

Identifikation von Resistin und Progranulin als liquorgängige Adipokine

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hochberg, Alexandra Melanie
aus Karlsruhe

Gießen 2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III,
unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schäffler,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thilo Jakob

Tag der Disputation: 15.05.2019

Vorbemerkung:

Wichtige Teile dieser Arbeit konnten mit mir als Ko-Autorin in 3 internationalen, Peer-gereviewten Journalen publiziert werden (s. Seite 127, Persönliches Publikationsverzeichnis).

1. Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. Berghoff M, **Hochberg A**, Schmid A et al. (2016) **European journal of clinical investigation 46:15–26**. [18]
2. Quantification and regulation of adiponin in human cerebrospinal fluid (CSF). Schmid A, **Hochberg A**, Berghoff M et al. (2016) **Clinical endocrinology 84:194–202**. [128]
3. CTRP-3 is permeable to the blood-brain barrier and is not regulated by glucose or lipids in vivo. Schmid A, Berghoff M, **Hochberg A**, Schäffler A, Karrasch T (2017) **European journal of clinical investigation 47:203–212**. [127]

Teile dieser Arbeit wurden zweimal als Poster-Präsentation national vorgestellt, einmal ausgezeichnet als „Best of 100 Abstracts“.

1. Concentrations and regulation of adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. **Alexandra Hochberg**, Martin Berghoff, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Thomas Karrasch, Manfred Kaps, Andreas Schäffler
DGE in Lübeck (2015), **Postervorstellung**
2. Regulation of the adipokines resistin and progranulin in 3T3-L1 adipocytes. **Alexandra Hochberg**, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Thomas Karrasch, Andreas Schäffler
Endokrinologie DACH-Tagung in München (2016), **Postervorstellung**
Ausgezeichnet als „Best of 100 Abstracts“

Diese experimentelle Promotionsarbeit über 4 Jahre wurde durch ein Prägraduerten-Stipendium des Fachbereichs Medizin gefördert.

Identifikation von Resistin und Progranulin als liquorgängige Adipokine

I EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	4
I.1 Fettgewebe und Adipokine	4
I.2 Liquorgängige Adipokine	7
I.3 Resistin	8
I.3.1 Resistin in der Zellkultur	9
I.3.2 Resistin im Tiermodell.....	10
I.3.3 Resistin im humanen Organismus	11
I.4 Progranulin	12
I.4.1 Progranulin in der Zellkultur	13
I.4.2 Progranulin im Tiermodell	14
I.4.3 Progranulin im humanen Organismus	15
I.5 Zielsetzung der Arbeit	17
II MATERIAL UND METHODEN	18
II.1 Geräte, Materialien und Chemikalien	18
II.2 Das Studienkollektiv	20
II.3 Erstellung der SPSS-Datenbank	20
II.4 Bestimmung der Adipokin-Konzentrationen	23
II.4.1 Prinzip des ELISAs	24
II.4.2 Durchführung des ELISAs.....	24
II.5 Zellkulturversuche an der murinen Zelllinie 3T3-L1	25
II.5.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	26
II.5.2 Splitten und Aussäen der Zellen	26
II.5.3 Differenzierung der Zellen	27
II.5.4 Stimulation der Zellen	31
II.5.5 Zellernte.....	34
II.5.6 Proteinbestimmung der Zelllysate	35
II.5.6.1 Prinzip des BCA-Tests.....	35
II.5.6.2 Durchführung des BCA-Tests	35
II.5.7 Bestimmung der Zytotoxizität	35

II.5.7.1 Prinzip der LDH-Methode	36
II.5.7.2 Durchführung des LDH-Tests	36
II.5.8 Bestimmung der Adipokin-Konzentrationen aus Überständen.....	37
II.6 Statistische Auswertung.....	37
III ERGEBNISSE.....	38
III.1 Studienkollektiv.....	38
III.2 Resistin und Progranulin in Serum und Liquor.....	44
III.3 Ergebnisse der Zellkulturversuche.....	73
IV DISKUSSION.....	86
IV.1 Allgemeine Diskussion	86
IV.2 Spezielle Diskussion: Resistin	87
IV.3 Spezielle Diskussion: Progranulin	92
IV.4 Fazit und Ausblick	95
V ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	100
VI. VERZEICHNISSE	104
VI.1 Abkürzungsverzeichnis.....	104
VI.2 Abbildungsverzeichnis	106
VI.3 Tabellenverzeichnis.....	109
VI.4 Literaturverzeichnis.....	111
VI.5 Publikationsverzeichnis	127
VII. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	128
VIII. DANKSAGUNG	129
IX. LEBENS LAUF	130

X. ETHIKVOTUM.....	131
XI. PUBLIKATIONEN.....	132

I Einleitung und Zielsetzung

I.1 Fettgewebe und Adipokine

Das Fettgewebe wurde als Organ lange in seiner Funktion unterschätzt. Früher nahm man an, es handle sich lediglich um eine Möglichkeit der Insulin-abhängigen und Katecholamin-abhängigen Speicherung und Bereitstellung von Energiereserven in Form von Triglyceriden [85]. Spätestens aber mit der Entdeckung des Leptins, eines vom Fettgewebe eigens produzierten Peptidhormons, gehört diese Auffassung der Vergangenheit an [166]. Das Fettgewebe besitzt über die Sekretion diverser Faktoren die Fähigkeit in verschiedene Regelkreise des Körpers einzugreifen [85]. Hierunter sind vor allem der Glukose- und Lipidstoffwechsel, das Komplementsystem, das Entzündungsgeschehen, sowie die Regulation von Appetit und Sättigung, außerdem die Regulation von Knochen- und Immunfunktion aufzuführen [153].

Das Fettgewebe besteht aus verschiedenen Zellarten. Hierbei sind insbesondere Adipozyten, Prä-Adipozyten, Makrophagen, Lymphozyten, mesenchymale Stammzellen und Endothelzellen zu nennen, wobei die Lokalisation des Fettgewebes einen Einfluss auf dessen Zusammensetzung hat [22]. So finden sich zum Beispiel im viszeralen Fettgewebe prozentual weniger Adipozyten als im subkutanen Fettgewebe [22], [25], [63]. Die Morphologie und Zusammensetzung des Fettgewebes kann sich je nach Ernährungszustand ändern. So kommt es zum Beispiel im Rahmen der Entwicklung der Adipositas zu einer Adipozytenhypertrophie und zu einer Zunahme und Akkumulation von Makrophagen durch Einwanderung aus dem Blutkompartiment [154].

Die von Adipozyten spezifisch produzierten und sezernierten Proteine werden Adipokine genannt [143]. Die Gesamtheit aller Proteine, die von Adipozyten sezerniert werden, bezeichnet man als Adipokinom [143]. Von Adipozyten werden neben Proteinen auch Lipide und freie Fettsäuren freigesetzt [143]. Die Gesamtheit aller von Adipozyten produzierten Faktoren ist als Sekretom definiert [143].

Außerdem besitzen Adipozyten eine Reihe von Rezeptoren, durch die diese auf hormonelle Reize reagieren können [59].

