und der Insulinresistenzindex HOMA %S unabhängig mit den Adiponectinspiegeln assoziiert waren, nicht jedoch der Testosteronspiegel (Tabelle 16).

Tabelle 16. Lineare Regressionsanalyse mit Plasma-Adiponectin als unabhängigem Parameter in der PCOS-Kohorte. Einschlußverfahren; $n=97$.

Parameter	Standardisiertes Beta	Korrelation	Standardisiertes Beta x Korrelation x 100 (%)	p-Wert
BMI	-0,315	-0,511	16,1	0,014
HOMA (%S)	0,265	0,498	13,2	0,043
Testosteron	-0,057	-0,298	1,7	0,612
R ² des Gesamtmodells			31,0	

Das Gesamtmodell konnte lediglich 31 % der Variation in den Adiponectinspiegeln erklären, so daß es weitere Faktoren geben muß, die die zirkulierenden Adiponectinspiegel unabhängig beeinflussen. Weiterhin spielte die Hyperandrogenämie als typischer PCOS-assoziiertes Faktor in dieser Analyse keine Rolle. In Übereinstimmung dazu ergab eine Korrelationsanalyse keinen Zusammenhang zwischen Adiponectin und dem PCOS.

Da Adiponectin in Zusammenhang mit einer Insulinresistenz zu stehen scheint und eine Insulinresistenz wiederum negative Auswirkungen auf die metabolischen Veränderungen und den Verlauf des PCOS hat, wurde geprüft, ob Adiponectin ein Faktor sein könnte, der speziell bei PCOS-Patientinnen eng mit einer gestörten Insulinsensitivität verbunden ist. Als Marker für die Insulinsensitivität wurde der CIGMA %S verwendet. Korrelationsanalysen ergaben bei den Frauen mit PCOS einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen CIGMA %S und Plasma-Adiponectin ($r=0,55$; $p<0,001$), sowie negative Korrelationen mit dem BMI ($r=-0,575$; $p<0,001$), der WHR ($r=-0,48$; $p=0,001$), der Gesamtkörperfettmasse ($r=-0,61$; $p<0,001$), der Fettmasse des Rumpfs ($r=-0,59$; $p<0,001$) sowie dem Testosteronspiegel ($r=-0,42$; $p=0,001$). Keine signifikanten Korrelationen er-

gaben sich zwischen CIGMA%S und dem Verhältnis FH/FSH ($r=-0,05$; $p=0,7$), Estradiol ($r=-0,08$; $p=0,5$), Progesteron ($r=0,05$; $p=0,6$), Androstendion ($r=-0,09$; $p=0,5$), 17-OH-Progesteron ($r=-0,13$; $p=0,3$) oder DHEAS ($r=-0,10$; $p=0,4$). Ähnliche Ergebnisse erzielten die Analysen im Gesamtkollektiv bzw. die Untersuchungen mit dem Insulinresistenzindex HOMA%S oder Nüchterninsulin als weiteren Parametern für die Insulinsensitivität.

Um den Einfluß verschiedener Parameter auf die Insulinsensitivität näher zu untersuchen, wurden erneut multivariate lineare Regressionsanalysen mit CIGMA%S als abhängiger Variable durchgeführt. Als Kovariaten wurden jeweils Adiponectin, das Alter, Testosteron und ein Parameter für das Übergewicht (BMI, Gesamtkörperfettmasse oder Fettmasse des Rumpfs) in die Analyse eingeschlossen. Die Regressionsanalyse zeigte, daß sowohl das Alter, die Adiponectinspiegel als auch verschiedene Marker für eine Adipositas unabhängig mit der Insulinsensitivität assoziiert waren, nicht jedoch die Testosteronspiegel (Tabelle 17).

Tabelle 17. Lineare Regressionsanalyse mit CIGMA% als unabhängigem Parameter bei Frauen mit einem PCO-Syndrom. Einschlußverfahren mit den eingeschlossene Kovariaten Alter, Adiponectin, Testosteron sowie einem der folgenden Parameter für Adipositas: BMI, Gesamtkörperfettmasse oder Fettmasse des Rumpfs (DEXA-Messung); $n=62$.

Parameter	Standardisiertes Beta	Korrelation	Standardisiertes Beta x Korrelation x 100 (%)	p-Wert
BMI				
Alter	0,22	0,252	5,5	0,02
Plasma-Adiponectin	0,321	0,586	18,8	0,003
BMI	-0,413	-0,61	25,2	<0,001
Testosteron	-0,183	-0,414	7,5	0,058
R ² des Gesamtmodells			57,0	
Gesamtkörperfett				
Alter	0,273	0,301	8,2	0,011
Plasma-Adiponectin	0,302	0,574	17,3	0,011
Gesamtkörperfett	-0,462	-0,631	29,2	<0,001
Testosteron	-0,116	-0,416	4,8	0,294
R ² des Gesamtmodells			59,5	
Fettmasse Rumpf				
Alter	0,267	0,316	8,4	0,022
Plasma-Adiponectin	0,314	0,562	17,7	0,014
Fettmasse Rumpf	-0,396	-0,589	23,3	<0,001
Testosteron	-0,148	-0,442	6,5	0,222
R ² des Gesamtmodells			55,9	

In allen drei Modellen konnte die Variabilität der Insulinsensitivität beim PCOS zu annähernd 60 % durch das Alter, Adiponectin und einen Parameter für die Adipositas erklärt werden, wobei das zirkulierende Adiponectin im Plasma zu ungefähr 19 % beteiligt war.

Im Anschluß an die Untersuchungen wurde mit 9 übergewichtigen, insulinresistenten, an PCOS erkrankten Frauen eine Interventionsstudie in Form einer Behandlung mit Metformin durchgeführt. Nach sechsmonatiger Metformingabe konnten die Patientinnen ihr Übergewicht deutlich verringern (Gewichtsabnahme um $1,73 \pm 0,67$ kg; $p=0,011$; BMI $31,6 \pm 1,3$ kg/m² vs. $29,6 \pm 1,0$ kg/m²; Gesamtkörperfettmasse $39,444 \pm 2,542$ kg vs. $34,376 \pm 1,964$ kg; $p=0,028$; Fettmasse des Rumpfs $19,012 \pm 0,988$ kg vs. $15,782 \pm 0,888$ kg; $p=0,028$). Weiterhin konnte die Hyperandrogenämie deutlich verbessert werden; die Testosteronspiegel sanken von $1,05 \pm 0,13$ pg/ml auf $0,75 \pm 0,70$ pg/ml ($p=0,032$). Die Insulinsensitivität war nach der Behandlung leicht erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Adiponectinspiegel blieben während der Intervention aber unverändert ($6,1 \pm 0,8$ µg/ml vs. $6,2 \pm 0,7$ µg/ml; $p=0,59$).

3.4 *Adiponectin-Oligomere*

Adiponectin ist mit verschiedenen Komplikationen innerhalb des Metabolischen Syndroms verbunden. Das Protein zirkuliert in drei verschiedenen oligomeren Formen, die unterschiedliche biologische Funktionen ausüben können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Assoziationen zwischen der Oligomerverteilung und dem Metabolismus bestehen, vor allem im Hinblick auf eine Adipositas und den Glukosestoffwechsel. Weiterhin stellte sich die Frage, ob sich die einzelnen Oligomere ähnlich dem Gesamtadiponectin darstellen, oder ob sich unterschiedliche Verbindungen zu Parametern des Stoffwechsels ergeben.

3.4.1 Oligomere und Adipositas

3.4.1.1 Oligomerverteilung und Adipositas in MeSyBePo

Ziel dieser Studie war es, die Oligomerverteilung vor allem im Hinblick auf das Übergewicht zu analysieren. Dafür wurden aus dem MeSyBePo-Kollektiv 102 gesunde Probanden mit normaler Glukosetoleranz, aber unterschiedlichem BMI ausgewählt und bei ihnen neben wichtigen Blutparametern auch die Oligomerverteilung des Adiponectins gemessen. Die Charakterisierung dieser Subkohorte ist in Tabelle 18 dargestellt.

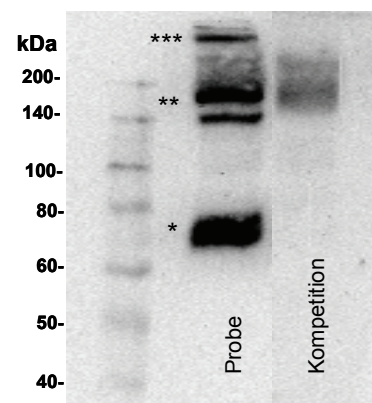
Tabelle 18. Vergleich ausgewählter Parameter zwischen Frauen und Männern in einer Subkohorte von MeSyBePo.

Parameter	Frauen (n=68)	Männer (n=34)	p-Wert
Alter (Jahre)	46,22 ± 1,65	49,78 ± 2,50	0,226
BMI (kg/m ²)	27,52 ± 0,84	27,19 ± 0,77	0,804
WHR	0,85 ± 0,01	0,96 ± 0,01	<0,001
Nüchtern glukose (mg/dl)	87,35 ± 0,81	88,86 ± 1,38	0,227
Nüchtern insulin (mU/l)	7,82 ± 0,54	7,48 ± 0,87	0,279
HOMA _{IR}	1,68 ± 0,11	1,63 ± 0,19	0,344
Cholesterol (mmol/l)	5,36 ± 0,13	5,37 ± 0,20	0,955
HDL Cholesterol (mmol/l)	1,61 ± 0,05	1,23 ± 0,04	<0,001
LDL Cholesterol (mmol/l)	3,11 ± 0,10	3,45 ± 0,17	0,075
Triglyzeride (mmol/l)	1,35 ± 0,11	1,52 ± 0,18	0,517
FFA (mmol/l)	0,48 ± 0,03	0,70 ± 0,20	0,366
Systole (mmHg)	117,68 ± 1,78	129,29 ± 2,28	<0,001
Diastole (mmHg)	74,46 ± 1,19	76,06 ± 1,52	0,421
Serum-Adiponectin (µg/ml)	12,29 ± 0,49	9,69 ± 0,58	0,002

Wie erwartet hatten Männer signifikant geringere Adiponectinspiegel als Frauen (Abbildung 18). Um Zusammenhänge zwischen Adiponectin und metabolischen Parametern in der Subkohorte zu analysieren, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Eine starke positive Korrelation ergab sich zwischen Adiponectin und HDL-Cholesterol; negative Assoziationen bestanden dagegen zu den Parametern BMI, WHR, Triglyzeride, Nüchterninsulin sowie dem HOMA-Index für die Insulinresistenz (Tabelle 19).

Es folgte die Analyse der einzelnen Oligomere. Mittels Western Blot-Analyse unter nicht-denaturierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen konnten die Oligomere visualisiert und anschließend einer Semiquantifizierung unterzogen werden. Spezifische Oligomere fanden sich bei ~70 kDa (Trimer, LMW „Low Molecular Weight“), 140 kDa und 180 kDa (Hexamer, MMW „Medium Molecular Weight“) sowie bei >300 kDa (Multimer, HMW „High Molecular Weight“). Die Spezifität der Banden wurde durch eine Kompetitionsanalyse nachgewiesen (Abbildung 17).

Mittels Densitometrie wurden die prozentualen Anteile der jeweiligen Oligomere am Gesamtprotein ermittelt (relative Oligomere, %Oligomer) und deren absoluter Anteil auf Grundlage der Gesamtadiponectinkonzentration im Serum kalkuliert (absolute Oligomere). In dieser Studie zirkulierte das Adiponectin vorwiegend als MMW-Fraktion (48,29 % ± 0,97 %), gefolgt von der

**Abbildung 17.** Beispielhafte Darstellung eines Western Blots mit den Oligomeren LMW*, MMW** und HMW*** sowie der Kompetitionsanalyse.

LMW-Fraktion (38,33 % \pm 1,53 %) und der HMW-Fraktion (13,38 % \pm 0,93 %). Auch hier konnten Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet werden (Abbildung 17). Die Frauen wiesen tendenziell einen höheren Anteil an %HMW-Adiponectin auf als die Männer (14,68 % \pm 1,27 % vs. 10,78 % \pm 1,03 %; $p=0,061$). Keine Unterschiede gab es dagegen bei %MMW- und %LMW-Adiponectin. Bei den absoluten Oligomeren hatten sowohl die Frauen als auch die Männer vergleichbare Mengen an LMW-Adiponectin im Serum (4,69 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \pm 0,31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vs. 3,89 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \pm 0,33 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p=0,084$), jedoch wurden bei den Frauen signifikant höhere Mengen an HMW (1,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \pm 0,19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vs. 1,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \pm 0,14 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p=0,006$) und MMW-Adiponectin (5,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \pm 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vs. 4,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ \pm 0,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p=0,018$) nachgewiesen.

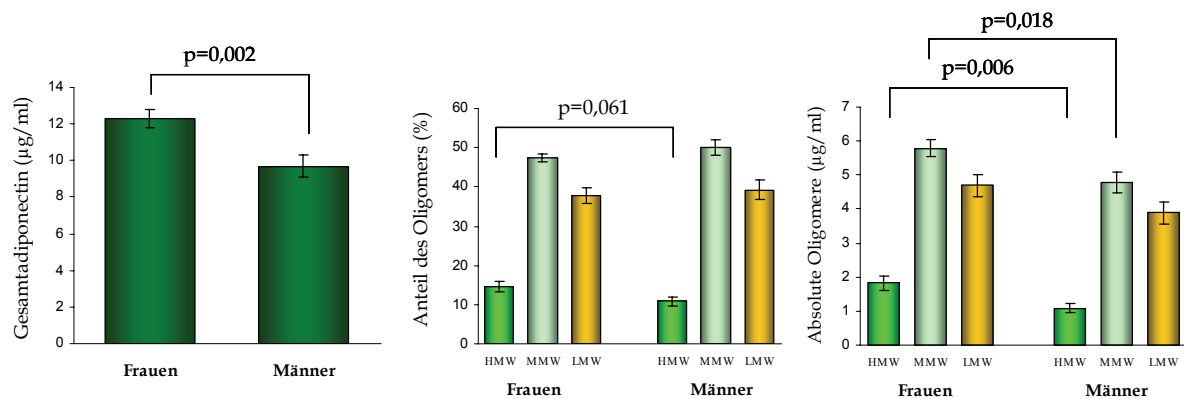


Abbildung 18. Gesamtadiponectin und Adiponectin-Oligomere im Serum in Abhängigkeit vom Geschlecht in einer Subkohorte von MeSyBePo. Angabe von prozentualen und absoluten Werten für die Oligomere; Frauen $n=68$, Männer $n=34$.

Anschließend wurde untersucht, ob die Oligomerverteilung mit metabolischen Parametern in Zusammenhang steht und ob sich mögliche Assoziationen von denen mit Gesamtadiponectin unterscheiden. Korrelationsanalysen ergaben für die einzelnen Oligomere ein sehr vielfältiges Bild. Die prozentualen Oligomere korrelierten mit dem BMI, nicht aber mit Parametern des Glukosestoffwechsels. Hinsichtlich des Fettstoffwechsels korrelierte lediglich das hochmolekulare Adiponectin mit HDL-Cholesterol, die Triglyzeride waren dagegen mit %HMW- und %LMW-Adiponectin leicht assoziiert (Tabelle 19). Betrachtete man weiterhin die absoluten Oligomere, ergab sich für HMW- und MMW-Adiponectin ein ähnliches Bild wie für das Gesamtadiponectin. Das Trimer korrelierte im Gegensatz dazu mit keinem der ausgewählten Parameter (Tabelle 19).

Tabelle 19. Korrelationen zwischen Adiponectin bzw. seinen Oligomeren und ausgewählten anthropometrischen und klinischen Parametern in einer Subkohorte von MeSyBePo. *p<0,05; **p<0,001; n=102.

Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. Spearman							
Parameter	%HMW	%MMW	%LMW	HMW	MMW	LMW	Gesamt-adiponectin
<i>Anthropometrische Parameter</i>							
BMI	-0,264*	-0,251*	0,368**	-0,289**	-0,329**	0,102	-0,201*
WHR	-0,179	-0,041	0,074	-0,287**	-0,329**	-0,089	-0,318**
<i>Parameter des Fettstoffwechsels</i>							
Cholesterol	-0,088	-0,044	0,145	-0,090	-0,016	0,010	0,006
HDL-Cholesterol	0,297**	0,066	-0,180	0,425**	0,434**	0,113	0,437**
LDL-Cholesterol	-0,086	-0,065	0,171	-0,104	-0,058	0,002	-0,033
Triglyzeride	-0,290**	-0,063	0,232*	-0,402**	-0,349**	-0,064	-0,341**
<i>Parameter des Glukosesstoffwechsels</i>							
Nüchternglukose	-0,183	-0,175	0,208*	-0,172	-0,178	0,103	-0,123
Nüchterninsulin	-0,069	0,024	0,180	-0,207*	-0,263**	-0,056	-0,233*
HOMA_{IR}	-0,096	-0,052	0,184	-0,234*	-0,289**	-0,040	-0,246*

Um den Zusammenhang zwischen Adiponectin bzw. seinen Oligomeren und dem BMI näher zu charakterisieren, wurden die Probanden in fünf Gruppen mit unterschiedlichem BMI unterteilt. Mittelwertvergleiche mittels einfaktorieller ANOVA ergaben signifikante Unterschiede in den Gruppen hinsichtlich der Faktoren Alter, WHR, Nüchterninsulin, HOMA_{IR}, Triglyzeride sowie systolischer und diastolischer Blutdruck. Die Adiponectinspiegel unterschieden sich nicht signifikant in den jeweiligen Untergruppen, lediglich ein Trend sinkender Adiponectinspiegel bei ansteigendem BMI war zu erkennen. Betrachtete man die einzelnen Oligomere, ergaben sich sowohl bei den prozentualen als auch bei den absoluten Adiponectinspiegeln für HMW und MMW signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Post-Hoc-Tests zeigten, daß die Unterschiede vornehmlich zwischen den Probanden mit einem BMI von 30 bis 40 und den Probanden mit einem BMI von 20 bis 25 bzw. von 25 bis 30 auftraten (Abbildung 19).

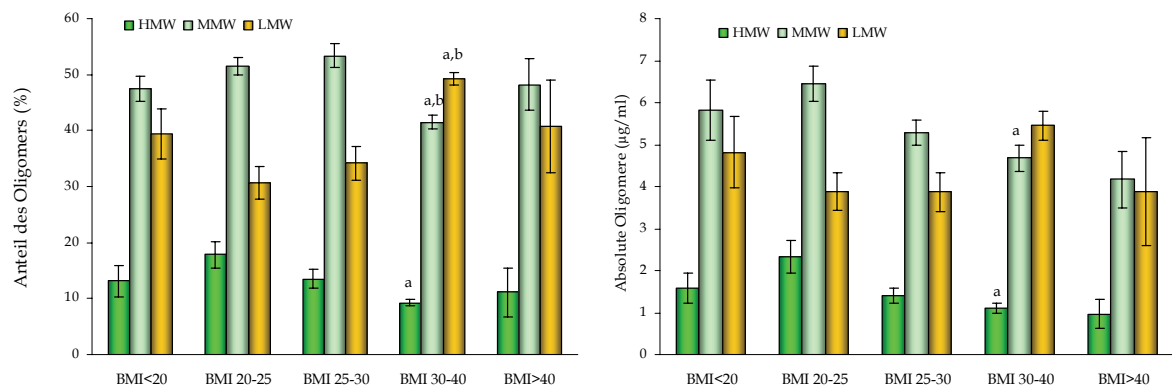


Abbildung 19. Oligomerverteilung des Adiponectins im Serum in Abhängigkeit vom BMI in einer Subkohorte von MeSyBePo. (BMI <20 n=11; BMI 20-25 n=29; BMI 25-30 n=28; BMI 30-40 n=29; BMI >40 n=5); a signifikant im Vergleich zu dem entsprechenden Oligomer in der normalgewichtigen Gruppe (BMI 20-25); b signifikant im Vergleich zu dem entsprechenden Oligomer in der Gruppe mit einem BMI von 25-30.

Im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden mit einem BMI von 20 bis 25 hatten adipöse Probanden mit einem BMI von 30 bis 40 einen erniedrigten Anteil an den HMW- und MMW-Spezies zugunsten einer Erhöhung der LMW-Spezies. Ein signifikanter Unterschied ergab sich ebenfalls für MMW- und LMW-Adiponectin zwischen den Gruppen mit einem BMI von 25 bis 30 und einem BMI von 30 bis 40. Bei den absoluten Oligomeren wiesen normalgewichtige Probanden höhere Mengen an den HMW- und MMW-Spezies auf als Probanden mit einem BMI zwischen 30 und 40.

Um Faktoren herauszufiltern, die Änderungen in der Variabilität des Adiponectins oder seinen Oligomeren unabhängig vorhersagen können, wurden multivariate lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Gesamtadiponectin war unabhängig mit HDL-Cholesteroll, HOMA_{IR} und dem Geschlecht assoziiert; diese drei Parameter konnten 27 % der Variabilität des Adiponectins erklären. Hinsichtlich der prozentualen Oligomere beein-

flußten HDL-Cholesterol (7,1 %) und die Triglyzeride (4,8 %) die HMW-Fraktion, während %MMW und %LMW vom BMI (7,0 % bzw. 9,2 %) mitbestimmt wurden, allerdings konnten die Modelle nur einen sehr geringen Prozentsatz der Variabilität der prozentualen Oligomere erklären. Bei den absoluten Oligomeren ergab sich bei der HMW- und der MMW-Fraktion ein ähnliches Bild wie beim Gesamtadiponectin, sie wurden durch HDL-Cholesterol, den HOMA-Index und bei HMW zusätzlich durch die Triglyzeride bestimmt, während bei der LMW-Fraktion keiner der ausgewählten Parameter einen signifikanten Einfluß zeigte (Tabelle 20). Jedoch konnten die Modelle analog dem Gesamtadiponectins jeweils 27 % bzw. 26 % der Variabilität des absoluten HMW- und MMW-Adiponectins erklären. Beim LMW waren es sogar nur 6 %.

Tabelle 20. Lineare Regressionsanalyse mit Serum-Adiponectin bzw. den absoluten Adiponectin-Oligomeren als unabhängigen Parametern in einer Subkohorte von MeSyBePo. Rückwärtsanalyse mit den initial eingeschlossenen Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI, WHR, Gesamtcholesterol, Triglyzeride, HDL-Cholesterol und HOMA_{IR}; n=102.

Parameter	Standardisiertes Beta	Korrelation	Standardisiertes Beta x Korrelation x 100 (%)	p-Wert
Gesamtadiponectin				
Geschlecht	-0,167	-0,302	5,04	0,095
HDL-Cholesterol	0,310	0,437	13,55	0,003
HOMA _{IR}	-0,265	-0,319	8,45	0,004
R ² des Gesamtmodells			27,0	
Absolutes HMW-Adiponectin				
HDL-Cholesterol	0,328	0,425	13,94	0,001
Triglyzeride	-0,198	-0,351	6,97	0,039
HOMA _{IR}	-0,182	-0,298	5,42	0,049
R ² des Gesamtmodells			26,3	
Absolutes MMW-Adiponectin				
HDL-Cholesterol	0,381	0,434	16,38	<0,001
HOMA _{IR}	-0,280	-0,352	9,86	0,002
R ² des Gesamtmodells			26,2	
Absolutes LMW-Adiponectin				
Geschlecht	-0,185	-0,165	3,05	0,065
Alter	0,175	0,154	2,70	0,081
R ² des Gesamtmodells			5,8	

Die Regressionsanalysen wurden anschließend wiederholt, jedoch wurde HDL-Cholesterol als abhängiger Faktor gewählt (Daten sind nicht dargestellt). Hierbei zeigte sich, daß das Geschlecht den größten Einfluß auf die HDL-Cholesterolspiegel hatte, und Gesamtadiponectin mit 11 % ebenfalls Änderungen des Fettstoffwechselfaktors erklären konnte. Die Oligomere für sich hatten in dieser Subkohorte jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Variabilität des HDL-Cholesterols.

3.4.1.2 Oligomere im Gewichtsabnahme-Kollektiv

In dieser Studie wurde die Rolle von Adiponectin und seinen Oligomeren bei der Gewichtsabnahme von 17 übergewichtigen Probanden untersucht. Tabelle 21 zeigt grundlegende Charakteristika der Studienteilnehmer vor und nach der Gewichtsreduktion.

Tabelle 21. Vergleich ausgewählter anthropometrischer und klinischer Parameter vor und nach der Gewichtsreduktion im Gewichtsabnahme-Kollektiv. BIA=Bioelektrische Impedanz-Analyse; BCM=Körperzellmasse (body cell mass); FA=Fettanteil (fat allotment); n=17.

Parameter	Vor Gewichtsreduktion	Nach Gewichtsreduktion	p-Wert
Alter (Jahre)	51,8 ± 2,8		
Geschlecht (w/m)	15/2		
Gewicht (kg)	96,2 ± 3,1	90,0 ± 2,6	<0,001
BMI (kg/m ²)	35,1 ± 1,2	32,8 ± 1,1	<0,001
WHR	0,94 ± 0,02	0,92 ± 0,02	0,442
BIA BCM (kg)	31,7 ± 0,6	33,6 ± 0,9	0,010
BIA-Fettmasse (kg)	39,6 ± 1,8	34,3 ± 2,0	<0,001
BIA FA (%)	39,5 ± 0,8	37,3 ± 1,0	0,005
Respiratorischer Quotient	0,87 ± 0,01	0,86 ± 0,01	0,497
Grundumsatzrate (kcal)	1.537 ± 60	1.391 ± 43	<0,001
M-Wert	2,9 ± 0,3	3,2 ± 0,2	0,320
Nüchtern glukose (mmol/l)	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,2	0,802
HbA _{1C} (%)	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,1	1,000
C-reaktives Protein (mg/l)	4,5 ± 0,8	4,5 ± 0,8	0,991
Gesamtcholesterol (mmol/l)	5,7 ± 0,2	5,9 ± 0,2	0,305
HDL-Cholesterol (mmol/l)	1,28 ± 0,06	1,36 ± 0,06	0,029
LDL-Cholesterol (mmol/l)	3,7 ± 0,1	3,8 ± 0,1	0,693
Triglyzeride (mmol/l)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,699
FFA (mmol/l)	0,74 ± 0,05	0,63 ± 0,06	0,121
Serum-Adiponectin (µg/ml)	5,3 ± 0,5	6,1 ± 0,6	0,076
HMW (µg/ml)	0,37 ± 0,07	0,49 ± 0,08	0,042
MMW (µg/ml)	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,3	0,007
LMW (µg/ml)	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,2	0,609
HMW (%)	6,7 ± 0,9	7,9 ± 0,7	0,100
MMW (%)	43,1 ± 1,4	46,1 ± 1,5	0,070
LMW (%)	50,0 ± 1,8	45,8 ± 1,7	0,055

Nach der sechsmonatigen Gewichtsreduktionsphase konnten die Probanden ihr Gewicht um durchschnittlich 6 kg verringern (von 96,2 ± 3,1 kg auf 90,0 ± 2,6 kg), was mit einer signifikanten Absenkung des BMI einherging (von 35,1 ± 1,2 kg/m² auf 32,8 ± 1,1 kg/m²). Hinsichtlich der Körperzusammensetzung erhöhte sich der Anteil der Körperzellmasse (BIA BCM), während sich die Fettmasse verringerte. Der basale metabolische Grundumsatz sank jedoch ebenfalls ab. Parameter des Glukose- und Fettstoffwechsels veränderten sich nur gering, einzig das HDL-Cholesterol stieg signifikant an (1,28 ± 0,06 mmol/l vs. 1,36 ± 0,06 mmol/l) (siehe Tabelle 21). Der Gesamtadiponectinspiegel veränderte sich

durch die Gewichtsabnahme nicht signifikant. Hinsichtlich der Adiponectin-Oligomere fand eine Verschiebung von der Fraktion mit geringem Molekulargewicht hin zu den Fraktionen mit höherem Molekulargewicht statt. Dies wurde sowohl bei den prozentualen Oligomeren als auch bei den absoluten Mengen der einzelnen Oligomere deutlich. Korrelationsanalysen zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Adiponectin und dem Körpergewicht sowohl vor als auch nach der Gewichtsreduktion, jedoch ließ sich ein Trend von zunehmenden Adiponectinspiegeln bei Verringerung des Körpergewichts erkennen. Bei der Betrachtung der einzelnen Oligomere ließen sich vor der Gewichtsreduktion keine Korrelationen zum Körpergewicht feststellen. Nach der Gewichtsreduktion waren die prozentualen Anteile von HMW- und LMW-Adiponectin jedoch signifikant mit dem Körpergewicht assoziiert. Dabei waren Körpergewicht und HMW-Adiponectin invers korreliert ($r=-0,695$; $p=0,002$), der Zusammenhang mit der LMW-Fraktion war dagegen positiv ($r=0,579$; $p=0,015$). Für die MMW-Oligomere zeigte sich nach Gewichtsabnahme ähnlich der HMW-Fraktion ein Trend zu ansteigenden Anteilen bei abnehmendem Gewicht. Für die absoluten Oligomerspiegel im Serum ließen sich dagegen keinerlei Zusammenhänge mit dem Körpergewicht sowohl vor als auch nach der Gewichtsreduktion herstellen (Tabelle 22).

Tabelle 22. Korrelationen zwischen Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$) bzw. seinen einzelnen Oligomeren und dem Körpergewicht bzw. HDL-Cholesterol vor und nach Gewichtsabnahme im Gewichtsabnahme-Kollektiv. Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten nach Pearson; $n=17$.

Parameter	Körpergewicht (kg)		HDL-Cholesterol	
	Vor Gewichtsabnahme	Nach Gewichtsabnahme	Vor Gewichtsabnahme	Nach Gewichtsabnahme
%HMW	-0,266	-0,695*	0,289	0,479
%MMW	0,040	-0,352	0,192	0,303
%LMW	0,060	0,579*	-0,258	-0,445
aHMW	-0,366	-0,331	0,455	0,665*
aMMW	-0,185	-0,179	0,407	0,604*
aLMW	-0,229	0,008	0,114	0,039*
Adiponectin	-0,258	-0,157	0,346	0,610*

Als nächstes wurde untersucht, ob Adiponectin oder die einzelnen Oligomere mit metabolischen Veränderungen als Folge des Übergewichts assoziiert sind. Dazu wurden Korrelationsanalysen mit Parametern des Glukose- und Fettstoffwechsels durchgeführt. In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen Adiponectin oder seinen Oligomeren und dem M-Wert als Maß für die Insulinsensitivität gefunden werden, weder vor noch nach der Gewichtsreduktionsphase. Im Gegensatz dazu konnte eine starke positive Korrelation zwischen Gesamtadiponectin und HDL-Cholesterol als Parameter des Fettstoffwechsels nachgewiesen werden ($r=0,346$; $p=0,206$), welche sich nach der Gewichtsreduktion sogar noch verstärkte und statistisch signifikant wurde ($r=0,61$; $p=0,016$). Hinsichtlich der einzelnen Oligomere konnte ebenfalls festgestellt werden, daß sich die

Korrelationen mit HDL-Cholesterol nach der Gewichtsabnahme verstärkten. Dabei war der Zusammenhang zwischen HDL-Cholesterol und den prozentualen Anteilen von HMW- (p=0,052) bzw. MMW-Adiponectin (p=0,237) jeweils positiv, der Zusammenhang mit LMW-Adiponectin (p=0,073) dagegen negativ. Besonders stark stellte sich die Assoziation zwischen den absoluten Oligomeren und HDL-Cholesterol dar, die nach der Gewichtsreduktionsphase hochsignifikant waren (Tabelle 22).

Um den Zusammenhang zwischen Adiponectin und HDL-Cholesterol näher zu beleuchten, wurden multivariate lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, welche Faktoren Änderungen des HDL-Cholesterols sowohl vor als auch nach der Gewichtsreduktion unabhängig voraussagen können. Die Modelle wurden mit Gesamtadiponectin oder den einzelnen Oligomeren und weiteren relevanten Kovariaten berechnet, wobei nicht signifikante Parameter schrittweise ausgeschlossen wurden. Die Resultate lassen vermuten, daß HDL-Cholesterol vor allem durch HMW-Adiponectin bestimmt wird. Vor der Gewichtsreduktion konnten 60 % der Variabilität von HDL-Cholesterol durch HMW-Adiponectin und die freien Fettsäuren (FFA) erklärt werden, mit Gesamtadiponectin und den freien Fettsäuren waren es nur 41 % (Tabelle 23).

Tabelle 23. Lineare Regressionsanalyse im Gewichtsabnahme-Kollektiv mit HDL-Cholesterol als unabhängigem Parameter. Rückwärtsanalyse mit schrittweisem Ausschluß von nicht signifikanten Kovariaten. A) HMW-Adiponectin als Kovariate und B) Gesamtadiponectin als Kovariate in die Analyse eingeschlossen; n=17.

Parameter	Standardisiertes Beta	Korrelation	Standardisiertes Beta x Korrelation x 100 (%)	p-Wert
A				
HMW-Adiponectin	-0,548	-0,614	33,64	0,012
Freie Fettsäuren	-0,475	-0,552	26,22	0,024
R ² des Gesamtmodells			59,86	0,004
B				
Gesamtadiponectin	-0,479	-0,603	28,88	0,043
Freie Fettsäuren	-0,404	-0,313	12,65	0,081
R ² des Gesamtmodells			41,53	0,014

3.4.2 Oligomerverteilung und Glukosestoffwechsel

3.4.2.1 Oligomere und gestörter Glukosestoffwechsel in MeSyBePo

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Adiponectin bzw. den Oligomeren und der Entstehung von Typ-2-Diabetes untersuchen zu können, wurde wiederum aus der Gesamtkohorte von MeSyBePo eine Subkohorte mit ähnlichem BMI (BMI 25-30) ausgewählt, welche Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT), gestörter Glukosetoleranz (IGT) sowie Probanden mit einem Typ-2-Diabetes (T2DM) enthielt. Die grundlegenden Charakteristika der Probanden sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24. Vergleich ausgewählter anthropometrischer und klinischer Parameter bei Probanden einer Subkohorte von MeSyBePo in Abhängigkeit vom Status ihres Glukosestoffwechsels. NGT= normale Glukosetoleranz; IGT=gestörte Glukosetoleranz; T2DM=Typ-2-Diabetes mellitus; n=59.

Parameter	NGT	IGT	T2DM	p-Wert
Geschlecht (m/w)	15/13	7/8	9/7	
Alter (Jahre)	50,11 ± 2,57	62,83 ± 2,00	62,55 ± 1,90	<0,001
BMI (kg/m ²)	27,40 ± 0,28	27,27 ± 0,44	26,72 ± 0,32	0,344
WHR	0,90 ± 0,01	0,94 ± 0,02	0,94 ± 0,02	0,196
Nüchternglukose (mg/dl)	86,90,0 ± 1,66	92,79 ± 1,05	114,02 ± 3,07	<0,001
Nüchterninsulin (mU/l)	8,17 ± 0,78	8,13 ± 1,47	12,56 ± 3,65	0,456
HOMA _{IR}	1,72 ± 0,15	1,88 ± 0,34	3,75 ± 1,23	0,048
Cholesterol (mmol/l)	5,41 ± 0,20	5,48 ± 0,22	5,61 ± 0,26	0,807
HDL Cholesterol (mmol/l)	1,42 ± 0,07	1,38 ± 0,07	1,44 ± 0,08	0,870
LDL Cholesterol (mmol/l)	3,42 ± 0,18	3,52 ± 0,21	3,42 ± 0,22	0,932
Triglyzeride (mmol/l)	1,25 ± 0,10	1,39 ± 0,16	1,57 ± 0,14	0,158
FFA (mmol/l)	0,47 ± 0,05	0,62 ± 0,06	0,55 ± 0,09	0,192
Systole (mmHg)	123,86 ± 2,74	128,93 ± 3,52	139,53 ± 5,83	0,019
Diastole (mmHg)	75,75 ± 1,70	78,67 ± 2,01	78,53 ± 2,00	0,438
Adiponectin (µg/ml)	10,49 ± 0,71	9,20 ± 0,89	9,03 ± 1,33	0,452

Per Definition unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich der Parameter für den Glukosestoffwechsel signifikant voneinander. Patienten mit einem Typ-2-Diabetes wiesen einen höheren Blutglukosespiegel sowie einen höheren Wert für den Insulinresistenzindex auf. Zusätzlich waren Probanden mit IGT oder T2DM älter als die Kontrollgruppe und hatten einen höheren systolischen Blutdruck, was jedoch ungewollt war. Ein Vergleich der Adiponectinspiegel zwischen den Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede. Auch in der Gesamtkohorte hatten die Probanden mit einem BMI zwischen 25 und 30 vergleichbare Adiponectinspiegel, unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes (NGT 11,17 ± 0,57 vs. T2DM 12,09 ± 1,96; p=0,80; n=151/51).

Um Zusammenhänge zwischen Adiponectin und metabolischen Parametern aufzudecken, wurden lineare Korrelationsanalysen durchgeführt. Diese ergaben Assoziationen zwischen Adiponectin und HDL-Cholesterol sowie den Triglyzeriden, nicht jedoch zu

Parametern des Glukosestoffwechsels. Bei Betrachtung der Oligomerverteilung konnte jedoch ein negativer Zusammenhang zwischen den MMW-Spezies und den Blutzuckerspiegeln gezeigt werden (prozentual: $r=-0,382$, $p=0,003$; absolut: $r=-0,295$, $p=0,023$). Die enge Verbindung zwischen dem Fettstoffwechsel und Adiponectin wurde auch auf der Ebene der Oligomere bestätigt. HDL-Cholesterol korrelierte sowohl mit der prozentualen als auch mit der absoluten HMW-Spezies. Dabei war die Korrelation zum absoluten HMW-Adiponectin am größten (Abbildung 20).

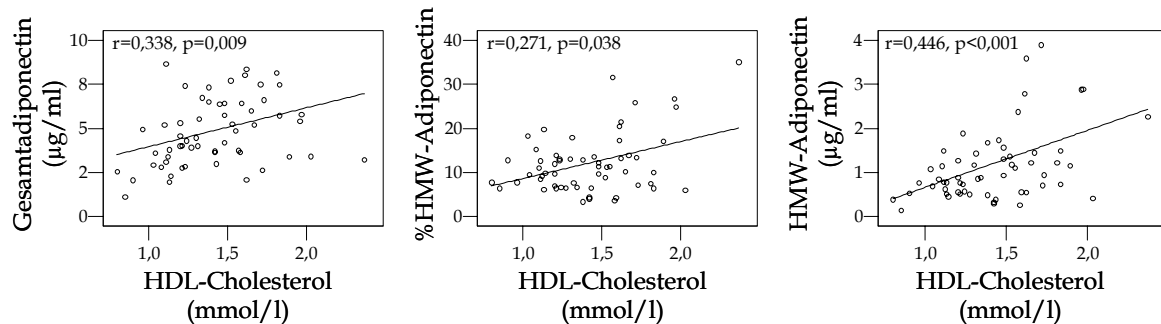


Abbildung 20. Korrelationsanalyse zwischen HDL-Cholesterol und dem Gesamtadiponectin bzw. dem hochmolekularen Oligomer (HMW) in einer Subkohorte von MeSyBePo. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient r nach Pearson; $n=59$.

Auch das absolute MMW-Adiponectin korrelierte mit HDL-Cholesterol ($r=0,340$, $p=0,008$), jedoch nicht das entsprechende prozentuale Oligomer. Zwischen der LMW-Spezies und dem Fettstoffwechsel gab es in dieser Subkohorte keinerlei Verbindungen.

Die Korrelationsanalysen wurden nochmals in Abhängigkeit vom Geschlecht durchgeführt. Dabei ergab sich für die Männer eine enge Korrelation zwischen Adiponectin und HDL-Cholesterol ($r=0,408$, $p=0,023$), während bei den Frauen eine signifikante Verbindung zu den Triglyzeriden zu verzeichnen war ($r=-0,394$; $p=0,038$).

Stratifizierte man nach NGT/IGT/T2DM, bestätigte sich die enge Verbindung zum Fettstoffwechsel, nicht aber zum Glukosestoffwechsel. Dabei ergab sich bei Personen mit normaler Glukosetoleranz eine enge Verbindung zwischen HDL-Cholesterol und HMW-Adiponectin (%HMW $r=0,562$; $p=0,002$; aHMW $r=0,593$; $p=0,001$), bei den Patienten mit T2DM zwischen HDL-Cholesterol und allen absoluten Oligomeren (HMW $r=0,516$, $p=0,041$; MMW $r=0,500$, $p=0,049$; LMW $r=0,637$; $p=0,008$) sowie Gesamtadiponectin ($r=0,570$; $p=0,021$).

Für weitergehende Analysen unterzogen sich alle Probanden einem oralen Glukosetoleranztest. In dessen Verlauf wurden die Adiponectinspiegel sowie die Oligomerverteilung zu den Zeitpunkten 0 min, nach 120 min sowie nach 180 min gemessen.

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Adiponectinspiegel zum jeweiligen OGTT-Zeitpunkt zwischen den drei untersuchten Gruppen unterscheiden (Tabelle 25).

Tabelle 25. Vergleich der Adiponectin-Oligomere bei Probanden in einer Subkohorte von MeSyBePo in Abhängigkeit vom Status ihres Glukosestoffwechsels im oralen Glukosetoleranztest. NGT=normale Glukosetoleranz, n=28; IGT=gestörte Glukosetoleranz, n=15; T2DM=Typ-2-Diabetes mellitus; n=16; Darstellung der Serumwerte zum Zeitpunkt 0', nach 120 min und nach 180 min.

Parameter	NGT	IGT	T2DM	p-Wert
Gesamtadiponectin 0'	10,49 ± 0,71	9,20 ± 0,89	9,03 ± 1,33	0,452
Gesamtadiponectin 120'	8,71 ± 0,85	11,57 ± 1,47	10,34 ± 1,28	0,189
Gesamtadiponectin 180'	9,14 ± 0,83	11,07 ± 1,47	10,23 ± 1,36	0,476
%HMW 0'	13,53 ± 1,58	11,11 ± 1,27	10,57 ± 1,17	0,483
%HMW 120'	12,86 ± 1,50	11,06 ± 1,29	11,15 ± 1,09	0,805
%HMW 180'	12,75 ± 1,66	11,73 ± 1,49	11,31 ± 1,17	0,969
%MMW 0'	52,32 ± 2,11	39,56 ± 1,45	41,66 ± 1,57	0,004
%MMW 120'	51,51 ± 1,96	37,64 ± 1,54	40,59 ± 1,39	<0,001
%MMW 180'	50,72 ± 2,06	37,49 ± 1,61	41,13 ± 1,68	<0,001
%LMW 0'	34,14 ± 2,97	49,33 ± 1,80	47,76 ± 2,13	0,001
%LMW 120'	35,62 ± 2,89	51,30 ± 1,33	48,26 ± 1,89	<0,001
%LMW 180'	36,53 ± 3,08	50,78 ± 1,87	47,56 ± 2,05	0,006
aHMW 0'	1,40 ± 0,18	1,03 ± 0,17	1,02 ± 0,27	0,133
aHMW 120'	1,16 ± 0,17	1,31 ± 0,24	1,22 ± 0,23	0,769
aHMW 180'	1,18 ± 0,17	1,25 ± 0,21	1,23 ± 0,28	0,857
aMMW 0'	5,29 ± 0,30	3,67 ± 0,39	3,68 ± 0,54	0,004
aMMW 120'	4,38 ± 0,35	4,28 ± 0,55	4,11 ± 0,48	0,905
aMMW 180'	4,54 ± 0,35	4,10 ± 0,56	4,12 ± 0,52	0,719
aLMW 0'	3,87 ± 0,47	4,50 ± 0,42	4,33 ± 0,62	0,653
aLMW 120'	3,39 ± 0,49	5,98 ± 0,78	5,01 ± 0,67	0,011
aLMW 180'	3,74 ± 0,52	5,72 ± 0,80	4,88 ± 0,68	0,089

Wie oben dargestellt, gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gesamtspiegel des Adiponectins zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt 0' des OGTT. Dies änderte sich auch im weiteren Verlauf des OGTTs nicht. Auf der Oligomerebene hatten dagegen Probanden mit gestörter Glukosetoleranz oder einem Typ-2-Diabetes einen geringeren basalen Anteil an %MMW sowie einen höheren Anteil an %LMW als Personen mit normaler Glukosetoleranz, was im Verlauf des OGTTs bestehen blieb. Die prozentualen Anteile an der HMW-Spezies waren jedoch zwischen den Gruppen vergleichbar.

Die Unterschiede in den prozentualen MMW- und LMW-Fraktionen spiegeln sich in den absoluten Werten für die Oligomere nur in geringem Maße wider, signifikante Unterschiede gab es lediglich beim MMW-Oligomer zum Zeitpunkt 0' sowie beim LMW-Oligomer zum Zeitpunkt 120'. Für den absoluten Anteil an HMW-Adiponectin war zum Zeitpunkt 0' des OGTT ein Trend hin zu niedrigeren Spiegeln bei Personen mit IGT oder T2DM im Vergleich zu Personen mit normaler Glukosetoleranz zu verzeichnen (NGT vs. IGT p=0,188; NGT vs. T2DM p=0,064).

Anschließend wurde untersucht, wie sich die Adiponectinspiegel im Verlauf des OGTTs in den einzelnen Gruppen darstellen. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich die Adiponectinspiegel je nach Status des Glukosestoffwechsels der Probanden unterschied-

lich verhielten. Während die Adiponectinspiegel bei Personen mit normaler Glukosetoleranz im OGTT absanken ($10,49 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$ ($0'$) vs. $8,71 \pm 0,85 \mu\text{g/ml}$ ($120'$) [$p=0,009$] und $9,14 \pm 0,83 \mu\text{g/ml}$ ($180'$) [$p=0,033$]), stiegen die Spiegel bei Probanden mit gestörter Glukosetoleranz ($9,20 \pm 0,89 \mu\text{g/ml}$ ($0'$) vs. $11,57 \pm 1,47 \mu\text{g/ml}$ ($120'$) [$p=0,037$] und $11,07 \pm 1,47 \mu\text{g/ml}$ ($180'$)) oder einem Typ-2-Diabetes ($9,03 \pm 1,33 \mu\text{g/ml}$ ($0'$) vs. $10,34 \pm 1,28 \mu\text{g/ml}$ ($120'$) vs. $10,23 \pm 1,36 \mu\text{g/ml}$ ($180'$)) an. Der Verlauf der Adiponectinspiegel im OGTT ist in Abbildung 21 dargestellt.

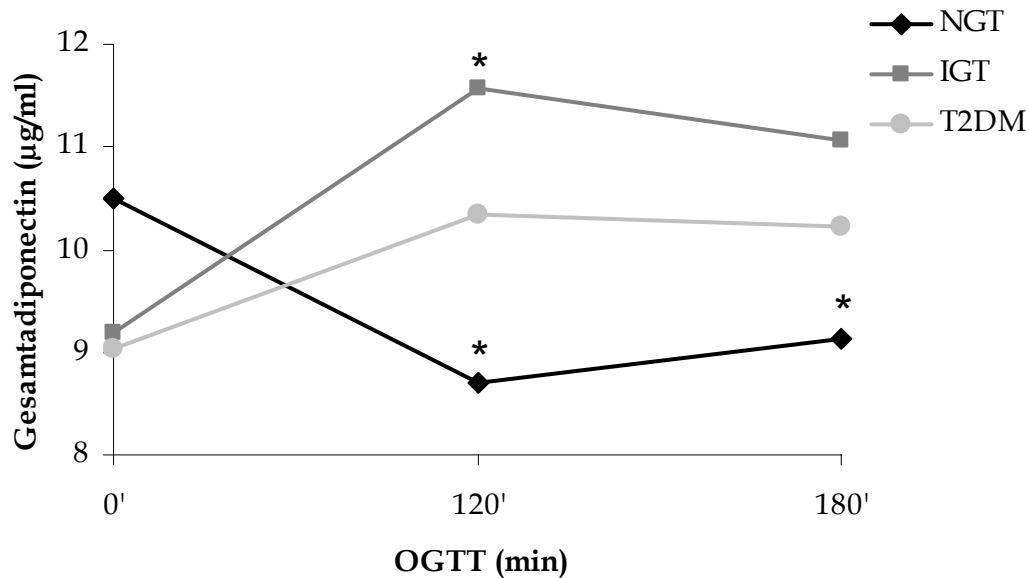


Abbildung 21. Serum-Adiponectinspiegel im Verlauf eines oralen Glukosetoleranztests bei Probanden einer Subkohorte von MeSyBePo in Abhängigkeit vom Status ihres Glukosestoffwechsels. NGT=normale Glukosetoleranz, n=28; IGT=gestörte Glukosetoleranz, n=15; T2DM=Typ-2-Diabetes mellitus, n=16; OGTT=oraler Glukosetoleranztest.

Die Berechnungen wurden durch eine Differenzierung nach dem Geschlecht erweitert. Dabei konnte ermittelt werden, daß der Abfall des zirkulierenden Adiponectins bei Personen mit normaler Glukosetoleranz ausschließlich bei den Männern (n=15) signifikant war ($0'$ vs. $120'$ $p=0,024$; $0'$ vs. $180'$ $p=0,040$).

Als nächstes wurde die Oligomerverteilung im OGTT analysiert. Probanden mit NGT, IGT oder T2DM wurden wiederum getrennt betrachtet. Dabei fiel auf, daß sich die Oligomerverteilung bei Personen mit gestörter Glukosetoleranz und auch bei Patienten mit einem Typ-2-Diabetes im OGTT in keiner Weise änderte. Bei Personen mit normaler Glukosetoleranz ergaben sich dagegen Verschiebungen bei der Oligomerverteilung (Abbildung 22).

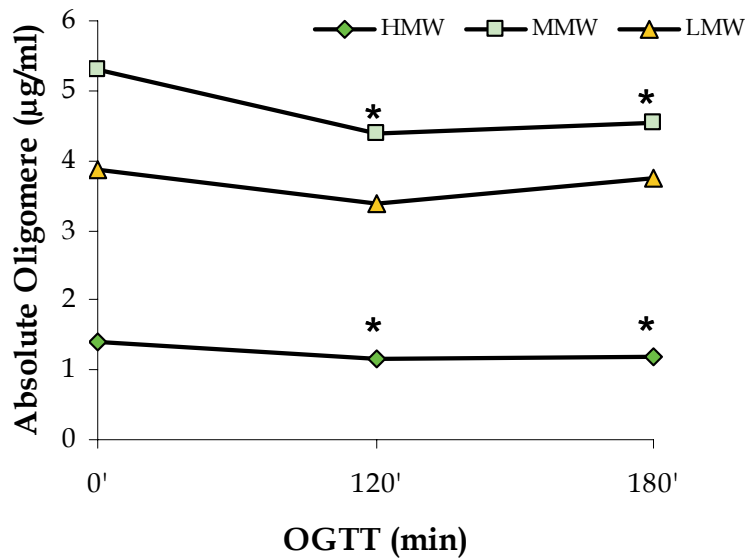


Abbildung 22. Absolute Adiponectin-Oligomere im Verlauf des oralen Glukosetoleranztests bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz in einer Subkohorte von MeSy-BePo. OGTT=oraler Glukosetoleranztest; n=28; *p<0,05.

Dabei zeigte sich sowohl ein Rückgang der HMW-Fraktion ($1,40 \pm 0,18$ vs. $1,16 \pm 0,17$ [$p=0,01$] und $1,18 \pm 0,17$ [$p=0,003$]) als auch der MMW-Fraktion ($5,29 \pm 0,30$ vs. $4,38 \pm 0,35$ [$p=0,004$] und $4,53 \pm 0,35$ [$p=0,02$]), während sich bei der absoluten LMW-Fraktion sowie in der prozentualen Verteilung der Oligomere auch bei Personen mit normaler Glukosetoleranz keine Änderungen ergaben. Differenzierte man erneut nach dem Geschlecht, konnte ein signifikanter Abfall der HMW- und MMW-Fraktionen wiederum nur bei den männlichen Studienteilnehmern detektiert werden.

Anschließend wurden Korrelationsanalysen durchgeführt, um mögliche Zusammenhänge zwischen den Oligomeren und dem Blutzuckerspiegel nach 2 h im OGTT zu ermitteln. Analog dem MeSyBePo-Gesamtkollektiv ergaben sich in der Subkohorte keine Korrelationen zwischen den Gesamtspeiegeln des Adiponectins und dem 2 h-Glukosespiegel. Auf Oligomerebene gab es jedoch negative Assoziationen zwischen der MMW-Spezies und den 2 h-Glukosespiegeln (prozentual: $r=-0,341$; $p=0,008$; absolut: $r=-0,260$; $p=0,047$; $n=59$) sowie eine positive Korrelation zum prozentualen LMW ($r=0,323$; $p=0,013$; $n=59$).

Um Zusammenhänge zwischen dem Glukosestoffwechsel und Adiponectin weiter zu charakterisieren, wurden Regressionsanalysen mit Adiponectin und den einzelnen Oligomeren als abhängigen Variablen durchgeführt. Es wurde zunächst die gesamte Subkohorte betrachtet und dann nochmals für die drei Gruppen NGT, IGT und T2DM getrennt analysiert. Bei Personen mit gestörter Glukosetoleranz konnten keinerlei Parameter gefunden werden, die mit dem Adiponectinspiegel bzw. den Oligomeren unabhängig assoziiert sind. In dieser kleinen Subkohorte wurden die Gesamtadiponectinspiegel vor-

wiegend vom Geschlecht bestimmt. Zur Variabilität der hochmolekularen Oligomere trugen vor allem das HDL-Cholesterol sowie der BMI bei, während sich das Bild für die MMW-Fraktion sehr vielfältig darstellte (Tabelle 26). Mit den LMW-Oligomeren waren vor allem das Geschlecht und das HDL-Cholesterol assoziiert.