Im Rahmen der Adipositas kommt es zu einer Dysregulation der Adipokine [126] und des Fettgewebes [101]. Die Adipozyten schlanker Menschen sezernieren vornehmlich antiinflammatorische Adipokine, wie zum Beispiel Adiponektin [101]. Im Rahmen der Entwicklung der Adipositas kommt es zu einer Adipozytenhypertrophie sowie zu einer vermehrten Einwanderung aktivierter Makrophagen und T-Lymphozyten [101]. Hierdurch wird die metabolische Funktion des Fettgewebes gestört und die Adipozyten sezernieren neben antiinflammatorischen auch proinflammatorische Adipokine, wie zum Beispiel Leptin, Resistin, Il-6 (*Interleukin 6*) oder TNF (*Tumornekrosefaktor*) [101]. Mit

zunehmendem inflammatorischen Milieu verlieren die Adipozyten ihre physiologische metabolische Funktion und es kommt zur Adipozytennekrose [101].

Adipositas ist ein Risikofaktor für eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen [80], [148], [86], [52], [134]. Insbesondere stellt Adipositas ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung der Volkskrankheit Diabetes mellitus Typ II dar, von der aktuell etwa 425 Millionen Menschen weltweit betroffen sind [100]. Außerdem haben adipöse Menschen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko [41]. Da kardiovaskuläre Ereignisse aktuell an erster Stelle der Todesfallstatistik in Deutschland stehen [117], ist es von essentieller Bedeutung, die genauen Regulationsmechanismen zu verstehen und gegebenenfalls therapeutische Möglichkeiten zu entwickeln, in diese einzugreifen.

Bisher sind über 50 verschiedene Adipokine bekannt [136]. Im Folgenden werden nur die bisher bedeutendsten Adipokine beispielhaft genannt, wobei Resistin und Progranulin später genauer betrachtet werden sollen.

Leptin spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiestoffwechsels [85]. Die Leptin-Spiegel steigen mit dem BMI (*body mass index*) [1]. Ein genetisch determinierter Leptinmangel verursacht eine Hyperphagie und führt zu massiver frühkindlicher Adipositas, die durch Gabe von rekombinantem Leptin reversibel ist [37]. Leptin-Rezeptoren befinden sich im Gehirn, in verschiedenen peripheren Geweben [85], sowie im Fettgewebe [22]. Im Fettgewebe befinden sich diese auf Adipozyten, Endothelzellen und Makrophagen, weshalb eine autokrine, parakrine und endokrine Wirkungsweise angenommen wird [22]. Die Regulation des Appetits über Leptin erfolgt über Rezeptoren im Hypothalamus [108]. Leptin ist ein klassisches Sättigungshormon, indem es im Hypothalamus die Synthese und Freisetzung des orektigenen Peptids Neuropeptid Y hemmt [3]. Die Ernährung spielt eine entscheidende Rolle in der Leptin-Sekretion. So können zum Beispiel bei Ratten eine Hyperleptinämie und Adipositas durch eine fettreiche Diät induziert werden, allerdings wird gleichzeitig eine Leptin-Resistenz induziert, sodass keine Appetithemmung erfolgen kann [144].

Ein weiteres wichtiges Adipokin ist Adiponektin [125]. Für Adiponektin wurden antiinflammatorische Effekte in verschiedenen Tiermodellen [139], sowie ein positiver Einfluss auf die Insulinsensitivität gezeigt [64]. Die Adiponektin-Spiegel im humanen Serum sind umso niedriger, je höher der BMI und die Menge an viszeralem Fettgewebe der Person ist [30], also gegenläufig zum Leptin [1]. Erniedrigte Adiponektin-Spiegel erhöhen das Risiko für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen [64].

Visfatin wird vorrangig vom viszeralen Fettgewebe produziert und korreliert direkt mit dessen Größe [4]. Über die steigernde Glukoseaufnahme in Adipozyten und Myozyten

hat es einen Glukose-senkenden Effekt, der insulinunabhängig ist [4]. Bei Rauchern korreliert Visfatin im Serum positiv mit dem BMI [21].

Adipsin ist ein Adipokin, das im Tiermodell die Glukosetoleranz verbessern und die Funktion der β -Zellen positiv beeinflussen kann [78]. Die Konzentration im Serum ist abhängig von der Ernährung, wobei die Konzentration unter fettreicher Diät sinkt [78]. Außerdem ist es identisch mit dem Komplement-Faktor D, wodurch es eine direkte Verbindung zwischen dem Glukosemetabolismus und dem Immunsystem darstellt [156]. Durch eine Interaktion von C3, Faktor D und Faktor B wird C3a-des-Arg gebildet, welches als so genanntes ASP (*acylation stimulating protein*) das Enzym Di-acyl-glycerin-acyl-transferase stimuliert (als Kofaktor) und somit den letzten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Triglyceridbiosynthese steuert [13]. Des Weiteren haben Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose erhöhte Adipsin-Konzentrationen im Liquor und Adipsin könnte eine Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen [81].

CTRP-3 (*C1q/TNF-related protein-3*) ist ein antiinflammatorisches Adipokin [66], das vor allem vom viszeralen Fettgewebe produziert wird [48]. CTRP-3 wirkt LPS-antagonistisch in vitro und in vivo [129]. In der Zellkultur mit 3T3-L1 Adipozyten kann CTRP-3 die Sekretion anderer Adipokine beeinflussen [77] und die Insulinsensitivität verbessern [76]. Die Konzentration im Serum beim Menschen ist assoziiert mit der Insulinresistenz [35]. Außerdem liegen bei Menschen mit Adipositas oder arterieller Hypertonie verminderte Serumspiegel vor [35].

Adipozyten produzieren unter anderem auch proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α (*Tumornekrosefaktor α*) [42], IL-6, IL-8 (*Interleukin 8*) [36] und MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) [121].

Bisher sind viele Erkrankungen bekannt, die mit einer veränderten Regulation der Adipokine einhergehen. Die genauen Mechanismen und die Auswirkungen dieser Veränderungen sind bisher jedoch weitgehend ungeklärt. Es gibt eine Vielzahl von Adipokinen, die eine Verbindung zwischen dem Stoffwechsel und dem Immunsystem darstellen, wie zum Beispiel Leptin, Adiponektin, Visfatin, Resistin TNF- α , IL-6, MCP-1 [155] oder Adipsin [156].

Zum Beispiel zeigt sich im Rahmen der Adipositas, als eines Zustandes chronischer low-grade Entzündung [106], eine gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Fettgewebe und es kommt hier zu einer Zunahme der Makrophagen [158]. Auch die Expression von Adipokinen ändert sich während der Entwicklung einer Adipositas [75]. Übergewichtige Menschen haben erhöhte Entzündungsparameter wie CRP (*C-reaktives Protein*), Leukozyten, IL-6 und TNF- α , insbesondere bei zentraler Adipositas [105]. Diabetes mellitus Typ II ist das Resultat dieser chronischen

Entzündung [155], [106], dessen Entstehung durch verschiedene Adipokine beeinflusst wird. Hierbei spielen unter anderem erhöhte Spiegel von TNF- α [50] und MCP-1 [121] sowie erniedrigte Adiponektin-Werte [153] eine Rolle.

Auch kardiovaskuläre Erkrankungen werden durch dieses Entzündungsgeschehen gefördert [155] und durch Adipokine beeinflusst. Während Adiponektin eher antisklerotische Effekte aufweist [5], hat zum Beispiel IL-6 [165] eher prosklerotische Effekte.

Die NASH (*nichtalkoholische Steatohepatitis*) kann ebenfalls Folge dieses Entzündungsgeschehens sein und wird durch Adiponektin gehemmt, während sie durch TNF- α und IL-6 verstärkt wird [136].