Tabelle 26. Regressionsanalysen mit Adiponectin bzw. seinen Oligomeren als abhängiger Variable in einer Subkohorte von MeSyBePo. Rückwärtsanalyse mit den initial eingeschlossenen Kovariaten Geschlecht, Alter, BMI, HOMA_{IR}, HDL-Cholesterol und Triglyzeride. Dargestellt sind unabhängig assoziierte Variablen des jeweiligen Modells sowie das Signifikanzniveau.

Abhängige Variable	Alle (n=59)	NGT (n=28)	T2DM (n=16)
Gesamt-adiponectin	Geschlecht (p=0,028) Triglyzeride (p=0,058)	Geschlecht (p=0,007)	Geschlecht (p=0,022) BMI (p=0,002) HOMA _{IR} (p=0,062) HDL-Chol. (p=0,005)
%HMW	BMI (p=0,083) HDL-Chol. (p=0,031)	HDL-Chol. (p=0,002)	/
%MMW	Geschlecht (p=0,050) Alter (p<0,001)	Geschlecht (p=0,002) Alter (p=0,023) HDL-Chol. (p=0,019) Triglyzeride (p=0,074)	Geschlecht (p=0,044) HDL-Chol. (p=0,038)
%LMW	Geschlecht (p=0,018) Alter (p=0,002) HDL-Chol. (p=0,005)	Geschlecht (p=0,002) Alter (p<0,001) Triglyzeride (p=0,057)	/
aHMW	BMI (p=0,033) HDL-Chol. (p<0,001)	Alter (p=0,020) HDL-Chol. (p<0,001)	BMI (p=0,051) HDL-Chol. (p=0,083)
aMMW	Alter (p=0,080) BMI (p=0,087) HDL-Chol. (p=0,043) Triglyzeride (p=0,093)	/	Geschlecht (p=0,030) BMI (p=0,001) HOMA _{IR} (p=0,022) HDL-Chol. (p=0,015)
aLMW	Geschlecht (p=0,032)	Geschlecht (p=0,001) HDL-Chol. (p=0,005)	HDL-Chol. (p=0,008)

In nachfolgenden Regressionsanalysen sollten unabhängige Einflußfaktoren auf die Insulinresistenz näher beleuchtet werden. Dabei stellte sich heraus, daß lediglich die Triglyzeride unabhängig mit der Insulinresistenz assoziiert waren. Betrachtete man die drei Gruppen jedoch einzeln, bestätigte sich dieses Ergebnis zwar für Personen mit normaler oder gestörter Glukosetoleranz, bei Patienten mit T2DM hatten jedoch der BMI und das Gesamtadiponectin einen unabhängigen Einfluß auf die Variabilität der Insulinresistenz (Tabelle 27).

Tabelle 27. Lineare Regressionsanalyse mit dem Insulinresistenzindex $HOMA_{IR}$ als unabhängigem Parameter in einer Subkohorte von MeSyBePo. Rückwärtsanalyse mit den initial eingeschlossenen Kovariaten Geschlecht, Alter, BMI, HDL-Cholesterol Triglyzeride und Gesamtadiponectin; n=59.

Parameter	Standardisiertes Beta	Korrelation	Standardisiertes Beta x Korrelation x 100 (%)	p-Wert
Alle Probanden				
Triglyzeride	0,446	0,446	19,9	<0,001
R ² des Gesamtmodells			19,9	
NGT				
Triglyzeride	0,448	0,448	20,1	0,017
R ² des Gesamtmodells			20,1	
IGT				
Triglyzeride	0,559	0,559	31,2	0,037
R ² des Gesamtmodells			31,2	
T2DM				
BMI	0,707	0,267	18,9	0,019
Gesamtadiponectin	-0,734	-0,310	22,7	0,016
R ² des Gesamtmodells			41,6	

Ersetzte man nachfolgend die einzelnen Adiponectin-Oligomere für die Kovariate Gesamtadiponectin, ergab sich ein ähnliches Bild. Die Oligomere hatten keinerlei Einfluß auf die Insulinresistenz bei Probanden mit normaler oder gestörter Glukosetoleranz. Bei Patienten mit einem Typ-2-Diabetes konnten die prozentualen Oligomere HMW und LMW ca. 11 % der Variabilität der Insulinresistenz erklären, während bei den absoluten Oligomeren das HMW-Oligomer einen Anteil von 26 % und MMW einen Anteil von 34 % im jeweiligen Modell hatte.

3.4.2.2 Oligomere in der Interventionsstudie Insulin

Um die Auswirkung einer akuten Hyperinsulinämie auf die Oligomerverteilung zu untersuchen, wurde im Rahmen der unter Kapitel 3.3.3 beschriebenen Interventionsstudie auch die Oligomerverteilung unter basalen und Steady-State-Bedingungen untersucht. In die Studie waren 13 Männer und 10 Frauen eingeschlossen; die wichtigsten Probandencharakteristika wurden bereits in Tabelle 13 dargestellt.

Nach Erreichen der Steady-State-Phase im Clamp sanken die Serum-Adiponectinspiegel von $8,74 \pm 1,01 \mu\text{g/ml}$ auf einen Wert von $7,74 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,004$) (Abbildung 23).

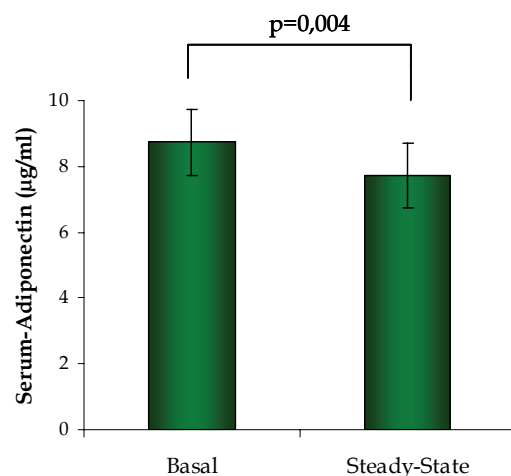


Abbildung 23. Adiponectinspiegel vor dem Clamp im Vergleich zum Steady-State in der Interventionsstudie Insulin. (n=23).

Hinsichtlich der prozentualen Oligomerverteilung ergaben sich durch den Clamp jedoch keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 24 A). Der Anteil an HMW-Adiponectin stieg während des Clamps an ($8,59 \pm 0,68 \%$ vs. $9,51 \pm 0,69 \%$). Das MMW-Adiponectin fiel dagegen leicht ab (von $48,29 \pm 1,83 \%$ auf $47,41 \pm 2,01 \%$), während der Anteil an LMW-Adiponectin nahezu unverändert blieb ($43,12 \pm 2,03 \%$ zu $43,07 \pm 2,40 \%$). Nach Kalkulation der absoluten Werte für die einzelnen Oligomere stellte sich das Bild etwas anders dar (Abbildung 24 B). Danach änderte sich die Menge der HMW-Fraktion nicht ($0,80 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ vs. $0,81 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$), während sich sowohl das MMW-Adiponectin ($4,30 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$ auf $3,78 \pm 0,48 \mu\text{g/ml}$, $p=0,005$) als auch das LMW-Adiponectin ($3,63 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$ auf $3,15 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$, $p=0,048$) signifikant verringerte.

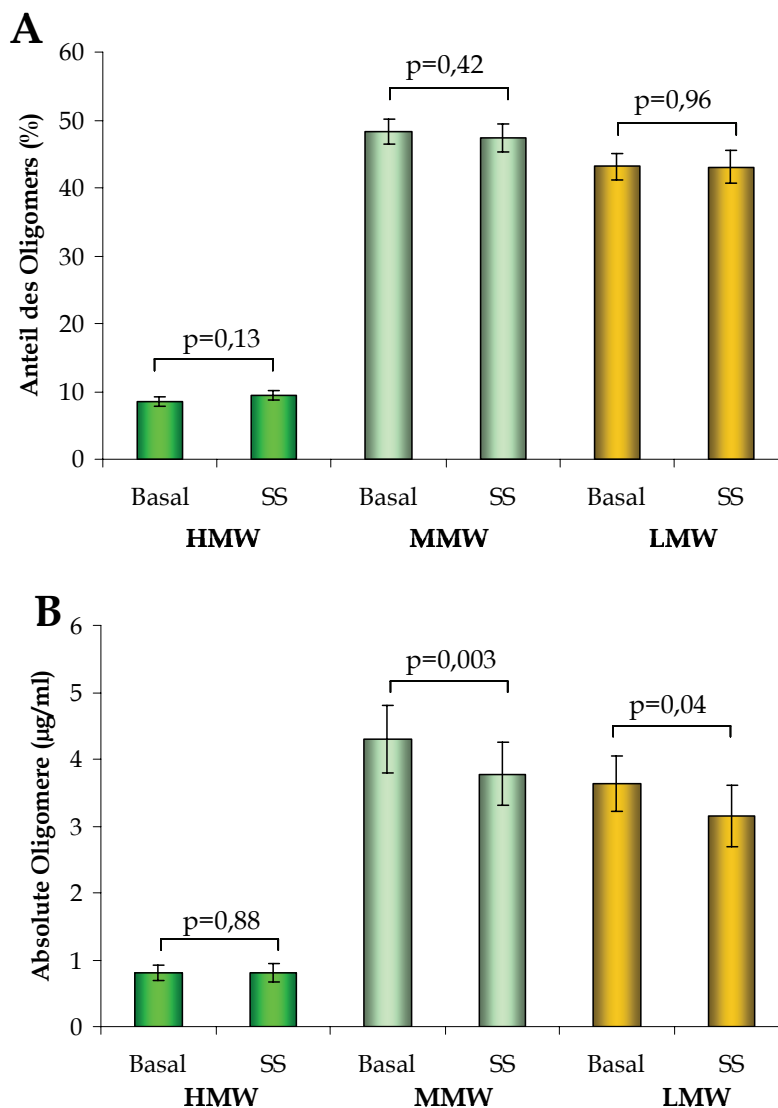


Abbildung 24. Analyse der Adiponectin-Oligomere während eines hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps bei den Teilnehmern der Interventionsstudie Insulin. A) Prozentualer Anteil der Oligomere des Adiponectins vor dem Clamp (basal) sowie im Steady-State (SS); B) Absolute Oligomere des Adiponectins vor dem Clamp (basal) sowie im Steady-State (SS); gemessen im Serum der Probanden; n=23.

Die Adiponectinspiegel korrelierten sowohl vor der Intervention als auch in der Steady-State-Phase des Clamps sehr gut mit dem M-Wert, einem Parameter für die Insulinsensitivität. Auf Ebene der einzelnen Oligomere korrelierten die absoluten Werte ebenfalls gut mit dem M-Wert als Marker für die Insulinsensitivität (Tabelle 28). Ähnliche Zusammenhänge ergaben sich für die freien Fettsäuren (ebenfalls in Tabelle 28 dargestellt) sowie für den BMI, wobei die Korrelationen jeweils negativ waren.

Tabelle 28. Korrelation zwischen der Insulinsensitivität (M-Wert) bzw. den freien Fettsäuren (FFA) und dem Gesamtadiponectin im Serum bzw. seinen Oligomeren in der Interventionsstudie Insulin. Dargestellt ist der Korrelationskoeffizient r nach Pearson sowohl basal als auch im Steady-State des Clamps; $n=23$.

Parameter	M-Wert	FFA
	Basaler Korrelationskoeffizient r	
Serum-Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)	0,587	-0,436
HMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,475	-0,303
MMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,608	-0,433
LMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,529	-0,429
	Korrelation im Steady-State	
Serum-Adiponectin ($\mu\text{g/ml}$)	0,629	-0,444
HMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,380	-0,241
MMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,658	-0,488
LMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,535	-0,360

Für weitere Analysen wurden die Probanden der Studie hinsichtlich der Höhe der Insulinsensitivität in zwei Gruppen unterteilt. Zu der Gruppe mit einer hohen Insulinsensitivität wurden alle Teilnehmer mit einem M-Wert größer 4 gezählt, zu der Gruppe mit niedriger Insulinsensitivität entsprechend die Probanden mit einem M-Wert unter 4. Dieser Wert von 4 entspricht dem aktuellen Trennwert zwischen insulinsensitiven und insulinresistenten Personen, wie er auch in der aktuellen Querschnittsstudie MeSyBePo mit über 1000 Teilnehmern angewandt wird. In die Gruppe mit hoher Insulinsensitivität ließen sich 14 Probanden einteilen; der durchschnittliche M-Wert betrug $5,91 \pm 0,47$. Die Gruppe mit geringer Insulinsensitivität bestand aus 9 Probanden; der durchschnittliche M-Wert betrug hier $2,12 \pm 0,26$.

Die Probanden mit höherer Insulinsensitivität hatten sowohl basal als auch in der Steady-State-Phase des Clamps signifikant höhere Adiponectinspiegel als die Probanden mit geringerer Insulinsensitivität. In beiden Gruppen nahm das Gesamtadiponectin durch die im Clamp erzeugte Hyperinsulinämie signifikant ab (Abbildung 25.)

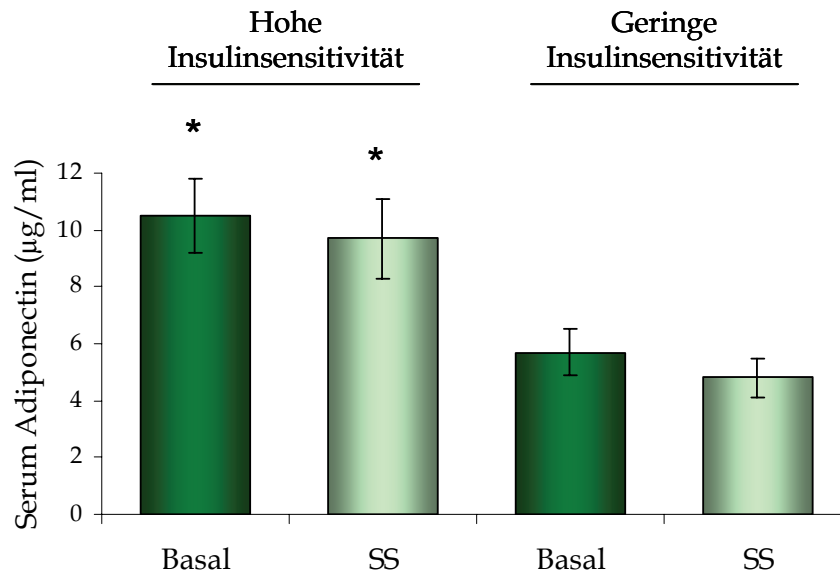


Abbildung 25. Darstellung der Serum-Adiponectinspiegel von Teilnehmern der Interventionsstudie Insulin, stratifiziert nach der Insulinsensitivität. Dargestellt ist das basale Gesamtadiponectin (Basal) im Vergleich mit den Spiegeln unter Steady-State-Bedingungen (SS) im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp, stratifiziert nach Personen mit höherer (n=14) und niedrigerer Insulinsensitivität (n=9); M-Wert Trennlinie 4,0; Signifikanzniveau *p<0,01 im Vergleich zur Gruppe mit geringer Insulinsensitivität.

Anschließend wurde die Oligomerverteilung des Adiponectins in Abhängigkeit von der Insulinsensitivität im Clamp-Test analysiert (Tabelle 29).

Tabelle 29. Vergleich der Serum-Adiponectinspiegel sowie der Oligomerverteilung zwischen Personen mit geringer und mit hoher Insulinsensitivität bei den Teilnehmern der Interventionsstudie Insulin. Trennwert: M-Wert=4; Darstellung der Werte vor dem Clamp sowie im Steady-State.

Parameter	Hohe Insulin-sensitivität (n=14)	Niedrige Insulin-sensitivität (n=9)	p-Wert
Ausgangsparameter vor dem Clamp			
Serum-Adiponectin (µg/ml)	10,5 ± 1,3	5,7 ± 0,8	0,013
HMW (µg/ml)	0,99 ± 0,20	0,47 ± 0,10	0,016
MMW (µg/ml)	5,20 ± 0,65	2,75 ± 0,46	0,013
LMW (µg/ml)	4,33 ± 0,57	2,49 ± 0,29	0,023
HMW (%)	9,2 ± 0,8	7,7 ± 1,2	0,315
MMW (%)	49,0 ± 2,0	47,1 ± 3,5	0,623
LMW (%)	41,8 ± 1,9	45,2 ± 4,4	0,494
Parameter unter Steady-State-Bedingungen			
Serum-Adiponectin (µg/ml)	9,7 ± 1,4	4,8 ± 0,7	0,011
HMW (µg/ml)	1,05 ± 0,20	0,46 ± 0,11	0,040
MMW (µg/ml)	4,68 ± 0,64	2,46 ± 0,46	0,019
LMW (µg/ml)	3,98 ± 0,68	1,95 ± 0,20	0,027
HMW (%)	10,05 ± 1,20	8,67 ± 1,3	0,464
MMW (%)	47,4 ± 2,5	47,5 ± 3,5	0,974
LMW (%)	42,6 ± 2,8	43,8 ± 4,6	0,820

Betrachtete man die prozentualen Anteile der Adiponectin-Oligomere, so unterschieden sich die Werte zwischen den beiden Gruppen nicht. Hinsichtlich der absoluten Oligomere hatten Probanden mit höherer Insulinsensitivität jeweils höhere Spiegel als Probanden mit geringerer Insulinsensitivität, was durch die Kalkulation aus den prozentualen Anteilen und den Gesamtadiponectinspiegeln zu erklären ist. Dabei setzte sich der Trend geringerer Adiponectinspiegel in der Steady-State-Phase im Vergleich zum basalen Niveau auch bei den absoluten Oligomeren in beiden Gruppen fort.

4 Diskussion

Adiponectin ist ein im Fettgewebe exprimiertes Protein, welches in Zusammenhang mit Komplikationen innerhalb des Metabolischen Syndroms steht. Eine enge Verbindung zwischen Adiponectin und dem Übergewicht sowie der Insulinsensitivität wurde bereits in verschiedenen Studien aufgezeigt, einschließlich bei Untersuchungen von Patientinnen mit einem Polyzystischen Ovarsyndrom. Weiterhin wird vermutet, daß die Oligomerisierung des Proteins von funktioneller Bedeutung sein könnte. Zusätzlich mehren sich die Hinweise, daß die Adiponectinspiegel auf genetischer Ebene moduliert werden (Vasseur et al., 2003).

Mithilfe des Studienkollektivs MeSyBePo und einem Zellkulturmodell wurde in dieser Arbeit ein Beitrag zur Klärung der folgenden drei Fragestellungen geleistet:

Leisten Promotorpolymorphismen einen Beitrag zu erniedrigten Adiponectinspiegeln bei Erkrankungen innerhalb des Metabolischen Syndroms?

Welche Zusammenhänge bestehen zwischen Adiponectin und dem Übergewicht oder einem Typ-2-Diabetes mellitus?

Welche Hinweise lassen sich in der MeSyBePo-Kohorte für Unterschiede in der Funktionalität der einzelnen Oligomere des Adiponectins finden?

4.1 Genetische Faktoren

Promotorpolymorphismus -11377

Die Allelfrequenzen für den Polymorphismus -11377 innerhalb der MeSyBePo-Kohorte waren mit denen anderer Studienkollektive vergleichbar (Bouatia-Naji et al., 2006; Gibson und Froguel, 2004; Gu et al., 2004; Schwarz et al., 2006). In der hier untersuchten Studienpopulation MeSyBePo hatte der Polymorphismus -11377 einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der Adiponectinspiegel, der auch nach Korrektur für das Alter, den BMI und das Geschlecht erhalten blieb. Träger eines G-Allels hatten signifikant niedrigere Adiponectinspiegel als Träger der homozygoten Variante C. Damit stimmt diese Studie mit anderen Studien mit Ausnahme der Arbeit von Fumeron und Mitarbeitern (Fumeron et al., 2004) überein, bei denen ebenfalls bei Personen mit dem G-Allel an Stelle -11377 niedrigere Adiponectinspiegel detektiert werden konnten (Buzzetti et al., 2006; Petrone et al., 2006; Qi et al., 2006; Schwarz et al., 2006; Tankó et al., 2005; Vasseur et al., 2002). Dieser Zusammenhang scheint dabei tatsächlich unabhängig vom BMI und anderen Kovariaten wie Alter und Geschlecht zu sein, da dies auch in den oben genannten Studien durchgängig bestätigt wurde. Trotz variierender Größe der Studienkollektive (zwischen 99 und 922 Probanden), verschiedenen metabolischen Gegebenheiten sowie unterschiedlichen Ethnien konnte bisher sehr einheitlich ein relevanter Einfluß des Promotorpolymorphismus -11377 auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel gezeigt werden. Zusätzlich lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, daß der Polymorphismus einer

rezessiven Ausprägung unterliegt, da der heterozygote Genotyp keinen signifikanten Einfluß auf die Höhe der Adiponectinspiegel ausübte.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Polymorphismus -11377 mit niedrigen Adiponectinspiegeln assoziiert ist, bleibt weiterhin unklar, welche physiologischen Mechanismen eine Adiponectindefizienz und assoziierte metabolische Krankheiten verknüpfen. Zirkulierende Adiponectinspiegel sind negativ mit dem Körpergewicht assoziiert (Arita et al., 1999). Die vorliegende Arbeit lieferte jedoch keinen Hinweis darauf, daß sich der BMI in Abhängigkeit von der genetischen Variante des Polymorphismus -11377 innerhalb der MeSyBePo-Kohorte unterscheidet.

Hinweise auf eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Körpergewicht gab eine französische Studie, bei der das C-Allel mit einem erhöhten Risiko für ernste Formen der Adipositas verbunden war (Bouatia-Naji et al., 2006). In der genannten Arbeit wurden normalgewichtige Probanden mit solchen verglichen, die einen BMI > 40 hatten, jedoch insulinresistent waren. Dieses Ergebnis ist überraschend, da Personen mit einem C-Allel höhere Adiponectinspiegel aufweisen als jene mit der Variante G, und das Übergewicht eher mit einer Hypoadiponectinämie assoziiert ist. Ein anderer Zusammenhang wurde zwischen dem Promotorpolymorphismus -11377 und dem Verhältnis von zentraler zu peripherer Fettmasse bei gesunden postmenopausalen Frauen beschrieben, die ein weites Spektrum an BMI-Werten aufwiesen (Tankó et al., 2005). In dieser dänischen Studie war das G-Allel mit einem erhöhten Quotienten der Fettmassen verknüpft, was einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus -11377 und der Körperfettverteilung aufzeigt. In anderen Studien konnten wiederum keinerlei Assoziationen festgestellt werden, so z.B. in der Nurses' Health Study und in der französischen DESIR-Kohorte (Fumeron et al., 2004; Qi et al., 2006). Die Datenlage hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen Übergewicht und dem SNP -11377 bleibt also uneinheitlich. Neben der auffälligen metabolischen Heterogenität der jeweiligen Kohorten waren die bisher untersuchten Studienkollektive inklusive der MeSyBePo-Kohorte allerdings wohl zu klein, um eine eindeutige Aussage zu Gunsten oder zu Ungunsten einer solchen Assoziation machen zu können. Weiterhin wurden je nach Studie unterschiedliche Parameter für das Übergewicht wie der BMI oder Maße für die Körperfettverteilung untersucht, was zu der uneinheitlichen Datenlage beitragen dürfte.

Neben einem hohen BMI ist auch das Vorliegen eines Typ-2-Diabetes mit niedrigen zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert (Hotta et al., 2000). Betrachtet man mögliche Wechselwirkungen zwischen der Genetik des Adiponectins und dem Glukosestoffwechsel, so konnte in der vorliegenden MeSyBePo-Studie kein Zusammenhang zwischen der Genotypverteilung für den SNP -11377 und dem Status des Glukosestoffwechsels detektiert werden. Auch in einer weiteren deutschen Arbeit war der Polymorphismus nicht mit dem Vorliegen eines Typ-2-Diabetes assoziiert (Schwarz et al., 2006). Abweichend davon wurde sowohl in einer französischen als auch in einer schwedischen Kohor-

te ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem G-Allel und dem Vorliegen eines Typ-2-Diabetes mellitus festgestellt (Gu et al., 2004; Vasseur et al., 2002). Daß die genetischen Bedingungen stark von der jeweiligen untersuchten ethnischen Gruppe abhängen können, lassen die existierenden Daten über diesen Promotorpolymorphismus vermuten. In einer Studie mit 359 diabetischen und 183 normoglykämischen Japanern wurde eine Assoziation zwischen dem C/C-Genotyp an Stelle -11377 und einem Typ-2-Diabetes aufgedeckt (Populaire et al., 2003). Im Gegensatz zu den sogenannten Kaukasiern scheint bei Japanern das Wildtyp-Allel C das Risikoallel darzustellen. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, daß der Polymorphismus keinen direkten Effekt auf die Genexpression ausübt, sondern in einem Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) mit anderen funktionellen Risikopolymorphismen steht (Yang und Chuang, 2006).

Wurden Parameter des Glukosestoffwechsels in Abhängigkeit vom Genotyp betrachtet, ergaben sich analog der MeSyBePo-Studie in mehreren Arbeiten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. So konnte bei der schon erwähnten Studie mit französischen Kaukasiern kein Zusammenhang zwischen dem SNP und der Insulinsensitivität gefunden werden (Vasseur et al., 2002), was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützt. Einzig eine italienische Studie konnte zeigen, daß übergewichtige Kinder mit der heterozygoten oder homozygoten Variante G eine höhere Insulinresistenz aufwiesen (Petrone et al., 2006). Allerdings waren nach Korrektur für die Adiponectinspiegel keinerlei signifikante Zusammenhänge zwischen dem SNP und einer Insulinresistenz vorhanden. Dies verwundert jedoch nicht, da niedrige Adiponectinspiegel *per se* häufig mit einer erhöhten Insulinresistenz verbunden sind. Eine normalgewichtige Kontrollgruppe wurde in dieser Studie nicht zum Vergleich herangezogen. In einer weiteren italienischen Kohorte konnte gezeigt werden, daß die Wildtyp-Variante C mit einer erhöhten Insulinsensitivität verbunden war, wenn die Clamptechnik zur Evaluierung der Insulinsensitivität verwendet wurde. Diese Studie schloß 99 übergewichtige Probanden ein. Dagegen zeigte sich in der gleichen Kohorte bei Betrachtung des HOMA-Indexes für die Insulinresistenz kein Unterschied hinsichtlich der Insulinsensitivität in Abhängigkeit von der genetischen Variante des Polymorphismus -11377 (Buzzetti et al., 2006). In einer Subkohorte von 331 Pima-Indianern wurde die Insulinsensitivität ebenfalls mit hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps bestimmt. Hier konnten die Ergebnisse der italienischen Studie jedoch nicht bestätigt werden (Vozarova de Courten et al., 2005).