Adipokine wie Leptin, Resistin und Adiponektin scheinen auch eine bisher noch ungeklärte Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis [94], [68] oder Lupus Erythematodes zu spielen [68].

Ebenso sind die Adipokine Adiponektin und Resistin bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verändert [56].

Das Fettgewebe und die Adipokine stellen also ein entscheidendes Bindeglied verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse dar, weshalb der Erforschung der Funktions- und Regulationsmechanismen dieser eine wichtige Bedeutung zu Teil wird.

I.2 Liquorgängige Adipokine

Einige Adipokine vermitteln nicht nur eine Kommunikation zwischen dem Fettgewebe und peripheren Organen, sondern auch eine Kommunikation zwischen dem Fettgewebe und dem zentralen Nervensystem, wodurch sie neuroendokrine Funktionen besitzen [104], [54]. Die Bluthirnschranke spielt hierbei eine entscheidende Rolle [16], da diese für die Selektion der Moleküle, die vom Blut in das zentrale Nervensystem übergehen, verantwortlich ist [132].

Das am besten untersuchte Adipokin, das die Bluthirnschranke überquert, ist Leptin. Es beeinflusst die Nahrungsaufnahme und die Thermoregulation über hypothalamische Zentren [144], [54]. Leptin wird durch einen aktiven Transport über die Bluthirnschranke transportiert [168]. Im Rahmen der Diät-induzierten Adipositas steigen die Serum- und Liquorkonzentrationen von Leptin konkordant an, bis ein Sättigungsniveau der Leptin-Konzentration im Liquor erreicht ist [144]. Oberhalb dieses Sättigungsniveaus kommt es zu einer Störung der Leptinfunktion [144].

Adiponektin ist ebenfalls im Liquor nachweisbar [95], allerdings ist die Konzentration im Liquor um etwa den Faktor 1000 geringer als im Serum [67], [95], [70]. Adiponektin-Rezeptoren befinden sich im Hypothalamus [67] und in der Area postrema [38]. Über die

Area postrema kann zentrales Adiponektin, wie im Tierversuch gezeigt, einen Einfluss auf den peripheren Blutdruck nehmen [38]. Über den Hippocampus scheint es einen antidepressiven Effekt zu haben [161]. Des Weiteren wird ein Einfluss des Adiponektins auf entzündliche und regenerative Prozesse des Gehirns vermutet [95].

Weitere Adipokine konnten in kleineren Studien an Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im Liquor nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von Visfatin im Liquor wurde zum Beispiel bei Patienten mit Fibromyalgie [21] und das Vorhandensein von Adipsin im Liquor bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose [81] nachgewiesen. Des Weiteren sind veränderte Konzentrationen von Adipokinen im Liquor nach cerebralen Krampfanfällen nachweisbar. Der Pathomechanismus hierfür ist jedoch noch nicht geklärt [10], [103].

Adipokine haben also einen weitreichenden Einfluss auf das zentrale Nervensystem [8]. Die veränderten Serumkonzentrationen der Adipokine im Rahmen der Adipositas wirken sich auf den Übertritt dieser über die Bluthirnschranke aus [104], [107]. Auch könnte dies die Ursache für das erhöhte Risiko der Entwicklung dementieller Erkrankungen bei Adipositas sein [8].

Bei vielen Adipokinen ist es jedoch bisher nicht bekannt, ob und wie sie mit dem zentralen Nervensystem des Menschen interagieren. Erkenntnisse hierüber könnten unser Verständnis über die systemische Rolle des Fettgewebes grundlegend verändern.

I.3 Resistin

Resistin ist ein Adipokin, das erstmals 2000 und 2001 von drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander beschrieben wurde.

Steppan et al. [135] konnten Resistin als ein von Adipozyten exprimiertes und sezerniertes Protein nachweisen. Die Expression von Resistin ist bei Mäusen spezifisch für das Fettgewebe und wurde im Serum von Mäusen und Ratten detektiert. Des Weiteren konnten sie ein homologes Protein beim Menschen nachweisen. Sie beschrieben Resistin als ein kausal für die Entwicklung der Insulinresistenz im Rahmen der Adipositas verantwortliches Protein und als ein potentiell neues Target für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II.

Kim et al. [62] entdeckten 2001 ein 12,5 kDa schweres, serin- und cysteinreiches Protein, das spezifisch vom Fettgewebe in Mäusen und Ratten sezerniert wird und nannten es ADSF (*adipose tissue-specific secretory factor*). Sie konnten eine Regulation der ADSF-Expression durch die Ernährung nachweisen. Da die ADSF-Expression während der Adipozyten-Differenzierung zunimmt, aber ADSF gleichzeitig die Adipozyten-

Differenzierung hemmt, vermuteten sie einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus von ADSF auf die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten.

Holcomb et al. [49] beschrieben Resistin erstmalig in einem anderen Zusammenhang. Sie entdeckten ein Protein, das in bronchialen und alveolären Epithelzellen exprimiert wird und dessen Expression im Rahmen von Entzündungen der Lunge zunimmt und bezeichneten es als FIZZ1 (*found in inflammatory zone 1*).

Einer der postulierten Rezeptoren für Resistin ist CAP1 (*Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1*) [72], über den Resistin die Transkription inflammatorischer Zytokine in Monozyten steigert [72]. Des Weiteren moduliert Resistin die Adipogenese von 3T3-L1 Präadipozyten über ROR1 (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*) [120]. Auch über eine Isoform des Decorin-Rezeptors beeinflusst Resistin die Adipogenese [33]. Resistin bindet TLR-4 (*Toll-like Receptor-4*) auf Leukozyten, Monozyten und Epithelzellen und induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine [138]. Außerdem kann es direkt an TLR-4 im Hypothalamus binden und darüber zentrale proinflammatorische Signalkaskaden aktivieren [17].

I.3.1 Resistin in der Zellkultur

Die murine Zelllinie der 3T3-L1 (Prä-)Adipozyten ist ein häufig verwendetes Modell zur Simulation der Reaktion von Adipozyten auf verschiedene Reize. Die Resistin-Expression in 3T3-L1 Adipozyten wird durch diverse Hormone, Zytokine und andere Einflussfaktoren reguliert [133]. Undifferenzierte Präadipozyten exprimieren noch kein Resistin [44]. Die Expression wird während der Adipozytendifferenzierung induziert [135] und ist erst 3 Tage nach deren Beginn nachweisbar [44].

Eine hohe extrazelluläre Glukosekonzentration sowie die Stimulation mit Dexamethason induzieren die Resistin-Expression [133], [44].

In humanen Adipozyten lässt sich die Glukoseaufnahme in die Zelle durch die Stimulation mit Resistin reduzieren [83]. Außerdem induziert Resistin die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-6 [69].

Stimuliert man humane Adipozyten mit LPS (*Lipopolysaccharid*), wird dadurch nicht nur die Expression von TNF- α [74], sondern auch die Resistin-Expression dosisabhängig induziert [74], [69]. Diese gesteigerte Resistin-Expression wird durch eine Kaskade inflammatorischer Zytokine verursacht [74].

Resistin induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine auch in Neutrophilen [53], in humanen Synoviozyten und humanen PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) [20], wie zum Beispiel TNF- α , IL-6 oder IL-1 β (*Interleukin 1 β*) [20]. Bei der Stimulation

von humanen PBMC mit TNF- α wird die Expression von Resistin im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus induziert [20].

Die Regulation von Resistin und seine Auswirkung auf den Glukosemetabolismus und auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine sind also eng miteinander verbunden [133].