Die Datenlage für einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus -11377 und dem Glukosestoffwechsel stellt sich somit sehr uneinheitlich dar. Die Gründe hierfür sind sehr vielfältig. Vor allem die untersuchten Parameter für die Insulinsensitivität variieren von Studie zu Studie stark. So wird häufig analog der vorliegenden Arbeit der HOMA-Index für die Insulinresistenz betrachtet (Schwarz et al., 2006; Vasseur et al., 2002). In wenigen Studien wurde die direkte Messung der peripheren, also vorwiegend muskulären Insulinsensitivität innerhalb eines Clamps durchgeführt (Buzzetti et al., 2006; Vozarova de Courten et al., 2005). Andere Arbeitsgruppen verwendeten Parameter aus den OGTT-

Daten wie den Insulinsensitivitätsindex (ISI) (Vozarova de Courten et al., 2005), auf dessen Grundlage es jedoch nicht möglich ist, eine Differenzierung zwischen hepatischer und peripherer Insulinsensitivität vorzunehmen. Die Insulinresistenz ist ein Phänotyp, dem verschiedene Ätiologien zugrunde liegen können. Unterschiedliche metabolische und genetische Faktoren können zu einer Glukoseintoleranz bei Patienten mit einem Typ-2-Diabetes beitragen. So gibt es sowohl Personen, die vorwiegend eine Störung der hepatischen Insulinsensitivität aufweisen, als auch solche, bei denen hauptsächlich ein Defekt in der peripheren Insulinsensitivität besteht (Matsuda und DeFronzo, 1999). Somit haben sowohl die Auswahl der Probanden hinsichtlich des Körpergewichts oder des Status ihres Glukosestoffwechsels, als auch die verwendeten Indizes zur Bestimmung der Insulinsensitivität einen großen Einfluß auf die Ergebnisse einer Studie. Ebenso ist es kaum möglich, die unterschiedlichen Umweltbedingungen in den Studien adäquat zu berücksichtigen. Hinzu kommt, daß die Studienkollektive meist zu klein sind, um ein aussagekräftiges Resultat zu erlangen. Zusätzlich sind Techniken wie der Clamp zu aufwendig und teuer, um sie in großen Studienkollektiven anzuwenden. Auch in dieser Arbeit kann daher keine abschließende Aussage über das Verhältnis zwischen dem Promotorpolymorphismus -11377 und der Insulinresistenz getroffen werden.

Promotorpolymorphismus -11391

Die Allelverteilung innerhalb der MeSyBePo-Kohorte war vergleichbar mit den Daten, die in anderen kaukasischen Kollektiven erhoben worden sind (Gibson und Froguel, 2004; Gu et al., 2004; Vasseur et al., 2002). Dagegen differierte die Allelverteilung hinsichtlich des SNPs -11391 signifikant zwischen amerikanischen Kaukasiern und Amerikanern afrikanischen Ursprungs, wobei das A-Allel bei letzteren seltener vorkam (0,08 vs. 0,01) (Woo et al., 2006).

Auch der Promotorpolymorphismus an Stelle -11391 hatte in der MeSyBePo-Kohorte einen signifikanten Einfluß auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel, welcher nach Korrektur für das Alter, das Geschlecht und den BMI erhalten blieb. Träger des selteneren A-Allels wiesen signifikant höhere Adiponectinspiegel auf als Personen mit dem homozygoten Genotyp GG. Diese modulatorische Wirkung wurde ebenfalls in anderen Studien dokumentiert (Bouatia-Naji et al., 2006; Buzzetti et al., 2006; Fumeron et al., 2004; Heid et al., 2006; Schwarz et al., 2006; Tankó et al., 2005; Vasseur et al., 2002; Woo et al., 2006) und deckt sich somit gut mit den hier erhobenen Daten. Weiterhin kann aufgrund der hier erhobenen Daten vermutet werden, daß sich der Polymorphismus dominant auswirkt, da der modulatorische Effekt auf das Adiponectin bereits bei der heterozygoten Variante zu beobachten war.

Analog dem SNP -11377 wurde geprüft, ob der Promotorpolymorphismus -11391 im Adiponectingen in Zusammenhang mit dem Übergewicht oder dem Glukosestoffwechsel steht. Innerhalb der hier untersuchten MeSyBePo-Kohorte konnten keinerlei Zusammenhänge zwischen diesem Polymorphismus und dem Übergewicht festgestellt werden.

Auch in der Literatur wurde in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit eine solche Assoziation nicht gefunden (Bouatia-Naji et al., 2006; Buzzetti et al., 2006; Fumeron et al., 2004; Petrone et al., 2006; Tankó et al., 2005; Vasseur et al., 2005).

In Bezug auf den Glukosestoffwechsel war die Genotypenverteilung des Promotorpolymorphismus -11391 in der MeSyBePo-Kohorte zwischen Personen mit einem normalen und einem gestörten Glukosestoffwechsel vergleichbar. Ähnliche Resultate wurden in einem französischen Studienkollektiv (Vasseur et al., 2005) sowie in einem weiteren deutschen Kollektiv (Schwarz et al., 2006) erzielt. Hier stellte sich die Verteilung der Genotypen ebenfalls unabhängig vom Vorliegen eines Typ-2-Diabetes mellitus dar (Vasseur et al., 2002; Vasseur et al., 2005).

Die Untersuchungen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der genetischen Variante des SNPs -11391 und metabolischen Parametern, vor allem mit Indizes des Glukosestoffwechsels, ergaben keinerlei signifikante Verknüpfungen innerhalb der MeSyBePo-Kohorte. Analog den hier vorliegenden Daten wurden in einer weiteren Studie ebenfalls keine Zusammenhänge dieses Polymorphismus mit Parametern des Metabolischen Syndroms ermittelt (Heid et al., 2006).

Im Gegensatz zu den vorher genannten Untersuchungen konnte in einer prospektiven Studie mit normoglykämischen Franzosen gezeigt werden, daß sich das Risiko einer Hyperglykämie nach drei Jahren bei Personen mit der heterozygoten Variante GA an Stelle -11391 erhöht (Fumeron et al., 2004). Die homozygote Variante AA war jedoch nicht mit einer Hyperglykämie assoziiert, möglicherweise bedingt durch dessen Seltenheit. Das Risikoallel A stand hierbei im Widerspruch zu den erhöhten Adiponectinspiegeln bei Vorliegen dieses Allels. Gleichzeitig hatten aber auch die Adiponectinspiegel unabhängig vom Genotyp einen prediktiven Effekt auf das Risiko für eine Hyperglykämie. Im Gegensatz zu der Höhe der Adiponectinspiegel scheint der genetische Effekt hinsichtlich des Risikos für eine Hyperglykämie aber unabhängig vom Geschlecht zu sein (Fumeron et al., 2004). Neben dem Effekt auf die Adiponectinspiegel wird daher die Involvierung weiterer Mechanismen vermutet, so zum Beispiel die Multimerisierung des Proteins. Obwohl die beiden Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 vermutlich keinen Einfluß auf die Proteinstruktur des Adiponectins haben (Fumeron et al., 2004), könnten sie mit einem seltenen SNP im Kopplungsungleichgewicht stehen, der einen solchen Einfluß hat (Fumeron et al., 2004; Waki et al., 2003). Weitere Hinweise auf eine Assoziation zwischen dem SNP -11391 und dem Glukosestoffwechsel lieferte eine italienische Studie, bei der übergewichtige Kinder mit der homozygoten Variante G erhöhte Werte für eine Insulinresistenz aufwiesen. Dieser Zusammenhang verschwand nach Korrektur für die Adiponectinspiegel (Petrone et al., 2006), was wiederum für einen Wirkungsmechanismus spricht, der durch die Höhe der Adiponectinspiegel an sich vermittelt wird. In einer anderen italienischen Studie war die homozygote Variante G bei übergewichtigen Erwachsenen mit einer verringerten Insulinsensitivität im Clamp assoziiert, während sich der HOMA-Index im gleichen Kollektiv jedoch nicht in Abhängigkeit vom SNP unter-

schied (Buzzetti et al., 2006). Grundsätzlich lassen sich die widersprüchlichen Ergebnisse auch bei diesem Polymorphismus durch heterogene Studienkollektive und die Verwendung von unterschiedlichen Insulinsensitivitätsindizes erklären. Auch der Einfluß von unzureichend erfaßten Umweltfaktoren kann eine bedeutende Rolle spielen. Bedingt durch die Seltenheit der homozygoten Variante A des Polymorphismus -11391 und den relativ geringen Umfang sowohl der eigenen als auch der hier zitierten Studien kann keine valide Aussage über das Verhältnis zwischen dem Polymorphismus und dem Übergewicht beziehungsweise der Insulinresistenz getroffen werden.

In einigen Studien wurden neben der Einzelbetrachtung der Polymorphismen auch Haplotypenanalysen der beiden Promotorpolymorphismen ADIPOQ -11377 (C/G) und ADIPOQ -11391 (G/A) durchgeführt. Dabei hatten Personen mit einem G_G-Haplotyp die niedrigsten Adiponectinspiegel, während sie beim Haplotyp C_A am höchsten ausfielen (Schwarz et al., 2006; Vasseur et al., 2005). Da der Zusammenhang zwischen den adjustierten Adiponectinspiegeln und den jeweiligen Haplotypen stärker war als mit den Polymorphismen allein, wird ein additiver Effekt beider Polymorphismen angenommen (Vasseur et al., 2005). Weiterhin konnte mithilfe des HOMA-Modells eine Assoziation zwischen dem G_G-Haplotyp und einer geringeren Insulinsensitivität bei 270 normoglykämischen Probanden ermittelt werden (Vasseur et al., 2005). Zusätzlich wurde bei stark übergewichtigen Probanden ein Zusammenhang zwischen dem Haplotyp aus -11377 und -11391 und einem genetischen Risiko für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes gefunden (Vasseur et al., 2005). Innerhalb der DESIR-Kohorte hatte der Haplotyp bei Probanden mit einem weiten BMI-Spektrum allerdings keinen Einfluß auf das Risiko einer Hyperglykämie (Fumeron et al., 2004). Somit finden sich zumindest Hinweise darauf, daß die beiden Polymorphismen die zirkulierenden Adiponectinspiegel sowie als Folge dessen die Insulinsensitivität modulieren könnten. Einschränkend muß man jedoch feststellen, daß die Haplotypenanalysen in sehr kleinen Studienpopulationen gemacht wurden und deren Ergebnisse daher vorsichtig zu interpretieren sind. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls relativ kleinen Kohorte und der damit verbundenen geringen Fallzahl für die seltene homozygote Variante A des Polymorphismus -11391 wurde auf eine Analyse der Haplotypen bewußt verzichtet. Die Ergebnisse werden jedoch derzeit in Metaanalysen eingebracht, bei denen bedingt durch deren Größe fundierte Aussagen hierzu gemacht werden können.

Zusammenfassend wurde bei der Analyse der MeSyBePo-Kohorte deutlich, daß sowohl der Promotorpolymorphismus -11377 als auch der SNP -11391 die zirkulierenden Adiponectinspiegel beeinflussen. Dabei bewirkt das G-Allel an Stelle -11377 eine Absenkung der Adiponectinspiegel, während bei Vorliegen des Allels A an Stelle -11391 ein Anstieg des Adiponectins zu beobachten war. Zusammenhänge zwischen den Polymorphismen und anthropometrischen oder metabolischen Parametern konnten im MeSyBePo-Studien-

kollektiv nicht ermittelt werden. Die vorliegende Studie unterliegt einigen wichtigen Einschränkungen: Es wurden ausschließlich zwei Promotorpolymorphismen betrachtet, wobei in der Literatur weitere funktionelle Genvarianten wie der Polymorphismus +276 innerhalb des Gens beschrieben sind (Gu et al., 2004; Vasseur et al., 2002). Trotz der schon erheblichen Größe der Kohorte im Vergleich zu publizierten Daten liegt eine weitere Limitierung der Studie in der Kohortengröße mit der daraus resultierenden geringen Aussagekraft, um die vermuteten kleinen Effekte auf die untersuchten Phänotypen wie Glukosemetabolismus oder Anthropometrie zu erfassen. Tatsächlich dürfte der Einfluß der Genvariationen des Adiponectins auf Phänotypen des Metabolischen Syndroms nur ein geringes Ausmaß haben. So stellten Heid und Kollegen fest, daß die Polymorphismen zu ca. 8 % die Variabilität der Adiponectinspiegel bestimmen, während die Adiponectinspiegel selbst zu höchstens 10 % die Variabilität von Parametern des Metabolischen Syndroms mitbestimmen. Daraus resultiert ein maximaler Anteil von 1 %, den Polymorphismen zu Charakteristika des Metabolischen Syndroms in direkter Weise beitragen könnten (Heid et al., 2006). Daher sind weitere und vor allem umfangreichere Arbeiten zur Klärung der Rolle von genetischen Varianten des Adiponectins bei der Entstehung eines Metabolischen Syndroms notwendig.

Promotoraktivität in vitro

Vor dem Hintergrund der *in vivo* erhobenen Daten der MeSyBePo-Kohorte wurden in dieser Arbeit *in vitro* Untersuchungen zur Promotoraktivität des Adiponectins in zwei Zelllinien durchgeführt, zum einen in HEK-Zellen, zum anderen in undifferenzierten 3T3-L1-Fibroblasten. Für die folgenden Analysen wurde ein 2,1 kb großes Promotorstück des Adiponectins in den entsprechenden Vektor inkloniert und die Zellen mit diesen Konstrukten transient transfiziert. Im Vergleich zum promotorlosen Kontrollvektor war die Transkriptionsaktivität der klonierten Konstrukte signifikant erhöht. Damit erwiesen sich sowohl beide Zellsysteme als auch die Auswahl des Promotorabschnitts für eine Untersuchung des Einflusses von Promotorpolymorphismen auf die Promotoraktivität als geeignet. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, daß ein zirka 2 kb großes Promotorstück eine erhöhte Transkriptionsaktivität im Vergleich zum Kontrollkonstrukt bedingt (Das et al., 2001; Kita et al., 2005). In einer Arbeit von Phillip Scherer und Mitarbeitern wiesen Konstrukte, die Promotorsequenzen mit einer Größe von knapp 4 kb oder 1 kb enthielten, ebenfalls eine deutliche Promotoraktivität auf (Das et al., 2001). Die japanische Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, daß die Promotorregion von -676 bis +41 für eine transkriptionelle Aktivität ausreichte, wobei der Abschnitt -676 bis -416 essentiell für die Promotoraktivität war (Kita et al., 2005).

Generell war in der hier vorgestellten Studie die Promotoraktivität des Adiponectins in 3T3-L1-Fibroblasten höher als in HEK-Zellen. In der bereits genannten Arbeit der Arbeitsgruppe von Phillip Scherer variierte die Promotoraktivität ebenfalls in den verschiedenen Zellsystemen, und zusätzlich war sie abhängig von der jeweiligen Größe des Promotor-

abschnitts. So zeigte sich eine wesentlich höhere Aktivität des 1,13 kb-Fragments in 3T3-Fibroblasten als in HEK-Zellen, während es für die größeren Fragmente von 2 kb und 3,88 kb genau umgekehrt war (Das et al., 2001). Eine unterschiedliche transkriptionelle Aktivität in verschiedenen Zelllinien ist offensichtlich zu erwarten, da sich die Zellsysteme im Hinblick auf ihre molekularen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden. So enthält jedes spezifische Zellsystem ein unterschiedliches Spektrum an Transkriptionsfaktoren, die in Abhängigkeit der Beschaffenheit des Promotorkonstrukts an die jeweilige Erkennungssequenz binden können und somit die Transkriptionsaktivität beeinflussen. Zusätzlich können verschiedene Transkriptionsfaktoren identische Bindungsstellen haben, wie das AP-2 β (activating enhancer-binding protein 2 β) und das NF-YA (nuclear transcription factor Y) im Adiponectingen (Ikeda et al., 2006), wodurch sie in Wechselwirkung treten könnten. Dabei ist sowohl eine Komplexbildung als auch ein kompetitiver Mechanismus denkbar. Es wurden bereits einige Transkriptionsfaktoren benannt, die mit dem Adiponectingen interagieren. So kann der humane Adiponectinpromotor durch das „stimulatory protein 1“ (Sp1) (Barth et al., 2002), AP-2 β (Ikeda et al., 2006) oder das „CCAAT/enhancer binding protein“ (C/EBP- β) (Kita et al., 2005) reguliert werden. Bei Untersuchungen im Mausmodell konnte eine Isoform der sogenannten „Sterol regulatory element binding proteins“ (SREBP-1c) die Promotoraktivität ebenfalls modifizieren (Seo et al., 2004). Dazu wurden im Adiponectinpromotor die entsprechenden Bindungselemente identifiziert, darunter jene für das SREBP und das C/EBP (Kita et al., 2005; Saito et al., 1999), sowie eine AP-2 β -Bindungsstelle (Ikeda et al., 2006).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß das hier klonierte Promotorkonstrukt eine entsprechende Transkriptionsaktivität sowohl in HEK-Zellen als auch in 3T3-L1-Fibroblasten aufwies, wurde untersucht, ob verschiedene genetische Varianten der Promotorpolymorphismen -11377 und -11391 die Promotoraktivität im Luziferase-Assay beeinflussen können. Ein Vergleich der Varianten des Polymorphismus -11377 ergab höhere Promotoraktivitäten bei Vorliegen der homozygoten Variante G in beiden Zellsystemen. Beim Polymorphismus -11391 konnten vergleichbare Promotoraktivitäten gemessen werden. Damit stellt sich die Datenlage *in vitro* etwas anders dar, als es die zirkulierenden Adiponectinspiegel *in vivo* vermuten lassen würden. Auch in anderen Arbeiten gab es Abweichungen zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten. So war beispielsweise die Promotoraktivität der Fettsäuresynthese *in vitro* gering (Moustaid et al., 1993), während sie im *in vivo* Modell mit transgenen Mäusen stark induzierbar war (Soncini et al., 1995). Augenscheinlich kann man von der Intensität der Transkription nicht automatisch auf die Genexpression oder gar auf die Proteinkonzentration schließen. Unter anderem sind auch epigenetische Mechanismen denkbar, die die Transkription beeinflussen könnten und zu Unterschieden zwischen *in vitro* und *in vivo* Daten führen.

In der Literatur gibt es lediglich eine weitere Arbeit, welche eine Untersuchung der Promotoraktivität in Abhängigkeit der beiden hier betrachteten Polymorphismen zum Gegenstand hatte. Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen konnte die Arbeits-

gruppe um Philippe Froguel keine Unterschiede in der Transkriptionsrate in Abhängigkeit des Polymorphismus -11377 zeigen. Das Konstrukt mit der homozygoten Variante A des Polymorphismus -11391 wies dagegen eine deutlich höhere Promotoraktivität auf als der häufigere Genotyp GG (Bouatia-Naji et al., 2006). Die Diskrepanz zu den Daten der Arbeitsgruppe um Froguel könnte durch die Wahl unterschiedlicher Promotorabschnitte zu erklären sein. In der französischen Arbeit wurden Promotorabschnitte mit einer Länge von 1,3 kb verwendet, die somit kürzer waren als die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung verwendete Promotor-DNA. Daher ist es wahrscheinlich, daß das innerhalb dieser Arbeit verwendete Konstrukt zusätzliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthält, was die transkriptionelle Aktivität unterschiedlich beeinflussen könnte. Zum anderen wurde von der Arbeitsgruppe um Philippe Froguel mit COS7-Fibroblasten ein anderes Zellsystem verwendet, was *per se* eine unterschiedliche Verfügbarkeit von Transkriptionsfaktoren bedeutet.

Um die vorhandene Datenlage zu verbessern, gilt es in der Zukunft zu untersuchen, ob mit den hier hergestellten Promotorkonstrukten in differenzierten Adipozyten ähnliche Resultate erzielt werden wie in den undifferenzierten Zellen. Da die Adiponectinexpression erst während der Differenzierung zu Adipozyten ansteigt, konnte analog dazu eine höhere Promotoraktivität in den sich differenzierenden Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten gezeigt werden (Das et al., 2001). Weiterhin sollten andere bekannte Promotorpolymorphismen des Adiponectingens in die Analyse einbezogen werden, da sie im Kopplungsungleichgewicht mit den hier untersuchten Promotorpolymorphismen stehen könnten.

Der *in vitro* Ansatz zur Untersuchung der Promotoraktivität unterliegt gewissen methodischen Beschränkungen. Zum einen bestimmt bereits die Auswahl des Promotorabschnitts und somit die Beschaffenheit des Promotorkonstrukts wesentlich die Transkriptionsaktivität, da durch unvollständige Fragmente im Vergleich zum Promotor *in vivo* wichtige regulatorische Elemente am 5'- oder am 3'-Ende wie Enhancer oder Silencer unberücksichtigt bleiben könnten. Weiterhin darf die fehlende Integration des Konstrukts in das Genom nicht unberücksichtigt bleiben. Trotz der Ausbildung von nukleosomalen Strukturen nach transienter Transfektion von Promotorkonstrukten können andere regulatorische Mechanismen bei Plasmiden zum Tragen kommen, die in komplexen Chromatinstrukturen integriert sind (Smith und Hager, 1997). Somit sollten diese Untersuchungen auch mit stabil transfizierten Zellen wiederholt werden, um mögliche Einflüsse der Chromatinstruktur auf die Promotoraktivität auszuschließen. Zuletzt muß berücksichtigt werden, daß in diesen Studien aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von humanen Adipozytenzelllinien der humane Promotor in murinen Zellen untersucht wurde. Dies kann offensichtlich ebenfalls erhebliche Einflüsse auf das Aktivitätsmuster der Konstrukte haben.

4.2 *Metabolische Faktoren*

Um untersuchen zu können, welche metabolischen Faktoren mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert sind, wurden zunächst die Daten der MeSyBePo-Studie genutzt. Ergänzend dazu wurden *in vitro* Experimente zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität des Adiponectinpromotors in Abhängigkeit von verschiedenen metabolischen Faktoren durchgeführt.

Innerhalb des untersuchten Studienkollektivs hatten Frauen signifikant höhere zirkulierende Adiponectinspiegel im Serum als Männer. Dieser Geschlechtsunterschied wurde auch für andere Bevölkerungsgruppen beschrieben (Arita et al., 1999; Tschritter et al., 2003). Es wird postuliert, daß die Geschlechtshormone dabei eine bedeutende Rolle spielen. So hatten kastrierte Mäuse höhere Adiponectinspiegel als die Kontrollgruppe, wobei eine Testosterongabe wieder zur Reduktion von Adiponectin führte (Nishizawa et al., 2002).

Adipositas

Innerhalb der Gesamtkohorte korrelierten einige Parameter für die Adipositas negativ mit den Adiponectinspiegeln. So konnten bei Personen mit hohen Werten für den BMI oder die Waist-to-Hip-Ratio erniedrigte Adiponectinspiegel gemessen werden. In multivariaten Regressionsanalysen waren jedoch weder der BMI noch die WHR unabhängig mit den Adiponectinspiegeln assoziiert. Die erste klinische Studie, in der bei übergewichtigen Probanden erniedrigte Adiponectinspiegel festgestellt werden konnten, wurde von Yukio Arita und Kollegen publiziert (Arita et al., 1999). Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen, bei denen im Fettgewebe von übergewichtigen Menschen eine erniedrigte Expression der Adiponectin-mRNA im Vergleich zu normalgewichtigen Personen beobachtet wurde (Hu et al., 1996). Auch in verschiedenen Tiermodellen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Hotta et al., 2001; Hu et al., 1996). Allerdings kann man aufgrund der mRNA-Daten nicht auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel schließen. So wurden bei übergewichtigen Ratten nach fett- und kohlenhydratreicher Diät erniedrigte mRNA-Spiegel im epididymalen Fettgewebe gemessen, die zirkulierenden Adiponectinspiegel waren jedoch im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe unter Standarddiät signifikant erhöht (Naderali et al., 2003). Dies weist auf posttranskriptionelle Kontrollmechanismen bezüglich der zirkulierenden Adiponectinspiegel hin und könnte eine Art kompensatorischen Mechanismus darstellen. Dabei könnte eine Regulation der Adiponectinrezeptoren beteiligt zu sein, wie es im Mausmodell gezeigt wurde (Bullen et al., 2007).

Zusätzlich scheint die Art des Fettgewebes eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte ein negativer Zusammenhang zwischen Adiponectin und dem viszeralen Fettgewebe gezeigt werden (Gavrila et al., 2003), wobei die negative Korrelation mit viszeraler Adipositas stärker zu sein scheint als mit der subkutanen Variante (Cnop et al., 2003; Park et al., 2004) oder dem BMI (Côté et al., 2005). Weiterhin wirkt sich eine Gewichtsreduktion positiv auf die Adiponectinspiegel aus. Kikuko Hotta und Kollegen demonstrierten einen Anstieg

der Adiponectinspiegel nach Gewichtsabnahme bei Probanden mit normalem Glukosestoffwechsel und Patienten mit einem Typ-2-Diabetes (Hotta et al., 2000). Auch eine operative Magenverkleinerung führte zu einer Reduktion des BMI und einem fast 50-prozentigen Anstieg des Adiponectinspiegels (Yang et al., 2001). Eine mediterrane Diät bei prämenopausalen Frauen resultierte ebenfalls in einer Gewichtsabnahme, verbunden mit einer Erhöhung der Adiponectinkonzentration im Serum (Esposito et al., 2003). In prospektiven Studien mit Pima-Indianern oder auch japanischen Probanden konnten die zirkulierenden Adiponectinspiegel Änderungen des Körpergewichts jedoch nicht vorher-sagen (Vozarova et al., 2002; Yamamoto et al., 2004).

In der MeSyBePo-Studie konnte analog zu den oben genannten Studien eine Korrelation zwischen den Adiponectinspiegeln und dem BMI oder der Waist-to-Hip-Ratio gezeigt werden. Diese waren jedoch sehr schwach, so daß die anthropometrischen Parameter in Regressionsanalysen Änderungen der zirkulierenden Adiponectinspiegel nicht vorhersagen konnten. Eine nähere Charakterisierung der einzelnen Fettkompartimente der Studienteilnehmer mit erneuter Analyse einer möglichen Assoziation zum Adiponec-tin könnte differenziertere Aussagen zulassen. Neben der Bestimmung der zirkulierenden Adiponectinspiegel könnten Untersuchungen des Fettgewebes auf Transkriptions- sowie Translationsebene zusätzliche Erkenntnisse bringen.