I.3.2 Resistin im Tiermodell

Im Tiermodell können grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse über die Regulation und Funktion von Adipokinen in-vivo gewonnen werden. Insbesondere Experimente mit knock-out Tieren können einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der physiologischen Mechanismen beitragen. Dabei sind allerdings spezies-abhängige Unterschiede in beobachteten Effekten zu beachten.

Die Resistin-Expression lässt sich bei Mäusen vornehmlich im Fettgewebe nachweisen [44], [135]. Dabei zeigen sich ähnliche Expressionlevel im epididymalen, perirenalen und subkutanen Fettgewebe [44]. In Geweben wie der Leber, dem Skelettmuskel, dem Herz oder der Niere lässt sich keine Expression nachweisen [44]. Resistin wird bei Mäusen [135] und Ratten [7] überwiegend von Adipozyten produziert.

Im Mausmodell ist Resistin ein wichtiger Regulator des Glukosemetabolismus [15] und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Insulinresistenz, insbesondere in der Leber [64], [135]. Bei Ratten führt eine Hyperresistinämie zur Insulinresistenz in der Leber, dem Muskel und dem Fettgewebe [122]. Resistin verringert die Glukose-abhängige Insulinsekretion aus pankreatischen Inselzellen [92] und steigert die Glukoneogenese [90]. Außerdem sind die Gen-Expression von Resistin bei Ratten [75] und die Konzentration von Resistin im Serum bei Mäusen [62], [115] durch die Ernährung beeinflussbar.

Im atherosklerotischen Mausmodell wird eine erhöhte Resistin-Konzentration im Serum im Vergleich zu gesunden Tieren beobachtet [24]. Auch lässt sich direkt in den atherosklerotischen Läsionen bei diesen Mäusen Resistin immunhistochemisch nachweisen, was einen pathophysiologischen Zusammenhang nahe legt [24].

Im Gehirn von Mäusen lässt sich eine Expression von Resistin im Hypothalamus [157], im Kortex [88] und in der Hypophyse [88] nachweisen, wobei die Expression im Hypothalamus vom Ernährungszustand [157] und die Expression in der Hypophyse vom Entwicklungsgrad [88] der Mäuse abhängig ist.

Eine zentrale Resistin-Applikation führt bei Ratten zu einer peripheren Insulinresistenz [17] und moduliert die Nahrungsaufnahme [17], [142]. Außerdem führt dies zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine im Hypothalamus [17], in der

Leber [89] und im weißen Fettgewebe [149] und induziert die Expression von Enzymen der Fettsäuresynthese in der Leber [149].

Die Erkenntnisse aus Tierversuchen sollten allerdings nur mit Vorsicht auf den Menschen übertragen werden, da Adipokine teils unterschiedliche Eigenschaften insbesondere bei Nagern und Menschen aufweisen [7].

I.3.3 Resistin im humanen Organismus

Beim Menschen wird Resistin insbesondere von Monozyten [64], [34], [74] und Makrophagen [91] produziert. Die Expression in Adipozyten ist vorhanden [69], aber im Vergleich zur Expression in Monozyten eher gering [34].

Frauen haben eine höhere Resistin-Konzentration im Serum als Männer [160], wobei diese häufig mit dem Körperfettanteil [160] und mit dem BMI [124], [145] positiv korreliert. In manchen Studienkollektiven konnte jedoch keine direkte Assoziation zu dem BMI festgestellt werden [98]. In Gewebeproben des Fettgewebes ist eine höhere Konzentration der Resistin-mRNA bei adipösen im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen zu finden [34].

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Resistin-Konzentration im Serum bei Patienten mit metabolischem Syndrom erhöht ist [9], [6].

Ob Resistin beim Menschen, wie bei Mäusen gezeigt, pathophysiologisch für die Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ II verantwortlich ist oder primär immunmodulierende Eigenschaften besitzt, wird aktuell noch bei divergierender Studienlage kontrovers diskutiert [84].

In einigen Studien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Resistin-Konzentration im Serum und dem Vorhandensein eines Diabetes mellitus oder der Insulinsensitivität [83], [124], [2], [98]. In anderen Studien konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden [116], [145]. Allerdings sind Polymorphismen im humanen Resistin-Gen mit der Insulinsensitivität assoziiert [110].

Des Weiteren zeigte sich in einer Studie eine positive Korrelation der Resistin-Konzentration im Serum zur Höhe des systolischen Blutdrucks [98].

Der Zusammenhang des Resistins mit dem Fettstoffwechsel ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. In einigen Studienpopulationen finden sich positive Korrelationen der Resistin-Konzentration im Serum mit der Gesamtcholesterin- und der LDL-Cholesterin-Konzentration [9] und eine negative Korrelation mit der HDL-Cholesterin-Konzentration [6]. In einer anderen Studie konnte keine Korrelation zwischen der Resistin-Konzentration und Parametern des Fettstoffwechsels festgestellt werden [12]. Bei Patienten mit NAFLD (*nichtalkoholischer Fettlebererkrankung*) zeigte sich allerdings eine erhöhte Resistin-Konzentration im subkutanen Fettgewebe und im Serum [102].

Eindeutiger ist die Datenlage der Literatur bei inflammatorischen Prozessen. Die systemische Resistin-Konzentration korreliert positiv mit Entzündungsparametern, wie der Leukozytenzahl [6], CRP [98], MCP-1 [6], TNF- α [116] und IL-6 [116]. Resistin stellt im menschlichen Organismus ein proinflammatorisches Zytokin dar [91].

Resistin scheint beim Menschen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung zu spielen. Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit haben höhere Resistin-Spiegel im Serum als Gesunde [24]. In atherosklerotischen Bereichen aus menschlichen Karotiden lässt sich Resistin immunhistochemisch verstärkt nachweisen; in gesunden Arterien nicht [24]. Die Konzentration im Serum ist ein Prädiktor für die koronare Herzerkrankung [98], [2], [116].

Auch bei autoimmunen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, scheint Resistin eine Rolle zu spielen [23]. In der Synovialflüssigkeit der Gelenke von Patienten mit rheumatoider Arthritis ist eine höhere Resistin-Konzentration als bei Patienten mit degenerativen Gelenkerkrankungen vorhanden [20].

Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung haben ebenfalls erhöhte Resistin-Spiegel [56], die durch eine Therapie mit Infliximab reduziert werden können [55].

Im humanen Liquor ist Resistin in messbarer Konzentration vorhanden [67]. Diese ist im Liquor etwa um den Faktor 100 geringer als im Serum [67]. Bisher wurde die Resistin-Konzentration im Liquor jedoch nur in kleinen Patientengruppen mit unterschiedlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel Fibromyalgie [20], [19], Neuromyelitis optica [112] oder idiopathischer intrakranieller Hypertension [14] gemessen, sodass seine pathophysiologische Relevanz noch weitgehend unklar ist.

I.4 Progranulin

Die erste DNA-Analyse von Progranulin, damals *epithelin precursor* genannt, erfolgte bereits 1992 bei der Sequenzierung der Wachstumsfaktoren Epithelin 1 und Epithelin 2. Progranulin ist ein cysteinreiches Präpropeptid mit einer Molekularmasse von etwa 75kDa. Homologe Peptide wurden bei Mäusen, Hühnern, Rindern und Menschen nachgewiesen. [111]

Lange wurde Progranulin primär auf seine Eigenschaften als Wachstumsfaktor und als Entzündungsmediator hin untersucht. Progranulin selbst besitzt antiinflammatorische Eigenschaften und kann zum Beispiel durch Elastase in Granuline (Epitheline) gespalten werden, die vornehmlich proinflammatorische Eigenschaften besitzen. [46]

Erst 2012 wurde Progranulin in seiner Rolle als Adipokin beschrieben. Matsubara et al. [82] konnten zeigen, dass Progranulin für die Entwicklung der Insulinresistenz unter fettreicher Ernährung verantwortlich ist.