Glukosemetabolismus

Hinsichtlich des Glukosestoffwechsels war Adiponectin negativ mit dem HOMA-Index für die Insulinresistenz assoziiert. In multivariaten Regressionsanalysen hatte der HOMA-Index hinter dem Geschlecht mit knapp 10 % den größten unabhängigen Einfluß auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel. Somit konnte in der hier untersuchten Kohorte ge-zeigt werden, daß das Adiponectin eng mit dem Glukosestoffwechsel in Verbindung steht. Innerhalb der MeSyBePo-Studie unterschieden sich die Adiponectinspiegel zwi-schen Probanden mit normalem Glukosestoffwechsel und denen mit einem Typ-2-Diabetes jedoch nicht.

Der erste Bericht über erniedrigte Adiponectinspiegel bei Patienten mit einem Typ-2-Diabetes kam von Kikuko Hotta und Kollegen (Hotta et al., 2000). Dabei war diese Asso-ziation unabhängig vom BMI und dem Alter der Probanden. Weitere Studien konnten diese Beobachtung stützen (Daimon et al., 2003; Spranger et al., 2003). Eine Untersuchung mit Pima-Indianern ergab eine starke Korrelation zwischen niedrigen Adiponectinspie-geln und einer verminderten Insulinsensitivität, wobei Probanden mit hohen Spiegeln sel-tener einen Typ-2-Diabetes entwickelten (Lindsay et al., 2002). Auch in der deutschen EPIC-Kohorte waren geringe Adiponectinspiegel mit einem erhöhten Risiko für eine Diabeteserkrankung verbunden (Spranger et al., 2003). Dieser Zusammenhang zwischen dem erhöhten Risiko für eine Entwicklung oder Progression des Typ-2-Diabetes und nie-drigen Adiponectinspiegeln konnte mittlerweile in zahlreichen Studien bestätigt werden (Choi et al., 2004; Daimon et al., 2003; Snehalatha et al., 2003; Yamamoto et al., 2004).

Jedoch wurde zusätzlich gezeigt, daß einige Patienten mit schwerer Insulinresistenz paradoxerweise eine Hyperadiponectinämie bei gleichzeitiger Adiponectinresistenz aufwiesen (Semple et al., 2007). Dieser Umstand beruht vermutlich auf einem Defekt der Insulinrezeptoren und konnte im Tiermodell ebenfalls nachgewiesen werden (Lin et al., 2007). Das Fehlen signifikanter Unterschiede in der Höhe der Adiponectinspiegel zwischen Personen mit normalem und gestörtem Glukosestoffwechsel innerhalb der vorliegenden Arbeit könnte durch den begrenzten Umfang der MeSyBePo-Kohorte zu erklären sein. Generell wirkt sich die Heterogenität der Studienkollektive hinsichtlich der ethnischen Herkunft, des Körpergewichts, des Status des Glukosestoffwechsel sowie variierender Umweltfaktoren auf die Ergebnisse einer Studie aus.

Im Genreporterassay wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob erhöhte Glukosespiegel die Promotoraktivität des Adiponectins in HEK-Zellen beeinflussen können. Der Vergleich der Transkriptionsaktivität ergab keinerlei Unterschiede zwischen physiologischen Bedingungen und stark erhöhten Glukosekonzentrationen im Zellmedium. Ähnliche Untersuchungen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen in anderen Zellsystemen durchgeführt. In differenzierten 3T3-L1 Adipozyten wurde beobachtet, daß niedrige Glukosespiegel sowohl zu verminderten intrazellulären Adiponectinspiegeln führen, als auch zu einer Abnahme der Sekretion ins Medium (Huypens et al., 2005). Möglicherweise üben hohe Glukosespiegel zusätzlich durch Modulation der Adiponectinrezeptoren einen Einfluß auf die Funktion des Adipokins aus. So konnte in Muskelzellen von Ratten gezeigt werden, daß durch Hyperglykämie die Expression des Rezeptors AdipoR1 vermindert wurde, während AdipoR2 unverändert blieb (Fang et al., 2005). Dabei entwickelte sich in den Zellen eine Resistenz gegenüber globulärem Adiponectin, während sie gegenüber dem Adiponectin in voller Länge eine erhöhte Sensitivität aufwiesen (Fang et al., 2005). Allerdings bleibt eine Präsenz der globulären Domäne im Serum umstritten (Tilg und Moschen, 2006).

Thiazolidindione stellen eine neue Wirkstoffklasse zur Behandlung des Typ-2-Diabetes dar und haben eine insulinsensitivierende Wirkung. Einige Humanstudien konnten zeigen, daß die Gabe von Thiazolidindionen eine Erhöhung der zirkulierenden Adiponectinspiegel induziert (Gastaldelli et al., 2006; Maeda et al., 2001; Yu et al., 2002). In dem hier untersuchten Zellkulturmodell wurde keine Änderung der Promotoraktivität nach Stimulation mit Rosiglitazon beobachtet. Norikazu Maeda und Kollegen ermittelten dagegen in 3T3-L1-Adipozyten eine erhöhte Promotoraktivität des Adiponectins nach Stimulation mit Rosiglitazon, Troglitazon oder Pioglitazon (Maeda et al., 2001). Die Wirkung der Thiazolidindione beruht vornehmlich auf der Bindung an den Gamma-Subtyp der Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR γ). PPAR γ wird hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle in der Adipogenese sowie beim Glukosestoffwechsel (Spiegelman, 1998). Die unterschiedlichen Ergebnisse im Genreporterassay erklären sich somit aus der Verschiedenheit von Zellsystemen, da in HEK-Zellen

im Gegensatz zu 3T3-L1-Adipozyten keine endogenen Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren nachweisbar sind (Guardiola-Diaz et al., 1999; Li und Lazar, 2002).

In Genexpressionsstudien wurde gezeigt, daß Thiazolidindione eine Stimulation der Adiponectin-mRNA-Synthese in 3T3-L1-Adipozyten bewirken können (Gustafson et al., 2003; Maeda et al., 2001). Bei übergewichtigen Mäusen konnte in der japanischen Arbeit zudem ein Anstieg der Adiponectin-mRNA im weißen Fettgewebe beobachtet werden (Maeda et al., 2001), während eine weitere Studie den gegenteiligen Effekt zeigte, nämlich einen Abfall der mRNA (Moore et al., 2001).

Somit bleibt anzumerken, daß die hier vorgestellten Ergebnisse in adipozytären Zelllinien weiter untersucht werden sollten.

Fettstoffwechsel

Adiponectin war in der vorliegenden Arbeit stets mit Parametern des Fettstoffwechsels assoziiert, wobei sich die positive Korrelation mit dem HDL-Cholesterol am stärksten darstellte. In multivariaten Regressionsanalysen hatte HDL-Cholesterol neben dem Geschlecht und der Insulinresistenz einen unabhängigen Einfluß auf die Variabilität der Adiponectinspiegel. Diese Beobachtung stimmt mit weiteren klinischen Studien überein, bei denen HDL-Cholesterol am stärksten mit Adiponectin assoziiert war, und zwar unabhängig vom Glukosestoffwechsel (Baratta et al., 2004; Heliövaara et al., 2006; Kazumi et al., 2004; Matsubara et al., 2002; Tschritter et al., 2003). Bei heranwachsenden Mädchen konnten die Adiponectinspiegel unabhängig vom BMI Änderungen im Lipidprofil vorhersagen (Okada et al., 2006). Zusätzlich konnte bei Personen mit niedrigen Adiponectinspiegeln eine geringere Aktivität der Lipoproteinlipase gemessen werden (von Eynatten et al., 2004). Die Lipoproteinlipase spaltet die in den Chylomikronen enthaltenen Triglyzeride. Damit wird die Hypothese gestützt, daß Adiponectin den Abbau der zirkulierenden Lipide positiv beeinflusst (Furler et al., 2006). Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß Adiponectin und die Triglyzeride negativ korreliert sind, was in dieser Arbeit dargestellt werden konnte. Im Tiermodell wurde gezeigt, daß Adiponectin die Oxidation der freien Fettsäuren in der Leber fördert, vermutlich durch Aktivierung der AMP-Kinase (Yamauchi et al., 2002). Adiponectin könnte somit die Bildung von Triglyzeriden über die Aktivierung der AMP-Kinase inhibieren (Ahima, 2006; Muoio et al., 1999), was eine mögliche Erklärung für die schon erwähnte enge Assoziation zwischen Adiponectin und den Triglyzeriden darstellt (Furler et al., 2006). In einer neueren Studie waren Adiponectin und VLDL Apolipoprotein B negativ korreliert (Ng et al., 2005). Hohe Plasmaspiegel an VLDL können den Abbau von HDL-Cholesterol und die Bildung von LDL-Cholesterol verstärken. Die Autoren vermuten eine unabhängige Regulation der VLDL apoB-Konzentration im Plasma durch Adiponectin über die Kontrolle der Abbaurates des Lipoproteins. Auch eine geringere LDL-Partikelgröße war mit einer Hypoadiponectinämie assoziiert (Hulthe et al., 2003).

All diese Ergebnisse deuten auf einen unabhängigen Einfluß des Adiponectins auf den Fettstoffwechsel hin, was sowohl im Hinblick auf die Diabetesentstehung, aber vor allem bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen von erheblicher Bedeutung sein dürfte.

Adiponectin spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulierung des Gleichgewichts zwischen Fettgewebe und Entzündung (Tilg und Wolf, 2005). Die *in vitro* Studien zur Promotoraktivität des Adiponectins ergaben im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf eine veränderte Transkriptionsaktivität nach Stimulation durch freie Fettsäuren oder TNF α in HEK-Zellen; die Daten sind aber durch die schon genannten Limitationen in ihrer Aussage eingeschränkt. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen hatte allerdings auf Ebene der Genexpression eine Inkubation von 3T3-L1-Adipozyten mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren keinen Effekt auf die mRNA-Konzentrationen des Adiponectins (Kim et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde ebenfalls in 3T3-L1-Zellen gezeigt, daß die Inkubation mit einer Mischung (1 mmol/l) verschiedener Fettsäuren zu einer Reduktion der Adiponectinsekretion ins Zellkulturmedium führt (Nguyen et al., 2005). Im Nagermodell resultierte eine Infusion von freien Fettsäuren innerhalb eines Clamps in verminderten Adiponectinspiegeln im Vergleich zu den Kontrolltieren (Li et al., 2006). Auch über den Zusammenhang zwischen Adiponectin und dem Zytokin TNF α wurden etliche Arbeiten publiziert. So konnte die Zugabe von TNF α die Genexpression des Adiponectins durch Aktivierung der c-Jun N-terminal Kinase (JNK) im Zellkulturmodell vermindern (Kim et al., 2005). Diese *in vitro* Daten bestätigen auch frühere Studien (Bruun et al., 2003; Fasshauer et al., 2002; Kappes und Loffler, 2000). Weiterhin wurde gezeigt, daß die Promotoraktivität des Adiponectins in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten durch Inkubation mit TNF α abnahm (Maeda et al., 2001). Zusätzlich verringerte eine Inkubation mit TNF α die mRNA-Spiegel des Adiponectins sowie dessen Sekretion ins Zellmedium. *In vivo* Studien konnten zusätzlich negative Korrelationen zwischen Adiponectin und TNF α aufdecken (Lihn et al., 2003). Adiponectin und ein weiteres Zytokin, Interleukin-6 (IL-6), waren ebenfalls negativ korreliert (Bruun et al., 2003; Engeli et al., 2003). Im Zellkulturmodell wurde die Adiponectin-mRNA-Expression durch IL-6 vermindert (Fasshauer et al., 2003). Die hier diskutierten Daten lassen vermuten, daß Adiponectin sowohl durch freie Fettsäuren als auch durch andere Zytokine reguliert werden kann. Das Ausbleiben eines Effekts von freien Fettsäuren oder Zytokinen wie TNF α und IL-6 auf die Promotoraktivität des Adiponectins im hier gewählten HEK-Zellkulturmodell kann vielfältige Gründe haben. Wie schon oben erwähnt, spielt das gewählte Zellsystem eine entscheidende Rolle. Zusätzlich bedingt die Wahl der Promotorsequenz das Vorhandensein bestimmter Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren, was wiederum die Transkriptionsaktivität beeinflussen kann. Möglicherweise fehlen in HEK-Zellen bestimmte Transkriptionsfaktoren, die den Effekt der Fettsäuren

oder bestimmter Zytokine vermitteln. Eine Wiederholung der Experimente in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten in der näheren Zukunft erscheint daher sinnvoll.

Modulation durch Insulin

In einer Interventionsstudie mit 23 nichtdiabetischen Probanden wurde das Verhältnis zwischen Adiponectin und Insulin innerhalb eines hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps näher untersucht. Ein Anstieg der Insulinkonzentration während des Clamps war dabei mit einer signifikanten Verringerung der Adiponectinspiegel um 10 % verbunden. Damit konnten die Ergebnisse unseres initialen Reports mit fünf Männern in einem größeren Kollektiv bestätigt werden (Möhlhig et al., 2002). Diese insulinabhängige Modulation der Adiponectinspiegel wurde inzwischen durch weitere Studien untermauert (Brame et al., 2005; Yu et al., 2002). In der Arbeit von Lori Brame und Mitarbeitern reduzierten sich beispielsweise die Adiponectinspiegel im Rahmen des Clamps im Mittel um 7,8 %, was mit den vorliegenden Ergebnissen gut korrespondiert (Brame et al., 2005). Es wird angenommen, daß die insulinabhängige Sekretionsstörung der Adipozyten für die Abnahme der Adiponectinspiegel verantwortlich ist (Yu et al., 2002). Auch in einem Tiermodell mit Ratten kam es infolge eines hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps zu einem Abfall der zirkulierenden Adiponectinspiegel, was in Einklang mit den humanen Daten steht (Li et al., 2006).

In der vorliegenden Untersuchung konnte zusätzlich dokumentiert werden, daß Probanden mit hoher Insulinsensitivität sowohl basal als auch im Steady-State des Clamps signifikant höhere Adiponectinspiegel aufwiesen als Probanden mit geringer Insulinsensitivität. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von Philip Kern und Kollegen, die bei Personen mit geringer Insulinsensitivität unabhängig vom BMI ebenfalls niedrigere Adiponectinspiegel messen konnten (Kern et al., 2003).

In der Literatur besteht ein breiter Konsens, daß sich Adiponectin positiv auf die Insulinsensitivität auswirkt. Dies konnte im Tiermodell eindrucksvoll gezeigt werden (Kubota et al., 2002; Maeda et al., 2002). Auf der anderen Seite sind mögliche Mechanismen der Regulation des Adiponectins durch Insulin noch nicht geklärt. In Studien von Mathias Fasshauer und Kollegen wurde eine dosis- und zeitabhängige Reduktion der Adiponectin-mRNA nach Inkubation von 3T3-L1-Zellen mit Insulin gemessen (Fasshauer et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurde mehrfach publiziert, daß Insulin die Sekretion von Adiponectin in 3T3-L1-Zellen stimuliert (Bogan und Lodish, 1999; Clarke et al., 2003; Nguyen et al., 2005; Scherer et al., 1995). Dabei verringerte sich das intrazelluläre Adiponectin, während Insulin keinen Einfluß auf die Adiponectin-mRNA-Spiegel hatte (Pereira und Draznin, 2005). Die Autoren vermuten eine Regulation durch die Stimulation der Adiponectinexkretion über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-Weg (Fasshauer et al., 2002; Kamon et al., 2004; Pereira und Draznin, 2005). *Ex vivo* Untersuchungen in humanem Fettgewebe ergaben höhere Adiponectin-mRNA-Mengen nach Stimulation mit Insulin (Halleux et al., 2001). Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz der erhöhten

Adiponectinsekretion im Zellkulturmodell und erniedrigten Adiponectinspiegeln in insulinresistenten Personen ist ein negativer Rückkopplungsmechanismus. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, daß eine Überexpression von Adiponectin einen Abfall der Adiponectin-mRNA sowie eine Reduktion der AdipoR2-Expression nach sich zog, während Adiponectin-defiziente Mäuse eine erhöhte Expression des AdipoR2 aufwiesen (Bauche et al., 2006). Dies steht auch in Einklang mit der Beobachtung, daß die AdipoR2-Expression unter hyperinsulinämischen Bedingungen erhöht war, verbunden mit einer Steigerung der durch Adiponectin induzierten Aufnahme von Glukose und Fettsäuren in die Zellen (Fang et al., 2005).

In der vorliegenden Humanstudie konnte klar gezeigt werden, daß Insulin die Adiponectinspiegel absenkt. Betrachtet man zusätzlich die Studien am Tiermodell, bei denen eine Hypoadiponectinämie zu einer Insulinresistenz führte, kann spekuliert werden, daß diese durch Adiponectinmangel induzierte Insulinresistenz wiederum zu weiter absinkenden Adiponectinspiegeln führt. Dieser Teufelskreis scheint jedoch auf einem bestimmten Niveau durch die bereits erwähnte negative Rückkopplung unterbrochen zu werden. Im Vergleich zu den hier erhobenen *in vivo* Daten hatte das Insulin im *in vitro* Modell keinen modulatorischen Effekt auf die Promotoraktivität des Adiponectins. Es konnte somit in HEK-Zellen nicht gezeigt werden, daß die in der Humanstudie beobachtete Absenkung der Adiponectinspiegel durch Insulin auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, was auf eine translationale beziehungsweise posttranslationale Regulation hindeuten könnte.

Adiponectin und das Polyzystische Ovarsyndrom

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß niedrige Adiponectinspiegel nicht unmittelbar mit dem Vorliegen des PCO-Syndroms assoziiert sind und somit keinen direkten Einfluß auf die Pathogenese der Krankheit haben. Dieses Resultat bestätigt frühere Studien, bei denen hauptsächlich Parameter der Adipositas die Adiponectinspiegel bestimmten und weniger das PCO-Syndrom (Orio et al., 2003; Panidis et al., 2003). Innerhalb dieser Studie korrelierten die Adiponectinspiegel sowohl bei den Frauen mit PCOS als auch bei den gesunden Kontrollen mit dem BMI, der Insulinresistenz und den Testosteronspiegeln, nicht jedoch mit den restlichen Parametern für eine Hyperandrogenämie. In nachfolgenden Korrelationsanalysen wurde der große Einfluß des BMI und des Grades der Insulinresistenz auf die Adiponectinspiegel erneut deutlich, welche die Variabilität des Adiponectins zu 30 % erklären konnten. Parameter der Hyperandrogenämie spielten jedoch nur eine marginale Rolle.

Bei einem überwiegenden Teil der Frauen mit einem PCOS besteht eine Insulinresistenz und damit ein hohes Risiko für die Entwicklung einer gestörten Glukosetoleranz oder eines Typ-2-Diabetes (Carmina und Lobo, 1999). Daher wurde untersucht, welche Faktoren die Insulinsensitivität bei Frauen mit einem PCO-Syndrom beeinflussen und ob Adiponectin dabei eine Rolle spielt. Regressionsanalysen zeigten einen modulierenden Effekt von Parametern des Übergewichts wie BMI und Fettmasse nach DEXA-Messung

sowie auch von Adiponectin auf die Insulinresistenz. Keinen unabhängigen Einfluß auf die Insulinresistenz hatte dagegen das Testosteron, was gegen einen direkten Einfluß des PCOS auf die Insulinresistenz spricht. Damit steht die vorliegende Arbeit in Einklang mit weiteren Studien, bei denen das Vorliegen einer Insulinresistenz bei Frauen mit einem PCO-Syndrom eher durch die Körperfettverteilung erklärt werden konnte, als durch die Krankheit an sich (Lord et al., 2006). Weiterhin konnte eine verminderte Insulinsensitivität ausschließlich bei übergewichtigen PCOS-Patientinnen detektiert werden, während schlanke Patientinnen einen normalen Glukosestoffwechsel aufwiesen (Morin-Papunen et al., 2000).

In der vorliegenden Studie trug das Adiponectin zu 18 % zur Variabilität der Insulinresistenz bei, und zwar unabhängig vom Grad des Übergewichts, welches bis zu 30 % der Insulinresistenz erklären konnte. Dies deckt sich mit Untersuchungen an Probanden ohne PCOS, bei denen niedrige Adiponectinspiegel unabhängig von einer Adipositas mit einer Insulinresistenz assoziiert waren (Tschritter et al., 2003; Weyer et al., 2001). Obwohl das Übergewicht eng mit geringeren Adiponectinspiegeln verbunden ist, scheint Adiponectin auch unabhängig davon die Insulinsensitivität beeinflussen zu können. Somit könnte das Adipokin einer der Faktoren sein, die neben dem Übergewicht einen Einfluß auf die Insulinresistenz bei Frauen mit PCOS haben (Spranger et al., 2004).

Metformin wird für die Behandlung des PCOS eingesetzt und trägt zur Verbesserung der Fruchtbarkeit, aber auch der Insulinsensitivität bei (De Leo et al., 2003; Nestler, 2002). Eine sechsmonatige Behandlung von neun Frauen aus der hier untersuchten PCOS-Kohorte resultierte in einer Gewichtsabnahme, verbunden mit einer Verringerung der Körperfettmasse sowie in erniedrigten Testosteronspiegeln. Diese Wirkungen des Metformins decken sich mit zahlreichen früheren Studien (Harborne et al., 2003). Während sich die Insulinsensitivität leicht verbesserte, blieb das zirkulierende Adiponectin unverändert. Die beschriebene Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen an übergewichtigen Typ-2-Diabetes Patienten (Phillips et al., 2003), an Patienten mit Wachstumshormonmangel (Herrmann et al., 2005) und Beobachtungen am diabetischen übergewichtigen Mausmodell (Fujita et al., 2005), bei denen nach Metformingabe keine Änderungen der Adiponectinspiegel gemessen werden konnten. Eine abschließende Beurteilung kann aus den vorliegenden Daten jedoch nicht hergeleitet werden, da sie in einer unkontrollierten Studie mit nur wenigen Probandinnen erhoben wurden.

Zusammenfassend ließ sich die enge Verbindung zwischen Übergewicht und PCOS durch unsere Untersuchungen bestätigen. Adiponectin war eng mit dem Grad der Insulinresistenz assoziiert, scheint jedoch keinen direkten Einfluß auf das Polyzystische Ovarsyndrom auszuüben.

4.3 *Adiponectin-Oligomere*

Die Bildung von Multimerkomplexen aus Adiponectin-Trimeren wurde schon durch die Arbeitsgruppen von Philipp Scherer und Yasuko Nakano beschrieben. Dabei kamen verschiedene Methoden wie die Größenausschlußchromatographie, die Geschwindigkeits-sedimentation sowie die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Einsatz (Nakano et al., 1996; Scherer et al., 1995). In dieser Arbeit konnten die einzelnen Oligomere des Adiponectins durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen in Anlehnung an die Methode von Hironori Waki und Kollegen bestimmt werden (Waki et al., 2003). In humanen Serumproben gelang die Auftrennung in drei oligomere Formen: Trimer (LMW), Hexamer (MMW) und ein größeres Multimer (HMW). Für das MMW- und das HMW-Adiponectin wurden jeweils zwei eng benachbarte Banden detektiert. Die genaue Größe der HMW-Spezies konnte mit dieser Methode jedoch nicht bestimmt werden; so können sich 4, 5 oder 6 Trimere zusammenlagern. Es wird vermutet, daß die Anzahl der aggregierten Trimere innerhalb des Multimers von der jeweiligen Spezies abhängt. Diesbezüglich wurde in murinen Proben jeweils nur eine Multimerbande detektiert, in humanen Proben waren es jedoch stets zwei Banden (Waki et al., 2003).

Analog dem Gesamtadiponectin weisen unsere Daten auf Geschlechtsunterschiede in der Oligomerverteilung hin. So hatten Frauen einen tendenziell höheren prozentualen Anteil an der hochmolekularen Spezies. Bei Betrachtung der absoluten Spiegel ergaben sich signifikant höhere Anteile der HMW- und MMW-Spezies bei Frauen als bei Männern. Dieser Umstand ist auf die Berechnung der absoluten Spiegel unter Berücksichtigung der Gesamtspiegel zurückzuführen. Die hier gemachte Beobachtung geschlechtsspezifischer Unterschiede stimmt mit anderen Studien überein, in denen Frauen ebenfalls höhere Gesamtspiegel, höhere HMW Spiegel sowie einen höheren Quotienten aus HMW-/Gesamtadiponectin aufwiesen als Männer (Aso et al., 2006; Hara et al., 2006; Nakashima et al., 2006). In einer Arbeit von Aimin Xu und Mitarbeitern wurde gezeigt, daß die Geschlechtsunterschiede der Adiponectinspiegel durch die Unterschiede in der HMW-Form zu erklären sind, da die MMW- und LMW-Spezies zwischen den Geschlechtern vergleichbar waren, Frauen aber stets einen höheren Anteil an HMW-Adiponectin aufwiesen (Xu et al., 2005). Die Ursache für die Geschlechtsunterschiede wird in den variierenden Testosteronspiegeln vermutet. Im Fettgewebe unterscheiden sich die Anteile der einzelnen Oligomere interessanterweise nicht zwischen den Geschlechtern (Pajvani et al., 2004). Diese Beobachtung wurde an Mäusen gemacht. Zusätzlich war der Anteil an HMW-Adiponectin im Fettgewebe mit 70-90 % deutlich höher als im Serum mit 25 % (Pajvani et al., 2004). Beim Menschen konnte dies innerhalb der gleichen Arbeit bestätigt werden. Testosteron konnte zwar die Serumspiegel absenken, die mRNA im Fettgewebe blieb jedoch unverändert, was eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene vermuten läßt (Gui et al., 2004; Nishizawa et al., 2002). Möglicherweise ist das Testosteron in der

Lage, spezifisch die Sekretion des HMW-Adiponectins aus der Fettzelle zu hemmen (Xu et al., 2005). Daher scheint es mindestens zwei unabhängige Sekretionswege zu geben. Vermutet wurden jeweils ein Mechanismus für die konstitutive Sekretion und einer für die regulatorische Sekretion des Adiponectins (Bogan und Lodish, 1999). Eine Erklärung für die höheren HMW-Spiegel im Fettgewebe selbst könnte die Beobachtung sein, daß HMW von den Adipozyten wesentlich langsamer sezerniert wird als die MMW- und LMW-Spezies (Xu et al., 2005). Eine Kontrolle der Sekretion der HMW-Spezies durch die Adipozyten durch transkriptionelle Regulation ist ein möglicher Mechanismus zur Modulation der Verfügbarkeit und damit der Aktivität des HMW-Adiponectins (Xu et al., 2005).