Über welche Rezeptoren Progranulin seine Wirkung vermittelt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Tang et al. [137] vermuteten, dass Progranulin über die Antagonisierung von TNF- α am TNF-Rezeptor seine antiinflammatorischen Eigenschaften vermittelt. Diese Hypothese konnten Chen et al. [27] allerdings nicht bestätigen. Hu et al. [51] konnten nachweisen, dass Progranulin auch eine neuroprotektive Wirkung aufweist, die möglicherweise über Sortilin im zentralen Nervensystem vermittelt wird. Allerdings scheinen auch Sortilin-unabhängige Mechanismen einer neuroprotektiven Wirkung von Progranulin zu existieren [39].

Ein erst kürzlich entdeckter Progranulin-Rezeptor ist EphA2 (*Ephrin type-A receptor 2*), ein Rezeptor aus der Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren, der vor allem im zentralen Nervensystem und in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert wird [93].

Progranulin stellt mit seinen differierenden Eigenschaften als Wachstumsfaktor [159], als antiinflammatorisches Zytokin [60] und als Adipokin [82] eine Schnittstelle verschiedener biologischer Regelkreise dar.

I.4.1 Progranulin in der Zellkultur

Im Gegensatz zu Resistin nimmt die Expression von Progranulin während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten ab [82]. Durch verschiedene Stimuli kann diese in reifen Adipozyten wieder gesteigert werden, wie zum Beispiel durch Dexamethason oder TNF- α [82]. In der Zellkultur unterdrückt Progranulin die insulinabhängige Glukoseaufnahme und vermittelt die TNF- α -induzierte Entstehung der Insulinresistenz [82].

Progranulin hat als Inhibitor der Sekretion proinflammatorischer Zytokine eher antiinflammatorische Eigenschaften, während seine Spaltprodukte, die Granuline, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine fördern [65]. Die Progranulin-Spaltung kann durch die Anwesenheit von HDL-Cholesterin (*high density lipoprotein*) inhibiert werden [43].

Auch Makrophagen exprimieren und sezernieren Progranulin [43]. Über einen positiven Feedback-Mechanismus steigert die Stimulation dieser Zellen mit Progranulin die Progranulin-Expression, hat also autokrine Wirkung [43].

In vitro wirkt Progranulin chemotaktisch auf verschiedene Zellarten, wie dermale Fibroblasten [47], Monozyten [164] und Endothelzellen [47] und fungiert als parakriner Wachstumsfaktor [47].

Auch Neurone können durch Progranulin beeinflusst werden [146]. Progranulin wirkt neuroprotektiv [119] und unterstützt die Proliferation und das Wachstum von Neuronen [146], [32]. Dieser Effekt kann allerdings durch die Co-Stimulation mit SLPI (*secretory leukocyte peptidase inhibitor*), einem Inhibitor der proteolytischen Progranulin-Spaltung durch Elastase, aufgehoben werden. Folglich beruht diese Wirkung möglicherweise auf den Spaltprodukten von Progranulin [146].

I.4.2 Progranulin im Tiermodell

In Nagetieren wurde eine Expression von Progranulin in Adipozyten [82], Leukozyten [32], Neuronen [32] und Mikroglia [162] beschrieben.

Die Expression von Progranulin im Fettgewebe lässt sich durch die Nahrung modulieren, nicht jedoch seine Expression in anderen, zum Beispiel lymphatischen, Geweben [82]. Im Tierversuch konnte ein kausaler Zusammenhang der Adipositas mit der Entwicklung der Insulinresistenz durch Progranulin gezeigt werden [82]. Adipöse Mäuse haben eine höhere Progranulin-Konzentration im Serum und durch die Injektion von Progranulin in nicht-adipöse Mäuse kann eine Insulinresistenz induziert werden [82]. Diese Insulinresistenz wird durch IL-6 vermittelt [82]. Außerdem entwickeln Progranulin-knockout Mäuse weder eine Adipositas, noch eine Insulinresistenz unter fettreicher Diät [82].

Durch seine Funktion als Wachstumsfaktor fördert Progranulin die Wundheilung [47] und steigert die Tumorgenese [45]. In einem frischen dermalen Defekt exprimieren Fibroblasten [32], Makrophagen und neutrophile Granulozyten Progranulin [47]. Durch Progranulin werden die Wundheilung und die Rekapillarisation gefördert [47].

Auch ist Progranulin für ein intaktes Immunsystem von Bedeutung [96], [32], da zum Beispiel Progranulin-defiziente Mäuse eine abgeschwächte Immunreaktion gegenüber bakteriellen Infektionen zeigen [162].

Des Weiteren wirkt es protektiv für Atherosklerose, indem es die Expression proinflammatorischer Zytokine direkt am Gefäß reduziert [58].

Im Nervensystem wird Progranulin sowohl zentral als auch peripher und im enterischen Nervensystem exprimiert [32]. Zentral ist die Expression insbesondere in Purkinjezellen, in Pyramidenzellen des Hippocampus, in kortikalen Neuronen [32], im Hypothalamus [61] und in Mikroglia [119] nachzuweisen.

Die Expression von Progranulin im Hypothalamus ist nahrungsabhängig [61]. Während sie nach einer Hungerphase reduziert ist, steigt die Expression postprandial [61]. Die intrazerebroventrikuläre Applikation von Progranulin hemmt bei Nagetieren die

Nahrungsaufnahme, sodass Progranulin möglicherweise über zentrale Mechanismen die Energiehomöostase steuert, etwa über die zentrale Vermittlung des Sättigungsgefühls [61].

Progranulin wirkt auch in-vivo neuroprotektiv [119]. Progranulin defiziente Mäuse sind anfälliger für neurologische Schäden und zeigen eine erhöhte Aktivität der Mikroglia [162].

I.4.3 Progranulin im humanen Organismus

Beim Menschen wird Progranulin von Adipozyten [164], Makrophagen [65], Mikroglia [28] und Neuronen produziert [150].

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der systemischen Progranulin-Konzentration und demographischen oder anthropometrischen Daten, wie dem Alter, dem Geschlecht oder dem BMI, konnte bisher noch nicht geklärt werden und ist in den beschriebenen Studienpopulationen divergierend [97], [26], [130], [163], [40].

Progranulin ist mit der Menge an viszeralem Fettgewebe und der Anzahl an Makrophagen im Fettgewebe assoziiert [164]. In einer Studie mit 154 Patienten konnte eine erhöhte Progranulin-Konzentration im Serum bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II nachgewiesen werden [164]. In der Entwicklung eines Gestationsdiabetes scheint Progranulin eher keine Rolle zu spielen [140].

Es findet sich häufig ein Zusammenhang mit Dyslipidämie [164], der sich in einer positiven Korrelation mit der LDL-Cholesterin (*low density lipoprotein*)- [130] und einer negativen Korrelation mit der HDL-Cholesterin-Konzentration äußert [164], [130].

Die Progranulin-Konzentration im Serum korreliert ferner mit systemischen Entzündungsparametern, wie dem CRP [164] oder IL-6 [163].

In atherosklerotischen Plaques wird Progranulin neben in Makrophagen auch in glatten Muskelzellen exprimiert [65]. Hier kann es die Entzündungsaktivität reduzieren, während die Prozessierung des Progranulins in Granuline die Entzündungsaktivität in den atherosklerotischen Plaques steigern und so die Entwicklung der Atherosklerose fördern kann [65].

Eine veränderte Progranulin-Konzentration im Liquor ist mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen assoziiert.

Bei Patienten mit frontotemporaler Demenz (*FTD*), Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wurden gehäuft Mutationen im Progranulin-Gen gefunden [31]. Insbesondere bei Patienten mit frontotemporaler Demenz sind diese Mutationen auch mit einer verminderten Progranulin-Konzentration im Liquor assoziiert [28], [31]. Es wurden in verschiedenen Studien missense-Mutationen [147] und Null-Allele [40] beschrieben.

Patienten mit Null-Allelen weisen eine verminderte Progranulin-Konzentration im Serum auf, die in Zukunft eventuell zu einer frühen Diagnostik bei asymptomatischen Patienten dienen könnte [131], [118]. Interessanterweise zeigen FTD-Patienten auch veränderte Essgewohnheiten und eine Atrophie des Hypothalamus [109].

Patienten mit Multipler Sklerose (*MS*) haben eine höhere Progranulin-Konzentration im Liquor während eines MS-Schubs und zeigen eine gesteigerte Expression von Progranulin in Mikroglia in aktiven Läsionen [150]. Auch Patienten mit amyotropher Lateralsklerose haben eine gesteigerte Progranulin-Expression im zentralen Nervensystem [79].

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Hypothese:

Sekrethormone aus dem Fettgewebe (Adipokine), wie zum Beispiel Resistin und Progranulin, sind liquorgängig und können demnach in einem festen oder krankheitsvariablen Verhältnis zum Serum im Liquor nachgewiesen werden. Metabolische, inflammatorische und hormonelle Einflüsse regulieren in vitro die Sekretion dieser Adipokine aus Adipozyten.

Primäres Ziel dieser Arbeit ist es, die Konzentrationen der Adipokine Resistin und Progranulin in einem großen gut charakterisierten Studienkollektiv in gepaarten Proben von Serum und Liquor mittels ELISA zu quantifizieren.

Diese Konzentrationen sollen in Zusammenhang mit verschiedenen klinischen und laborchemischen Parametern gesetzt werden. Dadurch sollen neue Erkenntnisse über die physiologische und pathophysiologische Situation der Adipokine im humanen Organismus und ihre Fähigkeit zur Überquerung der Bluthirnschranke (Liquorgängigkeit) gewonnen werden. Insbesondere die Liquorkonzentrationen dieser Adipokine sollen eine systematische erste Basis liefern für bislang fehlende Liquor-Normbereiche und für typische Serum-/ Liquor-Koeffizienten, welche die Liquorgängigkeit im Detail charakterisieren. Auch sollen im Hinblick auf verschiedene Erkrankungsgruppen die Veränderungen der Liquorkonzentrationen und die Veränderungen der Serum-/ Liquor-Koeffizienten beobachtet werden. Anhand der Evaluation des Grades der Schrankenstörung sollen Rückschlüsse auf die Permeabilität der Bluthirnschranke in Bezug auf die zu untersuchenden Adipokine gezogen werden können.

Des Weiteren soll in vitro die Regulation von Resistin und Progranulin in der murinen Zelllinie 3T3-L1 untersucht werden. Hierzu werden die konzentrationsabhängigen Effekte verschiedener Substanzen auf die Sekretion der Adipokine durch Adipozyten ausgewertet. Aufbauend auf die Ergebnisse der Literaturrecherche und auf die Ergebnisse des Studienkollektivs sollen diesbezüglich Substanzen ausgewählt werden, deren Effekte auf die Adipozyten von besonderem Interesse sind. Hierzu zählen insbesondere metabolische Faktoren, wie Glukose oder freie Fettsäuren, inflammatorische Faktoren, wie IL-6, LPS und TNF- α , sowie hormonelle Faktoren, wie Insulin, Inkretine und Sexualhormone.

In Zusammenschau der Ergebnisse aus Serum- beziehungsweise Liquorproben und Zellkulturversuchen werden neue Einblicke in die Regulation und Funktion der Adipokine Resistin und Progranulin erwartet.

II Material und Methoden

II.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien sind den folgenden **Tabellen II.1.1, II.1.2 und II.1.3** zu entnehmen.

Gerätetyp	Hersteller
Thermomixer F1.5	Eppendorf
Mikroplatten Spektralphotometer	Epoch
CO2 Inkubator 150 Liter	Heracell
Sicherheitswerkbank KL.II 120cm komplett	Thermo Fisher
Mikroliterzentrifuge Mikro 200 R	Hettich
Wasserbad, 4-12 Liter	Memmert
Inverses Mikroskop Modell DM IL LED	Leica
Ultraschallhomogenisator Sonoplus	Bandelin
Kühl-Thermomixer MKR 13	Ditabis
Orbital incubator SI500	Stuart
Vakuumpumpe D62	Biometra
Vortexer mini	IKA
Analysenwaage ACJ 220-4M, 220g/0,1 mg	Kern
Hei-Standard Magnetrührer	Heidolph
Ph-Meter PH 1000	Mettler Toledo
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph
Gefrierschrank GP4013	Liebherr
-80°C-Schrank HFU600TV	Thermo Fisher

1: **Tabelle II.1.1:** Auflistung der verwendeten Gerätetypen mit Herstellern

Materialien	Hersteller
ELISA 96-Well Mikrotiterplatten	Greiner bio-one
Reaktionsgefäß	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipette research plus 0,5-10µl	Eppendorf
Pipette research plus 10-100µl	Eppendorf
Pipette research plus 100-1000µl	Eppendorf
Multipette M4	Eppendorf
12-Well Platte	Greiner bio-one
75cm ² Flaschen	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One
Neubauer improved Zählkammer	Roth
Zellschaber	Sarstedt
1,5ml Reaktionsgefäß	Sarstedt

2: **Tabelle II.1.2:** Auflistung der verwendeten Materialien mit Herstellern

Chemikalien	Hersteller
ELISA:	
DuoSet ELISA-Kit human Resistin	R&D Systems
DuoSet ELISA-Kit human Progranulin	R&D Systems
DuoSet ELISA-Kit mouse Resistin	R&D Systems
DuoSet ELISA-Kit mouse Progranulin	R&D Systems
PBS(<i>phosphate buffered saline</i>)-Puffer	Biochrom
Tween20	Roth
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
H ₂ SO ₄	Merck
Zellkulturversuche:	
Dulbecco's modified eagle medium	Biochrom
Dulbecco's modified eagle medium F-12	Lonza
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech
Trypanblau	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich
Pantothensäure	Sigma-Aldrich
Biotin	Sigma-Aldrich
Fetuin	MP Biomedicals
Ascorbat	Sigma-Aldrich
Corticosteron	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Serva Electrophoresis
Insulin	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharid E. coli 055:B5	Sigma-Aldrich
Interleukin-6	Biomol
Tumor-Nekrose-Faktor- α	Biomol
Glucagon-like Peptide	Sigma-Aldrich
Gastric inhibitory polypeptide	Sigma-Aldrich
Simvastatin	Biomol
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich
Laurinsäure	Sigma-Aldrich
Myristinsäure	Sigma-Aldrich
Margarinsäure	Sigma-Aldrich
Undecansäure	Sigma-Aldrich
Stearinsäure	Calbiochem
Ölsäure	Sigma-Aldrich
Palmitoleinsäure	Sigma-Aldrich
Linolsäure	Sigma-Aldrich
Eicosapentaensäure	Sigma-Aldrich
Arachidonsäure	Sigma-Aldrich
Docosahexaensäure	Sigma-Aldrich
Estradiol	Sigma-Aldrich
Testosteron	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Phosphatase/Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Cytotoxicity Detection Kit	Roche