Oligomere und Adipositas

Da Adipositas ein entscheidender Schlüsselfaktor für die Entstehung nachfolgender Erkrankungen innerhalb des Metabolischen Syndroms ist, wurde die Oligomerverteilung in Abhängigkeit vom Gewicht untersucht. Korrelationsanalysen ergaben einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen Gesamtadiponectin und dem BMI. Dieser negative Zusammenhang bestand ebenfalls zwischen den Oligomeren HMW beziehungsweise MMW und dem BMI. Der prozentuale Anteil an LMW-Adiponectin war dagegen positiv mit dem BMI korreliert. Während nach Einteilung der Probanden in fünf Gruppen mit unterschiedlichem BMI hinsichtlich des Gesamtadiponectins keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen bestanden, unterschied sich die Oligomerverteilung in Abhängigkeit vom BMI jedoch signifikant. Dabei zeigte sich bei adipösen Probanden vor allem eine Verteilung hin zur LMW-Spezies zu Lasten der Spezies mit höherem Molekulargewicht, während normalgewichtige oder leicht übergewichtige Probanden einen größeren Anteil an HMW- und MMW-Oligomeren aufwiesen.

In Studien anderer Arbeitsgruppen wurden die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt, da ebenfalls negative Korrelationen zwischen dem BMI und dem Gesamtadiponectin oder dem HMW-Adiponectin ermittelt wurden (Aso et al., 2006; Hara et al., 2006). Aufgrund der Hypothese, daß das HMW-Adiponectin die biologisch aktive Form des Proteins darstellt, wurde geprüft, ob die hochmolekulare Form eine präzisere Voraussage für Parameter des Übergewichts treffen kann als das Gesamtadiponectin an sich. Regressionsanalysen ergaben jedoch keinerlei unabhängigen Einfluß des BMI auf die einzelnen Oligomere oder auf das Gesamtadiponectin. In den beiden oben genannten Publikationen hatte die Bestimmung des HMW-Adiponectins ebenfalls eine ähnliche Aussagekraft wie das Gesamtadiponectin (Aso et al., 2006; Hara et al., 2006).

Es wird weiterhin postuliert, daß die Körperfettverteilung als Parameter für die Adipositas von höherer Bedeutung ist als der BMI an sich (Lara-Castro et al., 2006). In der hier vorliegenden Untersuchung konnte durch die Betrachtung der WHR jedoch keine zusätzliche Information gegenüber dem BMI erzielt werden. In einer Studie von Christina Lara-Castro und Kollegen wurden keinerlei Zusammenhänge zwischen dem BMI oder dem

Gesamtkörperfett und Adiponectin oder den Oligomeren detektiert, während es signifikante Assoziationen mit der WHR und dem zentralen Körperfett gab (Lara-Castro et al., 2006). In einer weiteren Studie hatten normalgewichtige Personen mit normaler Glukosetoleranz ein geringeres Verhältnis zwischen HMW- und Gesamtadiponectin, wenn sie ein erhöhtes Maß an viszeralem Fettgewebe aufwiesen (Katsuki et al., 2006). Diese Beobachtungen können auf eine unterschiedliche Adiponectinproduktion in den einzelnen Fettgewebekompartimenten zurückzuführen sein. So wurden im viszeralen Fettgewebe geringere Adiponectin-mRNA-Spiegel gemessen als im subkutanen Fettgewebe (Lihn et al., 2003; Statnick et al., 2000).

In den hier gemachten Untersuchungen fiel erneut die enge Assoziation zwischen Adiponectin und Parametern des Fettstoffwechsels auf. Analog dem Gesamtadiponectin waren die Oligomere HMW und MMW stark mit dem HDL-Cholesterol und den Triglyzeridspiegeln korreliert. Diese enge Verbindung bestätigte sich in Regressionsanalysen, bei denen das HDL-Cholesterol jeweils 14 % der Änderungen des Gesamtadiponectins und der HMW-Spezies vorhersagen konnte, für das MMW-Adiponectin waren es 16 %. Somit kann auf Grundlage dieser Daten vermutet werden, daß Adiponectin stärker mit dem Fettstoffwechsel verbunden sein könnte als mit einer Adipositas. Zusätzlich lassen unsere Ergebnisse den Schluß zu, daß dieses enge Verhältnis vornehmlich durch die HMW- und MMW-Spezies bestimmt wird.

Um valide Aussagen über Zusammenhänge zwischen Übergewicht und der Oligomerverteilung machen zu können, sollten die hier gemachten Untersuchungen in einem größeren Kollektiv wiederholt werden und neben der WHR weitere Parameter für die Körperfettverteilung einbezogen werden. Jedoch stehen die Untersuchungen im Einklang mit der allgemeinen Datenlage, die eine Verschiebung der Oligomerverteilung hin zur niedermolekularen Spezies bei einer Adipositas vermuten läßt. Ob diese Oligomerverschiebung funktionelle Auswirkungen hat, ist bisher unklar. Denkbar sind jedoch veränderte Bindungsmuster an die Adiponectinrezeptoren, was einen Einfluß auf die Insulinsensitivität haben könnte. Zusätzlich muß jedoch immer auch die Expression der Rezeptoren betrachtet werden. So wurde publiziert, daß bei übergewichtigen Personen die Adiponectinrezeptoren im Fettgewebe geringer exprimiert werden als bei schlanken Personen (Rasmussen et al., 2006). Weiterhin wurde publiziert, daß die Expression des AdipoR1 in der Skelettmuskulatur negativ mit Parametern des Übergewichts assoziiert war (Zhang et al., 2005).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Adiponectinspiegel im Falle von Übergewicht vermindert sind und auch die Oligomerverteilung in Abhängigkeit vom Körpergewicht variiert, wurde die Auswirkung einer Gewichtsabnahme auf die Adiponectinspiegel und die Oligomerverteilung untersucht. 17 übergewichtige Probanden konnten während der sechsmonatigen Diät ihr Gewicht und somit auch den BMI verringern. Das Gesamtadiponectin zeigte nach der moderaten Gewichtsabnahme einen Trend hin zu erhöhten Spiegel (Bobbert et al., 2005). Gleichzeitig veränderte sich die Oligomerverteilung zu-

gunsten der HMW- und MMW-Spezies, welche nach der Gewichtsreduktion erhöht waren. Der Anteil an LMW-Adiponectin nahm dagegen ab.

Auch in früheren Studien wurden nach mäßigem Gewichtsverlust nur geringe Änderungen in den Adiponectinspiegeln gemessen (Abbasi et al., 2004). Hinsichtlich der Oligomerverteilung bestätigen unsere Daten die Ergebnisse einer vorher publizierten kleineren Studie mit sechs Probanden, bei der nach moderater Gewichtsabnahme ebenfalls ein signifikanter Anstieg der HMW-Spezies beobachtet wurde, während der Anteil an MMW- und LMW-Oligomeren zurückging (Kobayashi et al., 2004). Inzwischen sind weitere Untersuchungen zu diesem Thema gemacht worden. So wurde durch eine bilio-pankreatische Teilung bei übergewichtigen Personen bereits nach einem Monat ein deutlicher Anstieg der Adiponectinspiegel und der HMW-Fraktion erreicht (Salani et al., 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte ebenfalls dokumentiert werden, daß durch eine Gewichtsabnahme sowohl die Adiponectinspiegel als auch die Oligomerverteilung positiv beeinflusst werden können (Engl et al., 2007). Konkret unterzogen sich 13 stark übergewichtige Frauen einer Magenband-Operation, was zu einem leichten Anstieg der Adiponectinspiegel führte, und zwar vornehmlich durch einen Anstieg des MMW-Adiponectins. In einer weiteren Studie unterzogen sich 19 hochgradig übergewichtige Patientinnen einer Magen-Bypass-Operation. Sowohl das Gewicht als auch der BMI konnten schon nach einem Monat signifikant gesenkt werden, während die Abnahme nach 12 Monaten nochmals deutlicher ausfiel (Swarbrick et al., 2006). Nach einem Monat wurde eine Verschiebung hin zu der hochmolekularen Adiponectin-Spezies beobachtet, nach 12 Monaten ermittelte man auch eine signifikante Erhöhung des Gesamtadiponectins. Dabei waren die Änderungen bei der HMW-Spezies enger mit dem Verlust an Fettmasse assoziiert als Veränderungen im Gesamtadiponectin (Swarbrick et al., 2006).

Insgesamt fiel die Erhöhung von Gesamtadiponectin und HMW-Adiponectin in den letztgenannten Studien viel deutlicher aus als in der vorliegenden Studie. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Probanden in unserer Studie initial ein geringeres Körpergewicht hatten als die Personen der anderen Studien, die zudem durch die operativen Maßnahmen eine viel deutlichere Gewichtsabnahme erzielen konnten.

Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen konnten wir jedoch keine Assoziation zwischen HMW-Adiponectin und der Insulinsensitivität zeigen. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der Tatsache, daß an der Gewichtsabnahmestudie nur Personen mit einer normalen Glukosetoleranz teilgenommen haben. Die enge Korrelation zwischen der Insulinsensitivität und dem HMW-Adiponectin wurde jedoch vornehmlich bei Patienten mit einem gestörten Glukosestoffwechsel beschrieben (Aso et al., 2006). Zusätzlich konnte eine Behandlung mit Thiazolidindionen die hepatische Insulinsensitivität von Personen mit einem Typ-2-Diabetes verbessern, was eng mit der Erhöhung des HMW-Adiponectins korreliert war (Tonelli et al., 2004). Dies deckt sich mit *in vitro* Untersuchungen in Adipozyten, bei denen Pioglitazon die Sekretion von HMW-Adiponectin steigern konnte (Bodles et al., 2006). In der vorliegenden Studie kamen jedoch keine PPAR γ -Agonisten

zum Einsatz. Auch die Auswahl der Parameter für die Insulinsensitivität hat einen entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse einer Studie. Mithilfe der hier verwendeten Clamptechnik lassen sich keine Aussagen über die hepatische Insulinsensitivität machen, so daß die Möglichkeit besteht, daß HMW-Adiponectin eher mit der hepatischen als mit der peripheren Insulinsensitivität in Verbindung steht.

Eine enge Verbindung zwischen dem Fettstoffwechsel und dem Adiponectin sowie der Oligomerverteilung konnte auch in der Gewichtsabnahmestudie dokumentiert werden. Das Gesamtadiponectin und besonders die HMW-Spezies waren eng mit dem HDL-Cholesterollspiegel korreliert. Änderungen in den HDL-Cholesterollspiegeln konnten zu 34 % durch HMW-Adiponectin vorhergesagt werden. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Roberto Baratta und Mitarbeitern (Baratta et al., 2004) konnten wir eine enge Korrelation zwischen Adiponectin und der Verbesserung des Serumlipidprofils nach einer Gewichtsreduktion dokumentieren, und zwar unabhängig von der Verbesserung der Insulinsensitivität. Darüber hinaus konnten wir zeigen, daß das HMW-Adiponectin dabei eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Die Feststellung, daß durch Gewichtsabnahme gleichzeitig die Genexpression der AdipoR1 Rezeptoren signifikant zunimmt (Rasmussen et al., 2006), läßt vermuten, daß unter anderem die verstärkte Oxidation der Fettsäuren verbunden mit erniedrigten Triglyzeridspiegeln zur Verbesserung der Fettstoffwechsellage beiträgt.

Die hier vorgestellte Gewichtsabnahmestudie unterliegt gewissen Beschränkungen. Zum einen war die Anzahl der Probanden begrenzt. Zum anderen nahmen deutlich mehr Frauen als Männer an der Studie teil. Weiterhin ließ sich durch die diätetische Intervention, die relativ kurze Dauer der Studie sowie durch ein geringeres Ausgangsgewicht keine so deutliche Gewichtsabnahme erreichen, wie es in anderen Studien durch operative Maßnahmen zu beobachten war. Trotz dieser Limitierungen unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, daß sich durch eine Gewichtsabnahme die Oligomerverteilung zugunsten der höhermolekularen Spezies verändert und, möglicherweise als Folge dessen, ein Anstieg der Gesamtspiegel des Adiponectins zu erreichen ist.

Oligomerverteilung und der Glukosestoffwechsel

Aus der Literatur ist bekannt, daß Patienten mit einem Typ-2-Diabetes geringere Adiponectinspiegel aufweisen als gesunde Probanden. Innerhalb der MeSyBePo-Studie unterschieden sich die Adiponectinspiegel jedoch nicht signifikant zwischen normoglykämischen Probanden und Patienten mit einem Typ-2-Diabetes. Daraufhin wurden die Untersuchungen auf die Ebene der Oligomere ausgeweitet. In einer Subkohorte wurde geprüft, ob ein gestörter Glukosemetabolismus einen Einfluß auf die Oligomerverteilung hat. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Während sich für die hochmolekularen Spezies keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden mit normaler oder gestörter Glukosetoleranz bzw. einem Typ-2-Diabetes mellitus ergaben, variierte jedoch die Verteilung der MMW- und LMW-Oligomere. Konkret war

bei Vorliegen eines gestörten Glukosemetabolismus die MMW-Fraktion signifikant erniedrigt, während der Anteil an LMW-Adiponectin erhöht war.

Auch in anderen Arbeiten wurde eine unterschiedliche Verteilung der Oligomere in Abhängigkeit vom Glukosestoffwechsel beobachtet. So konnten Utpal Pajvani und Kollegen sowohl bei Patienten mit einem Typ-2-Diabetes als auch in Mausmodellen für Übergewicht und Diabetes ein verringertes Verhältnis an HMW- zu Gesamtadiponectin messen (Pajvani et al., 2004). In einer Arbeit von Christina Lara-Castro und Kollegen waren die Adiponectinspiegel ebenso wie die HMW-Spezies bei Probanden mit Typ-2-Diabetes im Vergleich zu insulinempfindlichen Personen signifikant vermindert. Bei insulinresistenten Probanden zeigte sich ein nicht signifikanter Trend hin zu erniedrigten Adiponectinspiegeln (Lara-Castro et al., 2006).

Während die generelle Veränderung der Oligomerverteilung bei einer Störung des Glukosestoffwechsels unstrittig erscheint, bestehen zwischen den Studien jedoch Unterschiede in der konkreten Veränderung der Oligomerfraktionen. Dieser Umstand kann vor allem dadurch erklärt werden, daß die Einteilung der Oligomere in der Literatur noch unterschiedlich gehandhabt wird. Während in dieser Arbeit zwischen drei Oligomerfraktionen unterschieden wurde, stellten andere Studien zwei Oligomere dar, wobei das Hexamer als LMW-Fraktion angesehen wurde, während das Trimer nicht detektierbar war (Lara-Castro et al., 2006). Diese Aufteilung erscheint für die hier vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht sinnvoll, da sich die Hexamer-Fraktion stets ähnlich der HMW-Fraktion verhielt, während sich die LMW-Spezies meist in die gegensätzliche Richtung veränderte. Weitere Unterschiede, auch hinsichtlich der Gesamtadiponectinspiegel, können zum einen an der relativ geringen Zahl der hier untersuchten Probanden mit einem gestörten Glukosestoffwechsel liegen. Bei wenigen Probanden wirkt sich die starke individuelle Variabilität der Adiponectinspiegel stärker auf die Ergebnisse aus. Zum anderen kamen in der Arbeit von Utpal Pajvani und Kollegen (Pajvani et al., 2004) beispielsweise Thiazolidindione zum Einsatz, die unabhängig von der Insulinsensitivität die Adiponectinspiegel beeinflussen können und somit auch die Oligomerverteilung. Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, daß Personen mit schwerer Insulinresistenz und einem Defekt der Insulinrezeptoren eine Hyperadiponectinämie aufwiesen, die vor allem auf einer Erhöhung der HMW-Fraktion basierte (Semple et al., 2007). Dies fand in Humanstudien bisher noch keine Berücksichtigung. Besonders in kleinen Kollektiven wie in der vorliegenden Subkohorte kann bereits ein an Diabetes erkrankter Patient mit einer solchen Hyperadiponectinämie die Ergebnislage wesentlich verändern.

Für eine nähere Charakterisierung des Zusammenspiels zwischen Adiponectin und dem Glukosestoffwechsel unterzogen sich die hier untersuchten Studienteilnehmer einem oralen Glukosetoleranztest. Im OGTT fiel auf, daß die Gesamtadiponectinspiegel bei Personen mit normalem Glukosestoffwechsel nach der Glukosebelastung signifikant abfielen, während sie bei Personen mit einem Typ-2-Diabetes oder einer gestörten Glukosetoleranz eher anstiegen. Es ist denkbar, daß die Absenkung der Adiponectinspiegel bei normogly-

kämischen Personen eine Art Schutzmechanismus gegen eine Hypoglykämie nach der Glukose-induzierten Insulinsekretion im OGTT darstellt. Eine Differenzierung nach dem Geschlecht ergab, daß dieser Abfall des Adiponectins nur bei Männern zu beobachten war. Somit könnte man vermuten, daß die Variation der Adiponectinspiegel im OGTT eine weitere Ausprägung der Geschlechtsunterschiede darstellt. Der tendenzielle Anstieg der Adiponectinspiegel bei Typ-2-Diabetikern, die *per se* schon geringere Adiponectinspiegel aufweisen, könnte eine Art Gegenregulation darstellen, um die gestörte Glukoseaufnahme in die Zellen zu verbessern.

Bei Betrachtung der einzelnen Oligomere innerhalb eines OGTTs wurde deutlich, daß die Verminderung der Adiponectinspiegel bei den gesunden Probanden mit einer Absenkung der HMW- und MMW-Fraktion verbunden war, während die LMW-Oligomere unverändert blieben. Bei Personen mit gestörtem Glukosestoffwechsel änderte sich die Oligomerverteilung jedoch nicht. Diese Arbeit zeigt somit bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz die Verminderung der Gesamtspiegel im OGTT mit einem daraus resultierenden Abfall der absoluten Oligomerspiegel, was vorwiegend durch die männlichen Probanden bedingt war. Im Gegensatz dazu wurden in einer Publikation von Philip Peake und Mitarbeitern bei Probanden mit normalem Glukosestoffwechsel keinerlei Veränderungen des Gesamtadiponectins oder der Oligomerverteilung im OGTT beobachtet (Peake et al., 2005). Diese Untersuchung erfolgte jedoch nur bei Frauen, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Somit existieren die Geschlechtsunterschiede möglicherweise nicht nur hinsichtlich der Adiponectinspiegel und der Oligomerverteilung an sich, sondern die Daten könnten auf eine unterschiedliche Regulation der Oligomere nach einer Glukosebelastung innerhalb eines OGTTs hinweisen.

Ein weiteres Indiz einer engen Verbindung zwischen dem Glukosestoffwechsel und der Oligomerverteilung ergab sich durch den negativen Zusammenhang zwischen den 2 h-Glukosespiegeln im OGTT und der Oligomerverteilung in der MeSyBePo-Subkohorte. In anderen Publikationen wird ebenfalls auf Zusammenhänge zwischen dem 2 h-Glukosespiegel und den Oligomeren verwiesen. In einer Arbeit von Ffolliott M. Fisher und Mitarbeitern unterzogen sich Indo-asiatische Männer mit einem breiten Spektrum an Glukosetoleranzwerten einem OGTT. Dabei korrelierten sowohl das Adiponectin als auch der Quotient aus HMW zu Gesamtadiponectin negativ mit dem Glukosespiegel nach 2 h; Frauen wurden in diese Studie nicht mit einbezogen (Fisher et al., 2005). In einer weiteren Studie konnte dagegen bei gesunden Probanden, deren Eltern einen Typ-2-Diabetes aufwiesen, kein Zusammenhang zwischen Adiponectin oder dem prozentualen Anteil an HMW und den 2 h-Glukosespiegeln ermittelt werden (Halperin et al., 2005). Die Datenlage hinsichtlich des Adiponectins im OGTT stellt sich somit wiederum uneinheitlich dar. Es konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, daß das Geschlecht der untersuchten Probanden neben dem Status des Glukosestoffwechsels eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Auch unterschiedliche Ethnien könnten einen Einfluß auf die Ergebnisse

haben, da bereits gezeigt werden konnte, daß Asiaten geringere Adiponectinspiegel aufweisen als sogenannte Kaukasier (Valsamakis et al., 2003).

Nachdem die Assoziation zwischen der Oligomerverteilung und den Nüchternblutparametern sowie den Parametern des OGTTs betrachtet wurden, komplettierte die Clamp-Studie die Untersuchung metabolischer Einflußfaktoren auf die Verteilung der Oligomere des Adiponectins *in vivo*. Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, daß Insulin *in vivo* zu einem Abfall der Adiponectinspiegel führt. Für eine nähere Charakterisierung dieses Zusammenhangs wurde die Oligomerverteilung im Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps analysiert. Im Gegensatz zu den Gesamtspiegeln wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen Oligomerfraktionen durch eine akute Insulinbelastung nicht beeinflusst. Die basalen Werte für die absoluten Adiponectin-Oligomere waren bei insulin sensitiven Personen signifikant höher als bei den insulinresistenten Probanden und spiegelten somit die höheren Gesamtspiegel bei den insulin sensitiven Personen wider. Während des Clamps blieben die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen. Der bereits oben beschriebene Abfall der Gesamtadiponectinspiegel reflektierte sich in der signifikanten Abnahme der absoluten MMW- und LMW-Spezies bei gleichbleibender HMW-Spezies. Die prozentuale Verteilung der Oligomere wurde durch die akute Hyperinsulinämie jedoch nicht beeinflusst. Ähnliche Resultate ergab eine Studie mit Kaninchen, bei der die Injektion von Insulin die Oligomerverteilung nicht verändern konnte (Peake et al., 2005). Diese Beobachtungen stehen jedoch im Widerspruch zu einer Studie mit Mäusen, bei denen eine Insulininjektion in einer Absenkung der HMW-Spezies resultierte (Pajvani et al., 2003). Unterschiede zwischen Humanstudien und dem Mausmodell könnten jedoch aus der Variation der N-terminalen Sequenz herrühren, die für die Bildung der Oligomere von Bedeutung ist (Waki et al., 2003). Somit besteht weiterer Klärungsbedarf hinsichtlich einer möglichen modulatorischen Wirkung von Insulin auf die Oligomerisierung des Adiponectins.

Es wird vermutet, daß das hochmolekulare Oligomer die biologisch aktive Form des Adiponectins darstellt (Pajvani et al., 2004). Die HMW-Oligomere binden sehr gut an die Adiponectinrezeptoren und stimulieren die AMP-aktivierte Proteinkinase, eines der Schlüsselproteine in der Wirkungskette des Adiponectins (Hara et al., 2006). Es wurde auch gezeigt, daß eine Mutation im Adiponectingen, welche die Multimerisierung des Proteins hemmt, mit dem Vorliegen einer Insulinresistenz oder auch einem Typ-2-Diabetes assoziiert ist (Waki et al., 2003). Daraus entstand die Hypothese, daß man durch die Messung des HMW-Adiponectins möglicherweise eine bessere Voraussage für die Entwicklung einer Insulinresistenz treffen kann. Tatsächlich wurde in neueren Studien demonstriert, daß HMW-Adiponectin an sich oder das Verhältnis zwischen HMW-Adiponectin/Gesamtadiponectin enger mit dem Glukosestoffwechsel assoziiert war. So zeigte eine Studie von Julia Tonelli und Kollegen (Tonelli et al., 2004) eine Erhöhung der HMW-Fraktion nach Gabe von Thiazolidindionen. Dabei korrelierte der Anteil an HMW-

Adiponectin eng mit der Pioglitazon-assoziierten endogenen Glukoseproduktion, nicht aber das Gesamtadiponectin. Die Arbeitsgruppe um Philipp Scherer konnte ebenfalls zeigen, daß das Verhältnis zwischen HMW- und Gesamtadiponectin die Thiazolidindion-induzierte Verbesserung der Insulinsensitivität besser widerspiegelte als das Gesamtadiponectin (Pajvani et al., 2004). Für die insulinsensitivierende Wirkung der Thiazolidindione scheinen daher die hochmolekularen Formen des Adiponectins eine entscheidende Rolle zu spielen. Aber auch in Thiazolidindion-unabhängigen Studien korrelierte das Verhältnis HMW-/Gesamtadiponectin stärker mit den Glukosespiegeln innerhalb eines Glukosetoleranztests als das Gesamtadiponectin allein (Fisher et al., 2005). In einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe um Takashi Kadowaki konnte der Quotient aus HMW zu Gesamtadiponectin zu 80 % die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms vorhersagen (Hara et al., 2006). So war der Quotient enger mit dem Insulinresistenzindex $HOMA_{IR}$ sowie mit koronarer Atherosklerose assoziiert als das Gesamtadiponectin.

Die Untersuchungen der Oligomerverteilung in verschiedenen Kollektiven ergaben im Rahmen dieser Arbeit enge Verbindungen zwischen den Oligomeren und einer Adipositas, dem Glukosestoffwechsel und besonders dem Fettstoffwechsel. Es konnte dabei gezeigt werden, daß sich die Oligomere HMW und MMW bei bestimmten metabolischen Gegebenheiten gegensätzlich zum LMW-Adiponectin verhielten. Dies läßt auf eine ähnliche Regulation von HMW- und MMW-Adiponectin schließen. Zusätzlich waren die Gesamtspiegel des Adiponectins jedoch stets mit den verschiedenen metabolischen Parametern in ähnlicher Weise und auch Stärke assoziiert, wie die HMW- oder MMW-Spezies, deren Messung nicht immer von zusätzlichem Nutzen war. Diese Sichtweise wird auch durch eine neue Arbeit von Matthias Blüher und Kollegen gestützt. Ein Vergleich der Zusammenhänge zwischen metabolischen Parametern mit Gesamtadiponectin oder HMW-Adiponectin, gemessen mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Tests, ergab keine Unterschiede in der Aussagekraft beider Faktoren (Blüher et al., 2007). Die molekularen Mechanismen der unterschiedlichen metabolischen Effekte durch die einzelnen Oligomere sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Variationen in der Bindung an Wachstumsfaktoren zur Kontrolle von deren Bioverfügbarkeit (Wang et al., 2005), eine unterschiedliche Affinität zu den Adiponectinrezeptoren, welche ihrerseits eine unterschiedliche Verteilung im Organismus aufweisen, sowie eine variable Sekretion durch die Adipozyten scheinen für die spezifischen metabolischen Wirkungen der Oligomere verantwortlich zu sein.

5 Zusammenfassung

Adiponectin ist mit verschiedenen Komplikationen innerhalb des Metabolischen Syndroms assoziiert. Übergewicht, Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen oder Fettstoffwechselstörungen sind mit erniedrigten zirkulierenden Spiegeln verbunden. Eine Modulation der Adiponectinspiegel kann durch genetische Gegebenheiten, die Stoffwechsellage oder auch externe Faktoren wie den insulinsensitivierenden Thiazolidindionen erfolgen. Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse von Faktoren, welche die zirkulierenden Adiponectinspiegel beeinflussen können, sowie eine Charakterisierung der Oligomerverteilung unter verschiedenen metabolischen Gegebenheiten.