3: **Tabelle II.1.3:** Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Herstellern

II.2 Das Studienkollektiv

Das Studienkollektiv besteht aus 270 Patienten der Klinik für Neurologie der Universitätsklinik Gießen, von denen jeweils Serum- und Liquorproben entnommen und asserviert wurden. Die Proben wurden von 2007 bis 2011 gesammelt und in Aliquots von circa 150µl bei -20°C aufbewahrt. Für die Sammlung der biologischen Proben und deren Auswertung existiert ein positives Ethikvotum an der Justus-Liebig-Universität Gießen (AZ 278/13) und die Probanden gaben vor der Probennahme ihr schriftliches Einverständnis zur Weiterverwendung der Proben zu wissenschaftlichen Zwecken.

II.3 Erstellung der SPSS-Datenbank

Zu den Proben waren aus dem Labor für Liquordiagnostik Name, Geburtsdatum und die Fallnummer der Patienten bekannt. Die Proben erhielten eine fortlaufende Nummer und wurden dadurch pseudonymisiert. Da nicht für jeden Patienten alle Parameter erfasst werden konnten, ist im Folgenden zu jedem Parameter die Anzahl der erhobenen Werte angegeben.

Die klinischen Daten wurden vom ärztlichen Personal der Klinik für Neurologie im klinikinternen Dokumentations-System (KAOS) dokumentiert. Die laborchemischen Daten wurden zur Zeit des Patientenaufenthaltes erhoben. Die Routine-Serumparameter wurden vom Zentrallabor und die Liquorparameter vom Labor für Liquordiagnostik des Universitätsklinikums Gießen gemessen. Die Gesamtmenge der Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2014 retrospektiv in einer SPSS-Datenbank zusammengefasst. Die Konzentrationen der Adipokine Resistin und Progranulin im Serum und Liquor wurden von 2014 bis 2015 mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) im endokrinologischen Forschungslabor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Schäffler (Medizinische Klinik und Poliklinik III, Universitätsklinik Gießen) gemessen.

Das Geschlecht (Fallzahl n=270) der Patienten wurde als klassifizierte Variable in die Tabelle aufgenommen. Da lediglich von 212 Patienten sowohl Gewicht (n=215) als auch Größe (n=217) bekannt waren, wurde der BMI bei 212 Patienten berechnet. Die BMI-Werte wurden zum einen in die zwei Gruppen normalgewichtig (< 25 kg/m², n=130) und adipös (≥ 25 kg/m², n=133) unterteilt. In diese Gruppierung wurden auch die Patienten eingeteilt, deren Ernährungszustand aus dem Arztbrief zu entnehmen war, von denen aber im klinikinternen System kein exakter BMI-Wert vorhanden war. Zum anderen wurde eine Gruppierung nach der Gewichtsklassifikation der WHO (*world health organization*) in 6 Gruppen vorgenommen. Dabei waren 9 Patienten der

untergewichtigen Gruppe ($<18.5\text{kg/m}^2$), 121 Patienten der normalgewichtigen Gruppe ($18.5\text{-}24.9\text{kg/m}^2$), 75 Patienten der Gruppe mit Präadipositas ($25.0\text{-}29.9\text{kg/m}^2$), 34 Patienten der Gruppe mit Adipositas Grad I ($30.0\text{-}34.9\text{kg/m}^2$), 14 Patienten der Gruppe mit Adipositas Grad II ($35.0\text{-}39.9\text{kg/m}^2$) und 2 Patienten der Gruppe mit Adipositas Grad III ($\geq 40.0\text{kg/m}^2$) zuzuordnen.

Für die laborchemischen Daten aus dem Serum der Patienten wurden die Werte aus dem klinikinternen System in die Tabelle übernommen, die zeitlich am nächsten zu der Liquorentnahme lagen.

Bezüglich der zellulären Bestandteile des Blutes wurden Leukozyten ($n=260$), Thrombozyten ($n=259$) und der Hämoglobin-Gehalt ($n=260$) erhoben. An Stoffwechselfparametern wurden der HbA1c ($n=104$), die Glukose ($n=138$) und das basale TSH (*Thyreoidea-stimulierendes Hormon*) ($n=194$) erhoben. Der Lipid-Status wurde durch das Gesamtcholesterin ($n=136$), die Triglyzeride ($n=137$), das LDL-Cholesterin ($n=63$) und das HDL-Cholesterin ($n=63$) abgebildet. An Leberparametern wurden die Werte für die GOT (*Glutamat-Oxalacetat-Transaminase*) ($n=241$), die GPT (*Glutamat-Pyruvat-Transaminase*, $n=245$), das Gesamtbilirubin ($n=76$), die Cholinesterase ($n=134$) und das Gesamtprotein ($n=141$) erhoben. Zur Abbildung der Nierenfunktion, wurden die Kreatinin- ($n=264$), Harnstoff- ($n=259$) und Harnsäurewerte ($n=128$) erfasst. Des Weiteren wurden die Werte für das CRP ($n=267$), die LDH (*Laktatdehydrogenase*) ($n=159$) und das Ferritin ($n=6$) erhoben.

In dem Labor für Liquordiagnostik wurden zusätzlich im Serum das Albumin ($n=270$), sowie die Immunglobuline IgM ($n=76$), IgG ($n=270$) und IgA ($n=76$) bestimmt.

Im Liquor wurde die Zellzahl ($n=270$) bestimmt. Diese wurde auch als klassifizierter Parameter mit $n\leq 5$ oder $n>5$ Zellen festgehalten. Des Weiteren wurden im Liquor das Gesamteiweiß ($n=270$), das Albumin ($n=270$), das Laktat ($n=270$), das Ferritin ($n=30$) und die Immunglobuline IgM ($n=76$), IgG ($n=270$) und IgA ($n=76$) erhoben. Das Vorhandensein von oligoklonalen Banden ($n=257$) wurde als klassifizierter Parameter in die Tabelle übernommen. Der Grad der Schrankenstörung ($n=270$) wurde durch das Labor für Liquordiagnostik eingeteilt. Die Einteilung erfolgte anhand des Liquor/Serum-Quotienten von Albumin in Normalbefund (Grad 0: Quotient $< 6.5 \times 10^{-3}$ für das Alter von < 40 Jahren und $< 8.0 \times 10^{-3}$ für < 60 Jahre), leichte Schrankenstörung (Grad 1: Quotient $< 10.0 \times 10^{-3}$), Schrankenstörung (Grad 2: Quotient $< 10.0 \times 10^{-3}$) und starke Schrankenstörung (Grad 3: Quotient $> 20.0 \times 10^{-3}$). Die Beurteilung des Liquors erfolgte ebenfalls durch das Labor für Liquordiagnostik und wurde retrospektiv in folgende Gruppen zusammengefasst: „keine weitere Beurteilung“, „entzündlicher Prozess“,

„chronische ZNS-Erkrankung“, „chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung“, „infektiöse ZNS-Erkrankung“, „vaskuläre Störung“, „Ausschluss“ und „andere“.