Innerhalb der MeSyBePo-Kohorte konnte gezeigt werden, daß die Promotorpolymorphismen im Adiponectingen ADIPOQ -11377 C/G und ADIPOQ -11391 G/A die zirkulierenden Adiponectinspiegel beeinflussen. Dabei bewirkte die homozygote Variante GG des Polymorphismus ADIPOQ -11377 C/G eine Absenkung der Adiponectinspiegel, während bei Vorliegen des Allels A des Polymorphismus ADIPOQ -11391 G/A ein Anstieg der Adiponectinkonzentration im Serum zu beobachten war. Somit scheint das Adiponectin selbst ein potenter Modulator der zirkulierenden Adiponectinspiegel zu sein. Ergänzende *in vitro* Untersuchungen zur Promotoraktivität des Adiponectins in Abhängigkeit von der genetischen Variante der oben genannten Promotorpolymorphismen ergaben abweichend von den *in vivo* erhobenen Daten eine Aktivitätserhöhung des Promotors bei Vorliegen der Polymorphismusvariante ADIPOQ -11377 G bzw. keine Unterschiede zwischen den Varianten des Polymorphismus ADIPOQ -11391 G/A.

Im Anschluß an die genetischen Analysen erfolgte die Untersuchung von metabolischen Parametern im Hinblick auf die Beeinflußbarkeit der zirkulierenden Adiponectinspiegel. In der MeSyBePo-Kohorte hatten Frauen höhere Adiponectinkonzentrationen als Männer. Die Adiponectinspiegel korrelierten negativ mit dem BMI, dem HOMA-Index für die Insulinresistenz und den Triglyzeriden; mit dem HDL-Cholesterol waren sie dagegen positiv assoziiert. In Regressionsanalysen wurde ein unabhängiger Einfluß des Geschlechts, der Insulinresistenz, des HDL-Cholesterols sowie des Alters auf die Variabilität der zirkulierenden Adiponectinspiegel ermittelt. Innerhalb von hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps konnte gezeigt werden, daß eine akute Hyperinsulinämie zu einer Abnahme der Adiponectinspiegel führt. Somit scheint Insulin ebenfalls einen modulatorischen Effekt auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel zu haben. Parallel durchgeführte *in vitro* Experimente in humanen embryonalen Nierenzellen ergaben keine Beeinflussung der Promotoraktivität des Adiponectins durch Faktoren wie Glukose, Insulin, freie Fettsäuren oder das Thiazolidindion Rosiglitazon.

Die Untersuchungen wurden auf ein Frauenkollektiv ausgeweitet, welches durch das Vorliegen eines Polyzystischen Ovarsyndroms (PCOS) charakterisiert war, einer endo-

krinologischen Erkrankung, die mit einem erhöhten Risiko eines Typ-2-Diabetes mellitus verbunden ist. Die Frauen mit einem PCOS wiesen geringere Adiponectinspiegel auf als die gesunde Kontrollgruppe. Übergewichtige Frauen hatten jedoch unabhängig vom PCOS niedrigere Adiponectinspiegel als schlanke Frauen, so daß sich nach Adjustierung für den BMI keinerlei Unterschiede zwischen Frauen mit oder ohne PCOS ergaben. Somit scheint das Adiponectin nicht direkt mit der Pathogenese des PCOS verbunden zu sein.

Adiponectin zirkuliert in drei verschiedenen oligomeren Formen im Serum, als hochmolekulare (HMW), mittelmolekulare (MMW) und niedrigmolekulare (LMW) Spezies. Diese Oligomere üben möglicherweise unterschiedliche Funktionen im Organismus aus. Eine Analyse des Blutserums von Probanden aus der MeSyBePo-Kohorte ergab, daß sich die Oligomerverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht unterschied, wobei Frauen analog dem Gesamtadiponectin einen höheren Anteil an der HMW-Spezies aufwiesen als Männer. In einer Analyse der Oligomere in Abhängigkeit vom Körpergewicht konnte mit zunehmendem BMI eine Verlagerung von hochmolekularen Spezies hin zu den niedrigmolekularen Spezies beobachtet werden. Durch eine moderate Gewichtsabnahme ließ sich das Verteilungsmuster der Oligomere zugunsten erhöhter Anteile an HMW- und MMW-Adiponectin positiv beeinflussen. Die HMW-Spezies war zusätzlich eng mit dem HDL-Cholesterolspiegel assoziiert und könnte eine spezifische funktionelle Bedeutung vor allem in Hinblick auf den Fettstoffwechsel haben.

Während sich in Abhängigkeit vom Glukosemetabolismus in der MeSyBePo-Kohorte keine Unterschiede in den Adiponectinspiegeln ergaben, fanden sich jedoch Unterschiede in der Oligomerverteilung. In einer Subkohorte wurden bei Personen mit normaler Glukosetoleranz signifikant höhere Anteile an MMW-Adiponectin detektiert als bei Personen mit einem gestörten Glukosestoffwechsel. Weiterhin sanken die Adiponectinspiegel bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz innerhalb eines oralen Glukosetoleranztests ab. Dabei waren die HMW- und MMW-Fraktionen vermindert, während die LMW-Fraktion konstant blieb. Ein Abfall der Adiponectinspiegel im Rahmen eines hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps ging dagegen nicht mit einem veränderten Verteilungsmuster der Oligomere einher. Insgesamt scheinen die HMW- und MMW-Spezies gegensätzlich zur LMW-Spezies reguliert zu werden, wenngleich die genaue funktionelle Bedeutung der einzelnen Oligomere einer weiteren Aufklärung bedarf.

Die Arbeit unterstreicht die wichtige Rolle des Adiponectins im Glukose- und Fettstoffwechsel sowie bei einer Adipositas *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, daß Änderungen der Adiponectinspiegel bei Vorliegen von Insulinresistenz und Adipositas stets mit einer Umverteilung der Oligomerfraktionen verbunden waren. Dabei scheinen vor allem die HMW- und MMW-Spezies des Adiponectins von entscheidender Bedeutung zu sein.

6 Summary

Experimental data suggest that changes in adiponectin levels might be involved in the development of the metabolic syndrome. Adiponectin circulates in a variety of multimeric forms and its concentration was found to be decreased as a result of obesity, type 2 diabetes mellitus, coronary artery disease, and dyslipidemia. Polymorphisms within the adiponectin gene, as well as the metabolic status and additional external factors such as thiazolidinediones, may modulate the adiponectin level. The aim of this work was to evaluate factors that may modulate total adiponectin levels as well as the distribution of its multimeric complexes under specific metabolic conditions.

In the caucasian MeSyBePo population, serum adiponectin concentrations were associated with two promoter polymorphisms, ADIPOQ -11377 C/G and ADIPOQ -11391 G/A, respectively. The minor allele of ADIPOQ -11377 C/G was associated with decreased adiponectin levels, whereas adiponectin levels were higher in subjects with the minor variant of ADIPOQ -11391 G/A. Neither of them was associated with anthropometric or metabolic parameters in the MeSyBePo cohort. These data provide further evidence for the association of ADIPOQ promoter polymorphisms with the genetic modulation of adiponectinemia. Additionally, we assessed the transcriptional activity of the adiponectin promoter according to polymorphisms ADIPOQ -11377 C/G and ADIPOQ -11391 G/A through luciferase tests. The -11377G allele had a higher transcriptional activity than the wild-type, which was in contrast to the association between this allele and lower adiponectin levels observed in the MeSyBePo cohort. Regarding the ADIPOQ -11391 polymorphism, the A allele showed no difference in transcriptional activity compared to the wild-type construct.

Following the genetic analysis, metabolic parameters were examined that may influence circulatory adiponectin levels. In the MeSyBePo cohort, mean serum adiponectin levels were higher in female than in male subjects. Adiponectin was negatively correlated to BMI, Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA_{IR}) and triglycerides, but positively correlated with HDL-cholesterol. In multivariate regression analysis, gender, HOMA_{IR}, HDL-cholesterol, as well as age independently predicted circulatory adiponectin. Hyperinsulinemic euglycemic clamps acutely lowered serum adiponectin concentration, thereby supporting a role for insulin in the modulation of adiponectin levels. Accompanying *in vitro* analysis of the adiponectin promoter activity showed no modulation of transcriptional activity by stimulating human embryonic kidney cells with glucose, insulin, free fatty acids or thiazolidinedione rosiglitazone.

Furthermore, we examined women with polycystic ovarian syndrome (PCOS), an endocrine disorder that is associated with a higher risk for type 2 diabetes mellitus. Women with PCOS had lower adiponectin levels than the control subjects. Additionally, adipo-

nectin levels were lower in overweight or obese women than in normal-weight women, without any difference between PCOS and controls after adjustment for BMI. These data suggest that adiponectin is not directly involved in the pathogenesis of PCOS.

Adiponectin circulates in serum as low-, medium-, and high-molecular-weight complexes (LMW, MMW, and HMW, respectively). These structural properties may influence the *in vivo* activity of the protein. Analysis of serum samples within the MeSyBePo cohort revealed a sexual dimorphism in terms of complex distribution, with women having significantly higher HMW-Adiponectin than men. Furthermore, adiponectin oligomer composition was related to BMI, with decreased HMW and MMW fractions in case of high BMI levels. According to this, HMW and MMW-Adiponectin increased after moderate weight reduction. Additionally, HWM adiponectin was closely associated with HDL-cholesterol, suggesting a functional role in lipid metabolism.

To determine whether hyperglycemia differentially affects the oligomer distribution, blood serum analysis was performed in a subcohort of MeSyBePo. While total adiponectin levels were comparable between patients with type 2 diabetes and control subjects, a reduction of MMW-Oligomers was observed in patients with impaired glucose metabolism. In subjects with normal glucose tolerance, an oral glucose load led to decreased total adiponectin levels, associated with decreased fractions of HMW and MMW-Adiponectin. In contrast, oligomer composition was not altered by hyperinsulinemic euglycemic clamps, implying no acute regulative influence of insulin on oligomer distribution. Independent from glucose metabolism, HMW-Adiponectin was associated with HDL-cholesterol again. Finally, these studies all suggested a differential regulation of HMW and MMW species compared to the LMW fraction, although the detailed functional relevance has to be further elucidated.

The data presented underline the important role of adiponectin in glucose- and lipid metabolism as well as in adiposity. We showed that modulation of total adiponectin levels in case of insulin resistance or adiposity are always accompanied with changes of adiponectin oligomer composition. Thereby, the HMW and MMW species seem to play a crucial role in affecting metabolic changes.

7 Literaturverzeichnis

- Abbasi, F., C. Lamendola, T. McLaughlin, J. Hayden, G.M. Reaven, und P.D. Reaven. 2004. Plasma adiponectin concentrations do not increase in association with moderate weight loss in insulin-resistant, obese women. *Metabolism*. 53:280-3.
- Adamczak, M., A. Wiecek, T. Funahashi, J. Chudek, F. Kokot, und Y. Matsuzawa. 2003. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 16:72-5.
- Ahima, R.S. 2006. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)*. 14 Suppl 1:9S-15S.
- Apridonidze, T., P.A. Essah, M.J. Iuorno, und J.E. Nestler. 2005. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:1929-35.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, und Y. Matsuzawa. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 257:79-83.
- Aso, Y., R. Yamamoto, S. Wakabayashi, T. Uchida, K. Takayanagi, K. Takebayashi, T. Okuno, T. Inoue, K. Node, T. Tobe, T. Inukai, und Y. Nakano. 2006. Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes*. 55:1954-60.
- Asunción, M., R.M. Calvo, J.L. San Millán, J. Sancho, S. Avila, und H.F. Escobar-Morreale. 2000. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:2434-8.
- Azziz, R., K.S. Woods, R. Reyna, T.J. Key, E.S. Knochenhauer, und B.O. Yildiz. 2004. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2745-9.
- Baratta, R., S. Amato, C. Degano, M.G. Farina, G. Patanè, R. Vigneri, und L. Frittitta. 2004. Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2665-71.
- Barth, N., T. Langmann, J. Schölmerich, G. Schmitz, und A. Schäffler. 2002. Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 (apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways. *Diabetologia*. 45:1425-33.
- Bate, K.L., und G. Jerums. 2003. 3: Preventing complications of diabetes. *Med J Aust*. 179:498-503.
- Bauche, I.B., S. Ait El Mkaem, R. Rezsöhazi, T. Funahashi, N. Maeda, L.M. Miranda, und S.M. Brichard. 2006. Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 345:1414-24.
- Berg, A.H., T.P. Combs, X. Du, M. Brownlee, und P.E. Scherer. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 7:947-53.
- Berthoud, H.R. 2006. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)*. 14 Suppl 5:197S-200S.
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*. 100:243-55.

- Birnboim, H.C., und J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Bjursell, M., A. Ahnmark, Y.M. Bohlooly, L. William-Olsson, M. Rhedin, X.R. Peng, K. Ploj, A.K. Gerdin, G. Arnerup, A. Elmgren, A.L. Berg, J. Oscarsson, und D. Linden. 2007. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes.* 56:583-93.
- Blüher, M., A.M. Brennan, T. Kelesidis, J. Kratzsch, M. Fasshauer, S. Kralisch, C.J. Williams, und C.S. Mantzoros. 2007. Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays. *Diabetes Care.* 30:280-5.
- Bobbert, T., H. Rochlitz, U. Wegewitz, S. Akpulat, K. Mai, M.O. Weickert, M. Möhlig, A.F. Pfeiffer, und J. Spranger. 2005. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes.* 54:2712-9.
- Bodles, A.M., A. Banga, N. Rasouli, F. Ono, P.A. Kern, und R.J. Owens. 2006. Pioglitazone increases secretion of high-molecular-weight adiponectin from adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291:E1100-5.
- Bogan, J.S., und H.F. Lodish. 1999. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol.* 146:609-20.
- Bouatia-Naji, N., D. Meyre, S. Lobbens, K. Séron, F. Fumeron, B. Balkau, B. Heude, B. Jouret, P.E. Scherer, C. Dina, J. Weill, und P. Froguel. 2006. ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. *Diabetes.* 55:545-50.
- Brame, L.A., R.V. Considine, M. Yamauchi, A.D. Baron, und K.J. Mather. 2005. Insulin and endothelin in the acute regulation of adiponectin in vivo in humans. *Obes Res.* 13:582-8.
- Bray, G.A. 2006. Obesity: the disease. *J Med Chem.* 49:4001-7.
- Bruun, J.M., A.S. Lihn, C. Verdich, S.B. Pedersen, S. Toubro, A. Astrup, und B. Richelsen. 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E527-33.
- Bullen, J.W., Jr., S. Blüher, T. Kelesidis, und C.S. Mantzoros. 2007. Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:E1079-86.
- Buzzetti, R., A. Petrone, S. Zavarella, S. Zampetti, M. Spoletini, S. Potenziani, G. Leto, J. Osborn, und F. Leonetti. 2006. The glucose clamp reveals an association between adiponectin gene polymorphisms and insulin sensitivity in obese subjects. *Int J Obes (Lond).*
- Cara, J.F., und R.L. Chaiken. 2006. Type 2 diabetes and the metabolic syndrome in children and adolescents. *Curr Diab Rep.* 6:241-50.
- Carmina, E., und R.A. Lobo. 1999. Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:1897-9.
- Choi, K.M., J. Lee, K.W. Lee, J.A. Seo, J.H. Oh, S.G. Kim, N.H. Kim, D.S. Choi, und S.H. Baik. 2004. Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf).* 61:75-80.
- Civitarese, A.E., C.P. Jenkinson, D. Richardson, M. Bajaj, K. Cusi, S. Kashyap, R. Berria, R. Belfort, R.A. DeFronzo, L.J. Mandarino, und E. Ravussin. 2004. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 47:816-20.

- Clarke, K.J., Q. Zhong, D.D. Schwartz, E.S. Coleman, R.J. Kemppainen, und R.L. Judd. 2003. Regulation of adiponectin secretion by endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 312:945-9.
- Cnop, M., P.J. Havel, K.M. Utzschneider, D.B. Carr, M.K. Sinha, E.J. Boyko, B.M. Retzlaff, R.H. Knopp, J.D. Brunzell, und S.E. Kahn. 2003. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia.* 46:459-69.
- Combs, T.P., J.A. Wagner, J. Berger, T. Doebber, W.J. Wang, B.B. Zhang, M. Tanen, A.H. Berg, S. O'Rahilly, D.B. Savage, K. Chatterjee, S. Weiss, P.J. Larson, K.M. Gottesdiener, B.J. Gertz, M.J. Charron, P.E. Scherer, und D.E. Moller. 2002. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology.* 143:998-1007.
- Comuzzie, A.G., T. Funahashi, G. Sonnenberg, L.J. Martin, H.J. Jacob, A.E. Black, D. Maas, M. Takahashi, S. Kihara, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, J. Blangero, D. Cohen, und A. Kissebah. 2001. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:4321-5.
- Côté, M., P. Mauriège, J. Bergeron, N. Alméras, A. Tremblay, I. Lemieux, und J.P. Després. 2005. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:1434-9.
- Daimon, M., T. Oizumi, T. Saitoh, W. Kameda, A. Hirata, H. Yamaguchi, H. Ohnuma, M. Igarashi, M. Tominaga, und T. Kato. 2003. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care.* 26:2015-20.
- Das, K., Y. Lin, E. Widen, Y. Zhang, und P.E. Scherer. 2001. Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:1120-9.
- De Leo, V., A. la Marca, und F. Petraglia. 2003. Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 24:633-67.
- DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, und R. Andres. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 237:E214-23.
- Dereli, D., T. Dereli, F. Bayraktar, A.G. Ozgen, und C. Yilmaz. 2005. Endocrine and metabolic effects of rosiglitazone in non-obese women with polycystic ovary disease. *Endocr J.* 52:299-308.
- Ducluzeau, P.H., P. Cousin, E. Malvoisin, H. Bornet, H. Vidal, M. Laville, und M. Pugeat. 2003. Glucose-to-insulin ratio rather than sex hormone-binding globulin and adiponectin levels is the best predictor of insulin resistance in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:3626-31.
- Ehrmann, D.A., R.B. Barnes, R.L. Rosenfield, M.K. Cavaghan, und J. Imperial. 1999. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.* 22:141-6.
- Engeli, S., M. Feldpausch, K. Gorzelniak, F. Hartwig, U. Heintze, J. Janke, M. Möhlig, A.F. Pfeiffer, F.C. Luft, und A.M. Sharma. 2003. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes.* 52:942-7.
- Engl, J., T. Bobbert, C. Ciardi, M. Laimer, T. Tatarczyk, S. Kaser, H. Weiss, C. Molnar, H. Tilg, J.R. Patsch, J. Spranger, und C.F. Ebenbichler. 2007. Effects of pronounced weight loss on adiponectin oligomer composition and metabolic parameters. *Obesity (Silver Spring).* 15:1172-8.
- Esposito, K., A. Pontillo, C. Di Palo, G. Giugliano, M. Masella, R. Marfella, und D. Giugliano. 2003. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama.* 289:1799-804.

- Fang, X., R. Palanivel, X. Zhou, Y. Liu, A. Xu, Y. Wang, und G. Sweeney. 2005. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. *J Mol Endocrinol.* 35:465-76.
- Fasshauer, M., J. Klein, S. Neumann, M. Eszlinger, und R. Paschke. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:1084-9.
- Fasshauer, M., S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Blüher, J. Klein, und R. Paschke. 2003. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:1045-50.
- Fisher, F.F., M.E. Trujillo, W. Hanif, A.H. Barnett, P.G. McTernan, P.E. Scherer, und S. Kumar. 2005. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia.* 48:1084-7.
- Franks, S. 1995. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 333:853-61.
- Friedewald, W.T., R.I. Levy, und D.S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18:499-502.
- Fruebis, J., T.S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R. Erickson, F.T. Yen, B.E. Bihain, und H.F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2005-10.
- Fry, M., T.D. Hoyda, und A.V. Ferguson. 2007. Making sense of it: roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood).* 232:14-26.
- Fujita, H., H. Fujishima, J. Koshimura, M. Hosoba, N. Yoshioka, T. Shimotomai, T. Morii, T. Narita, M. Kakei, und S. Ito. 2005. Effects of antidiabetic treatment with metformin and insulin on serum and adipose tissue adiponectin levels in db/db mice. *Endocr J.* 52:427-33.
- Fumeron, F., R. Aubert, A. Siddiq, D. Betoulle, F. Pean, S. Hadjadj, J. Tichet, E. Wilpart, M.C. Chesnier, B. Balkau, P. Froguel, und M. Marre. 2004. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes.* 53:1150-7.
- Furler, S.M., S.K. Gan, A.M. Poynten, D.J. Chisholm, L.V. Campbell, und A.D. Kriketos. 2006. Relationship of adiponectin with insulin sensitivity in humans, independent of lipid availability. *Obesity (Silver Spring).* 14:228-34.
- Gastaldelli, A., Y. Miyazaki, A. Mahankali, R. Berria, M. Pettiti, E. Buzzigoli, E. Ferrannini, und R.A. DeFronzo. 2006. The effect of pioglitazone on the liver: role of adiponectin. *Diabetes Care.* 29:2275-81.
- Gavrila, A., J.L. Chan, N. Yiannakouris, M. Kontogianni, L.C. Miller, C. Orlova, und C.S. Mantzoros. 2003. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4823-31.
- Gibson, F., und P. Froguel. 2004. Genetics of the APM1 locus and its contribution to type 2 diabetes susceptibility in French Caucasians. *Diabetes.* 53:2977-83.
- Gillespie, K.M. 2006. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Cmaj.* 175:165-70.
- Glueck, C.J., A. Moreira, N. Goldenberg, L. Sieve, und P. Wang. 2003. Pioglitazone and metformin in obese women with polycystic ovary syndrome not optimally responsive to metformin. *Hum Reprod.* 18:1618-25.
- Gu, H.F., A. Abulaiti, C.G. Östenson, K. Humphreys, C. Wahlestedt, A.J. Brookes, und S. Efendic. 2004. Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region

- of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians. *Diabetes*. 53 Suppl 1:S31-5.
- Guardiola-Diaz, H.M., S. Rehnmark, N. Usuda, T. Albrechtsen, D. Feltkamp, J.A. Gustafsson, und S.E. Alexson. 1999. Rat peroxisome proliferator-activated receptors and brown adipose tissue function during cold acclimatization. *J Biol Chem*. 274:23368-77.
- Gui, Y., J.V. Silha, und L.J. Murphy. 2004. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res*. 12:1481-91.
- Guo, X., M.F. Saad, C.D. Langefeld, A.H. Williams, J. Cui, K.D. Taylor, J.M. Norris, S. Jinagouda, C.H. Darwin, B.D. Mitchell, R.N. Bergman, B. Sutton, Y.D. Chen, L.E. Wagenknecht, D.W. Bowden, und J.I. Rotter. 2006. Genome-Wide Linkage of Plasma Adiponectin Reveals a Major Locus on Chromosome 3q Distinct From the Adiponectin Structural Gene: The IRAS Family Study. *Diabetes*. 55:1723-30.
- Gustafson, B., M.M. Jack, S.W. Cushman, und U. Smith. 2003. Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 308:933-9.
- Halleux, C.M., M. Takahashi, M.L. Delporte, R. Detry, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, und S.M. Brichard. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 288:1102-7.
- Halperin, F., J.A. Beckman, M.E. Patti, M.E. Trujillo, M. Garvin, M.A. Creager, P.E. Scherer, und A.B. Goldfine. 2005. The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia*. 48:2147-54.
- Hara, K., M. Horikoshi, T. Yamauchi, H. Yago, O. Miyazaki, H. Ebinuma, Y. Imai, R. Nagai, und T. Kadowaki. 2006. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 29:1357-62.
- Harborne, L., R. Fleming, H. Lyall, J. Norman, und N. Sattar. 2003. Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 361:1894-901.
- Heid, I.M., S.A. Wagner, H. Gohlke, B. Iglseider, J.C. Mueller, P. Cip, G. Ladurner, R. Reiter, A. Stadlmayr, V. Mackevics, T. Illig, F. Kronenberg, und B. Paulweber. 2006. Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes*. 55:375-84.
- Heliövaara, M.K., T.E. Strandberg, S.L. Karonen, und P. Ebeling. 2006. Association of serum adiponectin concentration to lipid and glucose metabolism in healthy humans. *Horm Metab Res*. 38:336-40.
- Herrmann, B.L., B. Saller, M. Stratmann, C. Berg, K. Mann, und O.E. Janssen. 2005. Effects of a combination of rhGH and metformin on adiponectin levels in patients with metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 37:49-52.
- Hosker, J.P., D.R. Matthews, A.S. Rudenski, M.A. Burnett, P. Darling, E.G. Bown, und R.C. Turner. 1985. Continuous infusion of glucose with model assessment: measurement of insulin resistance and beta-cell function in man. *Diabetologia*. 28:401-11.
- Hotta, K., T. Funahashi, Y. Arita, M. Takahashi, M. Matsuda, Y. Okamoto, H. Iwahashi, H. Kuriyama, N. Ouchi, K. Maeda, M. Nishida, S. Kihara, N. Sakai, T. Nakajima, K. Hasegawa, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Hanafusa, und Y. Matsuzawa. 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific

- protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1595-9.
- Hotta, K., T. Funahashi, N.L. Bodkin, H.K. Ortmeier, Y. Arita, B.C. Hansen, and Y. Matsuzawa. 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes.* 50:1126-33.
- Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 271:10697-703.
- Huang, K.C., C.L. Chen, L.M. Chuang, S.R. Ho, T.Y. Tai, and W.S. Yang. 2003. Plasma adiponectin levels and blood pressures in nondiabetic adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4130-4.
- Hug, C., J. Wang, N.S. Ahmad, J.S. Bogan, T.S. Tsao, and H.F. Lodish. 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10308-13.
- Hulthe, J., L.M. Hultén, and B. Fagerberg. 2003. Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism.* 52:1612-4.
- Huypens, P., E. Quartier, D. Pipeleers, and M. Van de Castele. 2005. Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase. *Eur J Pharmacol.* 518:90-5.
- Ikeda, K., H. Maegawa, S. Ugi, Y. Tao, Y. Nishio, S. Tsukada, S. Maeda, and A. Kashiwagi. 2006. Transcription factor activating enhancer-binding protein-2beta. A negative regulator of adiponectin gene expression. *J Biol Chem.* 281:31245-53.
- Ish-Horowicz, D., and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-98.
- Iwashima, Y., T. Katsuya, K. Ishikawa, N. Ouchi, M. Ohishi, K. Sugimoto, Y. Fu, M. Motone, K. Yamamoto, A. Matsuo, K. Ohashi, S. Kihara, T. Funahashi, H. Rakugi, Y. Matsuzawa, and T. Ogihara. 2004. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension.* 43:1318-23.
- Janssen, I., P.T. Katzmarzyk, and R. Ross. 2004. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr.* 79:379-84.
- Kamon, J., T. Yamauchi, S. Muto, S. Takekawa, Y. Ito, Y. Hada, W. Ogawa, A. Itai, M. Kasuga, K. Tobe, and T. Kadowaki. 2004. A novel IKKbeta inhibitor stimulates adiponectin levels and ameliorates obesity-linked insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 323:242-8.
- Kappes, A., and G. Loffler. 2000. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res.* 32:548-54.
- Katsuki, A., M. Suematsu, E.C. Gabazza, S. Murashima, K. Nakatani, K. Togashi, Y. Yano, and Y. Sumida. 2006. Decreased high-molecular weight adiponectin-to-total adiponectin ratio in sera is associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal-weight men with normal glucose tolerance. *Diabetes Care.* 29:2327-8.
- Katz, A., S.S. Nambi, K. Mather, A.D. Baron, D.A. Follmann, G. Sullivan, and M.J. Quon. 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:2402-10.
- Kazumi, T., A. Kawaguchi, T. Hirano, and G. Yoshino. 2004. Serum adiponectin is associated with high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein particle size in young healthy men. *Metabolism.* 53:589-93.

- Kern, P.A., G.B. Di Gregorio, T. Lu, N. Rassouli, und G. Ranganathan. 2003. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 52:1779-85.
- Kharroubi, I., J. Rasschaert, D.L. Eizirik, und M. Cnop. 2003. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:1118-22.
- Kim, K.Y., J.K. Kim, J.H. Jeon, S.R. Yoon, I. Choi, und Y. Yang. 2005. c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 327:460-7.
- Kissebah, A.H., G.E. Sonnenberg, J. Myklebust, M. Goldstein, K. Broman, R.G. James, J.A. Marks, G.R. Krakower, H.J. Jacob, J. Weber, L. Martin, J. Blangero, und A.G. Comuzzie. 2000. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:14478-83.
- Kita, A., H. Yamasaki, H. Kuwahara, A. Moriuchi, K. Fukushima, M. Kobayashi, T. Fukushima, R. Takahashi, N. Abiru, S. Uotani, E. Kawasaki, und K. Eguchi. 2005. Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:484-90.
- Kobayashi, H., N. Ouchi, S. Kihara, K. Walsh, M. Kumada, Y. Abe, T. Funahashi, und Y. Matsuzawa. 2004. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res*. 94:e27-31.
- Kondo, H., I. Shimomura, Y. Matsukawa, M. Kumada, M. Takahashi, M. Matsuda, N. Ouchi, S. Kihara, T. Kawamoto, S. Sumitsuji, T. Funahashi, und Y. Matsuzawa. 2002. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 51:2325-8.
- Kretowski, A., K. Gugala, A. Okruszko, N. Wawrusiewicz-Kurylonek, und M. Górska. 2005. Single Nucleotide Polymorphisms in exon 3 of the adiponectin gene in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Rocz Akad Med Bialymst*. 50:148-50.
- Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, M. Moroi, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, P. Froguel, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, und T. Noda. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*. 277:25863-6.
- Kumada, M., S. Kihara, S. Sumitsuji, T. Kawamoto, S. Matsumoto, N. Ouchi, Y. Arita, Y. Okamoto, I. Shimomura, H. Hiraoka, T. Nakamura, T. Funahashi, und Y. Matsuzawa. 2003. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:85-9.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10:203-9.
- Lara-Castro, C., N. Luo, P. Wallace, R.L. Klein, und W.T. Garvey. 2006. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes*. 55:249-59.
- Laughlin, G.A., E. Barrett-Connor, und S. May. 2006. Sex-specific determinants of serum adiponectin in older adults: the role of endogenous sex hormones. *Int J Obes (Lond)*.
- Lawlor, D.A., G. Davey Smith, S. Ebrahim, C. Thompson, und N. Sattar. 2005. Plasma adiponectin levels are associated with insulin resistance, but do not predict future risk of coronary heart disease in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:5677-83.
- Legro, R.S., A.R. Kusanman, W.C. Dodson, und A. Dunaif. 1999. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 84:165-9.

- Li, L., G. Yang, Q. Li, Y. Tang, und K. Li. 2006. High-fat- and lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab.* 50:499-505.
- Li, Y., und M.A. Lazar. 2002. Differential gene regulation by PPARgamma agonist and constitutively active PPARgamma2. *Mol Endocrinol.* 16:1040-8.
- Lihn, A.S., B. Richelsen, S.B. Pedersen, S.B. Haugaard, G.S. Rathje, S. Madsbad, und O. Andersen. 2003. Increased expression of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E1072-80.
- Lin, H.V., J.Y. Kim, A. Poci, L. Rossetti, L. Shapiro, P.E. Scherer, und D. Accili. 2007. Adiponectin resistance exacerbates insulin resistance in insulin receptor transgenic knockout mice. *Diabetes.*
- Lindsay, R.S., T. Funahashi, R.L. Hanson, Y. Matsuzawa, S. Tanaka, P.A. Tataranni, W.C. Knowler, und J. Krakoff. 2002. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet.* 360:57-8.
- Lindsay, R.S., H.E. Resnick, J. Zhu, M.L. Tun, B.V. Howard, Y. Zhang, J. Yeh, und L.G. Best. 2005. Adiponectin and coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:e15-6.
- Liu, Y., M.D. Michael, S. Kash, W.R. Bensch, B.P. Monia, S.F. Murray, K.A. Otto, S.K. Syed, S. Bhanot, K.W. Sloop, J.M. Sullivan, und A. Reifel-Miller. 2007. Deficiency of adiponectin receptor 2 reduces diet-induced insulin resistance but promotes type 2 diabetes. *Endocrinology.* 148:683-92.
- Lord, J., R. Thomas, B. Fox, U. Acharya, und T. Wilkin. 2006. The central issue? Visceral fat mass is a good marker of insulin resistance and metabolic disturbance in women with polycystic ovary syndrome. *Bjog.* 113:1203-9.
- Ma, K., A. Cabrero, P.K. Saha, H. Kojima, L. Li, B.H. Chang, A. Paul, und L. Chan. 2002. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem.* 277:34658-61.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, und K. Matsubara. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 221:286-9.
- Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi, und Y. Matsuzawa. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.* 8:731-7.
- Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura, und Y. Matsuzawa. 2001. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 50:2094-9.
- Matsubara, M., S. Maruoka, und S. Katayose. 2002. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2764-9.
- Matsubara, M., K. Namioka, und S. Katayose. 2003. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with low-grade C-reactive protein elevation. *Eur J Endocrinol.* 148:657-62.
- Matsuda, M., und R.A. DeFronzo. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 22:1462-70.
- Matsuzawa, Y., T. Funahashi, S. Kihara, und I. Shimomura. 2004. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:29-33.

- Matthews, D.R., J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, und R.C. Turner. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28:412-9.
- Menzaghi, C., T. Ercolino, L. Salvemini, A. Coco, S.H. Kim, G. Fini, A. Doria, und V. Trischitta. 2004. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. *Physiol Genomics*. 19:170-4.
- Möhlig, M., U. Wegewitz, M. Osterhoff, F. Isken, M. Ristow, A.F. Pfeiffer, und J. Spranger. 2002. Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Horm Metab Res*. 34:655-8.
- Monzillo, L.U., und O. Hamdy. 2003. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev*. 61:397-412.
- Moore, G.B., H. Chapman, J.C. Holder, C.A. Lister, V. Piercy, S.A. Smith, und J.C. Clapham. 2001. Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 286:735-41.
- Mori, Y., S. Otabe, C. Dina, K. Yasuda, C. Populaire, C. Lecoeur, V. Vatin, E. Durand, K. Hara, T. Okada, K. Tobe, P. Boutin, T. Kadowaki, und P. Froguel. 2002. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate Loci on 7p and 11p. *Diabetes*. 51:1247-55.
- Morin-Papunen, L.C., I. Vauhkonen, R.M. Koivunen, A. Ruokonen, und J.S. Tapanainen. 2000. Insulin sensitivity, insulin secretion, and metabolic and hormonal parameters in healthy women and women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 15:1266-74.
- Mousavinasab, F., T. Tahtinen, J. Jokelainen, P. Koskela, M. Vanhala, J. Oikarinen, S. Keinanen-Kiukaanniemi, und M. Laakso. 2006. Common polymorphisms (single-nucleotide polymorphisms SNP+45 and SNP+276) of the adiponectin gene regulate serum adiponectin concentrations and blood pressure in young Finnish men. *Mol Genet Metab*. 87:147-51.
- Moustaid, N., K. Sakamoto, S. Clarke, R.S. Beyer, und H.S. Sul. 1993. Regulation of fatty acid synthase gene transcription. Sequences that confer a positive insulin effect and differentiation-dependent expression in 3T3-L1 preadipocytes are present in the 332 bp promoter. *Biochem J*. 292 (Pt 3):767-72.
- Muoio, D.M., K. Seefeld, L.A. Witters, und R.A. Coleman. 1999. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*. 338 (Pt 3):783-91.
- Naderali, E.K., D. Estadella, M. Rocha, L.C. Pickavance, S. Fatani, R.G. Denis, und G. Williams. 2003. A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin Sci (Lond)*. 105:403-8.
- Nakamura, Y., K. Shimada, D. Fukuda, Y. Shimada, S. Ehara, M. Hirose, T. Kataoka, K. Kamimori, S. Shimodozono, Y. Kobayashi, M. Yoshiyama, K. Takeuchi, und J. Yoshikawa. 2004. Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart*. 90:528-33.
- Nakano, Y., T. Tobe, N.H. Choi-Miura, T. Mazda, und M. Tomita. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)*. 120:803-12.
- Nakashima, R., N. Kamei, K. Yamane, S. Nakanishi, A. Nakashima, und N. Kohno. 2006. Decreased total and high molecular weight adiponectin are independent risk factors for the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:3873-7.

- Nawrocki, A.R., M.W. Rajala, E. Tomas, U.B. Pajvani, A.K. Saha, M.E. Trumbauer, Z. Pang, A.S. Chen, N.B. Ruderman, H. Chen, L. Rossetti, and P.E. Scherer. 2006. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem.* 281:2654-60.
- Nestler, J.E. 2002. Should patients with polycystic ovarian syndrome be treated with metformin?: an enthusiastic endorsement. *Hum Reprod.* 17:1950-3.
- Ng, T.W., G.F. Watts, M.S. Farvid, D.C. Chan, and P.H. Barrett. 2005. Adipocytokines and VLDL metabolism: independent regulatory effects of adiponectin, insulin resistance, and fat compartments on VLDL apolipoprotein B-100 kinetics? *Diabetes.* 54:795-802.
- Nguyen, M.T., H. Satoh, S. Favelyukis, J.L. Babendure, T. Imamura, J.I. Sbodio, J. Zalevsky, B.I. Dahiyat, N.W. Chi, and J.M. Olefsky. 2005. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 280:35361-71.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2002. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes.* 51:2734-41.
- Okada, T., E. Saito, Y. Kuromori, M. Miyashita, F. Iwata, M. Hara, and K. Harada. 2006. Relationship between serum adiponectin level and lipid composition in each lipoprotein fraction in adolescent children. *Atherosclerosis.* 188:179-83.
- Okamoto, Y., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and P. Libby. 2006. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 110:267-78.
- Orio, F., Jr., S. Palomba, T. Cascella, G. Milan, R. Mioni, C. Pagano, F. Zullo, A. Colao, G. Lombardi, and R. Vettor. 2003. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:2619-23.
- Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, T. Nakamura, M. Nishida, M. Kumada, Y. Okamoto, K. Ohashi, H. Nagaretani, K. Kishida, H. Nishizawa, N. Maeda, H. Kobayashi, H. Hiraoka, and Y. Matsuzawa. 2003. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 107:671-4.
- Page, S.T., K.L. Herbst, J.K. Amory, A.D. Coviello, B.D. Anawalt, A.M. Matsumoto, and W.J. Bremner. 2005. Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men. *J Androl.* 26:85-92.
- Pajvani, U.B., X. Du, T.P. Combs, A.H. Berg, M.W. Rajala, T. Schulthess, J. Engel, M. Brownlee, and P.E. Scherer. 2003. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem.* 278:9073-85.
- Pajvani, U.B., M. Hawkins, T.P. Combs, M.W. Rajala, T. Doebber, J.P. Berger, J.A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A.H. Xiang, K.M. Utzschneider, S.E. Kahn, J.M. Olefsky, T.A. Buchanan, and P.E. Scherer. 2004. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.* 279:12152-62.
- Panidis, D., A. Kourtis, D. Farmakiotis, T. Mouslech, D. Rousso, and G. Koliakos. 2003. Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 18:1790-6.
- Park, K.G., K.S. Park, M.J. Kim, H.S. Kim, Y.S. Suh, J.D. Ahn, K.K. Park, Y.C. Chang, and I.K. Lee. 2004. Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution. *Diabetes Res Clin Pract.* 63:135-42.
- Peake, P.W., A.D. Kriketos, L.V. Campbell, Y. Shen, and J.A. Charlesworth. 2005. The metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects and in experimental animals. *Eur J Endocrinol.* 153:409-17.

- Pellmé, F., U. Smith, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, H. Brekke, O. Wiklund, M.R. Taskinen, und P.A. Jansson. 2003. Circulating adiponectin levels are reduced in nonobese but insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 52:1182-6.
- Pereira, R.I., und B. Draznin. 2005. Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway leads to decreased insulin-stimulated adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism*. 54:1636-43.
- Petrone, A., S. Zavarella, A. Caiazzo, G. Leto, M. Spoletini, S. Potenziani, J. Osborn, A. Vania, und R. Buzzetti. 2006. The promoter region of the adiponectin gene is a determinant in modulating insulin sensitivity in childhood obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 14:1498-504.
- Phillips, S.A., T.P. Ciaraldi, A.P. Kong, R. Bandukwala, V. Aroda, L. Carter, S. Baxi, S.R. Mudaliar, und R.R. Henry. 2003. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes*. 52:667-74.
- Pollin, T.I., K. Tanner, R. O'Connell J, S.H. Ott, C.M. Damcott, A.R. Shuldiner, J.C. McLenithan, und B.D. Mitchell. 2005. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene. *Diabetes*. 54:268-74.
- Populaire, C., Y. Mori, C. Dina, F. Vasseur, M. Vaxillaire, T. Kadowaki, und P. Froguel. 2003. Does the -11377 promoter variant of APM1 gene contribute to the genetic risk for Type 2 diabetes mellitus in Japanese families? *Diabetologia*. 46:443-5.
- Prober, J.M., G.L. Trainor, R.J. Dam, F.W. Hobbs, C.W. Robertson, R.J. Zagursky, A.J. Cocuzza, M.A. Jensen, und K. Baumeister. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*. 238:336-41.
- Qi, L., A. Doria, J.E. Manson, J.B. Meigs, D. Hunter, C.S. Mantzoros, und F.B. Hu. 2006. Adiponectin genetic variability, plasma adiponectin, and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 55:1512-6.
- Rasmussen, M.S., A.S. Lihn, S.B. Pedersen, J.M. Bruun, M. Rasmussen, und B. Richelsen. 2006. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity (Silver Spring)*. 14:28-35.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, und N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-4.
- Saito, K., T. Tobe, M. Yoda, Y. Nakano, N.H. Choi-Miura, und M. Tomita. 1999. Regulation of gelatin-binding protein 28 (GBP28) gene expression by C/EBP. *Biol Pharm Bull*. 22:1158-62.
- Salani, B., L. Briatore, G. Andraghetti, G.F. Adami, D. Maggi, und R. Cordera. 2006. High-molecular weight adiponectin isoforms increase after biliopancreatic diversion in obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 14:1511-4.
- Sanger, F., S. Nicklen, und A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Sattar, N., G. Wannamethee, N. Sarwar, J. Tchernova, L. Cherry, A.M. Wallace, J. Danesh, und P.H. Whincup. 2006. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation*. 114:623-9.
- Scherer, P.E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, und H.F. Lodish. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 270:26746-9.
- Schulze, M.B., A. Kroke, M.M. Bergmann, und H. Boeing. 2000. Differences of blood pressure estimates between consecutive measurements on one occasion: implications for inter-study comparability of epidemiologic studies. *Eur J Epidemiol*. 16:891-8.
- Schwarz, P.E., G.W. Towers, S. Fischer, S. Govindarajalu, J. Schulze, S.R. Bornstein, M. Hanefeld, und F. Vasseur. 2006. Hypoadiponectinemia is associated with

- progression toward type 2 diabetes and genetic variation in the ADIPOQ gene promoter. *Diabetes Care*. 29:1645-50.
- Semple, R.K., N.H. Halberg, K. Burling, M.A. Soos, T. Schraw, J. Luan, E.K. Cochran, D.B. Dunger, N.J. Wareham, P.E. Scherer, P. Gorden, und S. O'Rahilly. 2007. Paradoxical elevation of high-molecular weight adiponectin in acquired extreme insulin resistance due to insulin receptor antibodies. *Diabetes*. 56:1712-7.
- Seo, J.B., H.M. Moon, M.J. Noh, Y.S. Lee, H.W. Jeong, E.J. Yoo, W.S. Kim, J. Park, B.S. Youn, J.W. Kim, S.D. Park, und J.B. Kim. 2004. Adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element-binding protein 1c regulates mouse adiponectin expression. *J Biol Chem*. 279:22108-17.
- Smith, C.L., und G.L. Hager. 1997. Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J Biol Chem*. 272:27493-6.
- Snehalatha, C., B. Mukesh, M. Simon, V. Viswanathan, S.M. Haffner, und A. Ramachandran. 2003. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care*. 26:3226-9.
- Snijder, M.B., R.J. Heine, J.C. Seidell, L.M. Bouter, C.D. Stehouwer, G. Nijpels, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, I. Shimomura, und J.M. Dekker. 2006a. Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study. *Diabetes Care*. 29:2498-503.
- Snijder, M.B., R.M. van Dam, M. Visser, und J.C. Seidell. 2006b. What aspects of body fat are particularly hazardous and how do we measure them? *Int J Epidemiol*. 35:83-92.
- Soncini, M., S.F. Yet, Y. Moon, J.Y. Chun, und H.S. Sul. 1995. Hormonal and nutritional control of the fatty acid synthase promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*. 270:30339-43.
- Spiegelman, B.M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 47:507-14.
- Spranger, J., A. Kroke, M. Möhlig, M.M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing, und A.F. Pfeiffer. 2003. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 361:226-8.
- Spranger, J., M. Möhlig, U. Wegewitz, M. Ristow, A.F. Pfeiffer, T. Schill, H.W. Schloesser, G. Brabant, und C. Schöfl. 2004. Adiponectin is independently associated with insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 61:738-46.
- Statnick, M.A., L.S. Beavers, L.J. Conner, H. Corominola, D. Johnson, C.D. Hammond, R. Rafaeloff-Phail, T. Seng, T.M. Suter, J.P. Sluka, E. Ravussin, R.A. Gadski, und J.F. Caro. 2000. Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res*. 1:81-8.
- Swarbrick, M.M., I.T. Austrheim-Smith, K.L. Stanhope, M.D. Van Loan, M.R. Ali, B.M. Wolfe, und P.J. Havel. 2006. Circulating concentrations of high-molecular-weight adiponectin are increased following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Diabetologia*. 49:2552-8.
- Takahashi, M., Y. Arita, K. Yamagata, Y. Matsukawa, K. Okutomi, M. Horie, I. Shimomura, K. Hotta, H. Kuriyama, S. Kihara, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, und Y. Matsuzawa. 2000. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24:861-8.
- Tan, G.D., C. Debar, T. Funahashi, S.M. Humphreys, Y. Matsuzawa, K.N. Frayn, F. Karpe, und H. Vidal. 2005. Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia*. 48:1585-9.
- Tankó, L.B., A. Siddiq, C. Lecoeur, P.J. Larsen, C. Christiansen, A. Walley, und P. Froguel. 2005. ACDC/adiponectin and PPAR-gamma gene polymorphisms: implications for features of obesity. *Obes Res*. 13:2113-21.

- Tilg, H., und A.R. Moschen. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6:772-83.
- Tilg, H., und A.M. Wolf. 2005. Adiponectin: a key fat-derived molecule regulating inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* 9:245-51.
- Tonelli, J., W. Li, P. Kishore, U.B. Pajvani, E. Kwon, C. Weaver, P.E. Scherer, und M. Hawkins. 2004. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes.* 53:1621-9.
- Tsao, T.S., E. Tomas, H.E. Murrey, C. Hug, D.H. Lee, N.B. Ruderman, J.E. Heuser, und H.F. Lodish. 2003. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 278:50810-7.
- Tschritter, O., A. Fritsche, C. Thamer, M. Haap, F. Shirkavand, S. Rahe, H. Staiger, E. Maerker, H. Häring, und M. Stumvoll. 2003. Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes.* 52:239-43.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M. Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai, und T. Kadowaki. 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem.* 279:30817-22.
- Valsamakis, G., R. Chetty, P.G. McTernan, N.M. Al-Daghri, A.H. Barnett, und S. Kumar. 2003. Fasting serum adiponectin concentration is reduced in Indo-Asian subjects and is related to HDL cholesterol. *Diabetes Obes Metab.* 5:131-5.
- Vasseur, F., N. Helbecque, C. Dina, S. Lobbens, V. Delannoy, S. Gaget, P. Boutin, M. Vaxillaire, F. Lepretre, S. Dupont, K. Hara, K. Clément, B. Bihain, T. Kadowaki, und P. Froguel. 2002. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 11:2607-14.
- Vasseur, F., N. Helbecque, S. Lobbens, V. Vasseur-Delannoy, C. Dina, K. Clément, P. Boutin, T. Kadowaki, P.E. Scherer, und P. Froguel. 2005. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. *Diabetologia.* 48:892-9.
- Vasseur, F., F. Lepretre, C. Lacquemant, und P. Froguel. 2003. The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep.* 3:151-8.
- Vionnet, N., H. Hani El, S. Dupont, S. Gallina, S. Francke, S. Dotte, F. De Matos, E. Durand, F. Lepretre, C. Lecoeur, P. Gallina, L. Zekiri, C. Dina, und P. Froguel. 2000. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 67:1470-80.
- von Eynatten, M., J.G. Schneider, P.M. Humpert, G. Rudofsky, N. Schmidt, P. Barosch, A. Hamann, M. Morcos, J. Kreuzer, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, und K.A. Dugi. 2004. Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: an association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care.* 27:2925-9.
- Vozarova, B., N. Stefan, R.S. Lindsay, J. Krakoff, W.C. Knowler, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Stumvoll, C. Weyer, und P.A. Tataranni. 2002. Low plasma adiponectin concentrations do not predict weight gain in humans. *Diabetes.* 51:2964-7.

- Vojarova de Courten, B., R.L. Hanson, T. Funahashi, R.S. Lindsay, Y. Matsuzawa, S. Tanaka, F. Thameem, J.D. Gruber, P. Froguel, und J.K. Wolford. 2005. Common Polymorphisms in the Adiponectin Gene ACDC Are Not Associated With Diabetes in Pima Indians. *Diabetes*. 54:284-9.
- Waki, H., T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Ito, S. Uchida, S. Kita, K. Hara, Y. Hada, F. Vasseur, P. Froguel, S. Kimura, R. Nagai, und T. Kadowaki. 2003. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*. 278:40352-63.
- Wang, Y., K.S. Lam, J.Y. Xu, G. Lu, L.Y. Xu, G.J. Cooper, und A. Xu. 2005. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem*. 280:18341-7.
- Wang, Y., A. Xu, C. Knight, L.Y. Xu, und G.J. Cooper. 2002. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem*. 277:19521-9.
- Weiss, R., S.E. Taksali, und S. Caprio. 2006. Development of type 2 diabetes in children and adolescents. *Curr Diab Rep*. 6:182-7.
- Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R.E. Pratley, und P.A. Tataranni. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:1930-5.
- Whitehead, J.P., A.A. Richards, I.J. Hickman, G.A. Macdonald, und J.B. Prins. 2006. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 8:264-80.
- Woo, J.G., L.M. Dolan, R. Deka, R.D. Kaushal, Y. Shen, P. Pal, S.R. Daniels, und L.J. Martin. 2006. Interactions between noncontiguous haplotypes in the adiponectin gene ACDC are associated with plasma adiponectin. *Diabetes*. 55:523-9.
- Xu, A., K.W. Chan, R.L. Hoo, Y. Wang, K.C. Tan, J. Zhang, B. Chen, M.C. Lam, C. Tse, G.J. Cooper, und K.S. Lam. 2005. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem*. 280:18073-80.
- Yamamoto, Y., H. Hirose, I. Saito, K. Nishikai, und T. Saruta. 2004. Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: two-year follow-up study in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:87-90.
- Yamamoto, Y., H. Hirose, I. Saito, M. Tomita, M. Taniyama, K. Matsubara, Y. Okazaki, T. Ishii, K. Nishikai, und T. Saruta. 2002. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)*. 103:137-42.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N.H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, und T. Kadowaki. 2003a. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 423:762-9.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, und T. Kadowaki. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 8:1288-95.
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Imai, N. Shimosawa, K. Hioki, S. Uchida, Y. Ito, K. Takakuwa, J. Matsui, M. Takata, K. Eto, Y. Terauchi, K. Komeda, M. Tsunoda, K. Murakami, Y. Ohnishi, T. Naitoh, K. Yamamura, Y. Ueyama, P. Froguel, S.

- Kimura, R. Nagai, und T. Kadowaki. 2003b. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem.* 278:2461-8.
- Yamauchi, T., J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C. Vinson, M.L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, und T. Kadowaki. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med.* 7:941-6.
- Yamauchi, T., Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, und T. Kadowaki. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 13:332-9.
- Yang, W.S., und L.M. Chuang. 2006. Human genetics of adiponectin in the metabolic syndrome. *J Mol Med.* 84:112-21.
- Yang, W.S., C.Y. Jeng, T.J. Wu, S. Tanaka, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, J.P. Wang, C.L. Chen, T.Y. Tai, und L.M. Chuang. 2002. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 25:376-80.
- Yang, W.S., W.J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, C.L. Chao, C.L. Chen, T.Y. Tai, und L.M. Chuang. 2001. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:3815-9.
- Yaturu, S., R.P. Daberry, J. Rains, und S. Jain. 2006. Resistin and adiponectin levels in subjects with coronary artery disease and type 2 diabetes. *Cytokine.* 34:219-23.
- Yu, J.G., S. Javorschi, A.L. Hevener, Y.T. Kruszynska, R.A. Norman, M. Sinha, und J.M. Olefsky. 2002. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 51:2968-74.
- Zagursky, R.J., und R.M. McCormick. 1990. DNA sequencing separations in capillary gels on a modified commercial DNA sequencing instrument. *Biotechniques.* 9:74-9.
- Zhang, J., H. Holt, C. Wang, O.H. Hadid, und C.D. Byrne. 2005. Expression of AdipoR1 in vivo in skeletal muscle is independently associated with measures of truncal obesity in middle-aged caucasian men. *Diabetes Care.* 28:2058-60.
- Zimmet, P., K.G. Alberti, und J. Shaw. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 414:782-7.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde von mir bisher an keiner anderen Hochschule zum Zwecke der Promotion eingereicht.

Uta Wegewitz