Anhand der Arztbriefe wurde das Verhalten bezüglich des Nikotinkonsums und der Einnahme von L-Thyroxin, Simvastatin/Pravastatin und oralen Kontrazeptiva dokumentiert. An Vorerkrankungen wurden die Arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus Typ I und Typ II als eigenständige Parameter erhoben. Allgemeine Vorerkrankungen wurden als klassifizierte Parameter in die Gruppen „keine Vorerkrankung“, „Hypothyreose“, „Autoimmunerkrankung“, „Alkoholabusus“, „Niereninsuffizienz“, „entzündlicher Prozess“, „infektiöse Erkrankung“ und „andere“ eingeteilt.

Die aktuellen neurologischen Diagnosen wurden ebenfalls als klassifizierter Parameter erhoben. Die Klassifikation der neurologischen Diagnosen erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Berghoff (Oberarzt in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Gießen). In Klammern ist jeweils die Anzahl der Patienten mit der entsprechenden Diagnose angegeben.

1. Infektiöse ZNS-Erkrankung (n=13):

Neuroborreliose (n=7), virale Meningitis (n=2), aktive Neurolues (n=1), bakterielle Meningoenzephalitis (n=1), Polyradikuloneuritis bei Herpeszoster (n=1), bakterielle Meningitis (n=1)

2. Multiple Sklerose (n=42):

Multiple Sklerose nicht näher bezeichnet (n=20), schubförmige Multiple Sklerose (n=7), Primär progrediente Multiple Sklerose (n=5), Retrobulbärneuritis (n=3), Myelitis (n=3), autoimmune Myelitis (n=2), Opticusneuritis (n=2)

3. Vaskuläre Erkrankung (n=22):

Hirnfarkt (n=10), TIA (*transitorisch ischämische Attacke*) (n=8), Rückenmarksischämie (n=2), Z.n. Hirnfarkt (n=1), vaskuläre Leukenzephalopathie (n=1)

4. Epilepsie (n=26):

Epilepsie mit Grand mal-Anfällen (n=7), erstmaliger Grand mal-Anfall (n=7), Gelegenheitsanfall (n=4), symptomatische Epilepsie (n=4), kryptogene Epilepsie (n=2), generalisierte Epilepsie (n=1), Provokationsanfall (n=1)

5. Kopfschmerz/ Gesichtsschmerz (n=26):

Migräne (n=11), Gesichtsschmerz (n=5), Spannungskopfschmerz (n=4), Kopfschmerzen (n=3), Migräneaura ohne Kopfschmerz (n=2), Primäres Kopfschmerzsyndrom (n=1)

6. Neuropathie/ Hirnnervenparese (n=49):

Hirnnervenparese (n=13), Polyneuropathie vom axonalen Typ (n=13), sonstige Polyneuropathien (n=9), demyelinisierende PNP (n=6), Polyradikuloneuritis (n=3), Polyneuritis (n=3), diabetische Polyneuropathie (n=2)

7. Andere (n=92):

Normaldruckhydrozephalus (n=10), Alzheimer-Demenz (n=7), somatoforme Störung (n=6), Depression (n=5), Amyotrophe Lateralsklerose (n=4), Z.n. Zosterinfektion (n=3), keine Diagnose bekannt (n=3), Lumbalgien (n=3), funktionelle Störung (n=3), unbestätigter Verdacht auf MS (n=2), Sensibilitätsstörung (n=2), Neuropathia vestibularis (n=2), Schwindel (n=2), Synkopen (n=2), Restless-Legs-Syndrom (n=2), Parese eines peripheren Nerven (n=2), Spasmus hemifacialis (n=2), chronischer Rückenschmerz (n=1), Plexusneuritis (n=1), Radikulopathie (n=1), Myalgie (n=1), traumatische Optikusschädigung (n=1), zervikale Wurzelreizung (n=1), dekompenzierte Esophorie (n=1), zerebrale Gefäßfehlbildung (n=1), V.a. small fibre-Polyneuropathie (n=1), bipolare Störung (n=1), Retinopathie centralis serosa (n=1), Frontotemporale Degeneration (n=1), HWS-Syndrom im Rahmen eines viralen Infekts (n=1), orthostatische Dysregulation (n=1), toxische Amblyopie (n=1), V.a. Melkerson-Rosenthal-Syndrom (n=1), V.a. Hyperventilationssyndrom (n=1), Hirnabszesse (n=1), Bandscheibenprolaps (n=1), verkalktes Subduralhämatom (n=1), V.a. vaskulitische Myopathie (n=1), Lidheberparese (n=1), V.a. auf entzündliche rheumatische Systemerkrankung (n=1), Zervikalkanalstenose (n=1), Papillitis (n=1), subkortikale vaskuläre Enzephalopathie (n=1), V.a. Vestibularisparoxysmie (n=1), Motoneuronenerkrankung (n=1), Narkolepsie (n=1), Relativskotom (n=1), mildes kognitives Defizit (n=1), Pseudotumor cerebri (n=1).

Nach der Bestimmung der Adipokin-Konzentrationen via ELISA wurden diese ebenfalls in die SPSS-Tabelle übernommen. Aus diesen Konzentrationen wurden anschließend die Liquor-/Serum-Quotienten der Adipokine berechnet.

II.4 Bestimmung der Adipokin-Konzentrationen

Die Konzentrationen der Adipokine Resistin und Progranulin wurden in den je 270 Serum- und Liquorproben, sowie in den Überständen der Zellkulturversuche mittels ELISA im Duplikat gemessen. Für die Messungen der Serum- und Liquorproben wurden humane Antikörper und für die Messung der Überstände der Zellkulturversuche murine Antikörper verwendet.

II.4.1 Prinzip des ELISAs

Der ELISA ist ein quantitatives Messverfahren für Proteine und Peptide. Hierbei werden zunächst Mikrotiterplatten mit 96 Wells mit einem primären Antikörper beschichtet. Dieser Antikörper bindet spezifisch ein Antigen. Dieses Antigen stellt hier das jeweils zu bestimmende Adipokin in der Probe dar. Nach einer Inkubationszeit mit der Probe werden alle nicht gebundenen Bestandteile durch Waschen mit PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) (+0.05% Tween) entfernt. In einem nächsten Schritt wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher sowohl spezifisch das Adipokin als auch, über ein konjugiertes Biotin-Molekül, Streptavidin binden kann. Hierdurch entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen werden die nicht gebundenen sekundären Antikörper entfernt. Das Streptavidin ist mit einer Meerrettichperoxidase (*HRP*) konjugiert. Diese erzeugt mit der anschließend hinzu gegebenen Chromogenmischung aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin eine mit einer Änderung der Lichtabsorption einhergehende Reaktion. Optisch ist eine Farbänderung zu blau zu erkennen. Nach einer lichtgeschützten Inkubation wird die Farbreaktion mit H_2SO_4 gestoppt. Dabei ist ein Farbumschlag von blau zu gelb zu erkennen. Die Lichtabsorption durch den Farbstoff kann mit einem Spektralphotometer detektiert und quantifiziert werden. Neben der Messprobe wird auch eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des zu bestimmenden Proteins gemessen. Anhand der daraus erstellten Standardkurve können die Adipokin-Konzentrationen in den Messproben quantifiziert werden.

II.4.2 Durchführung des ELISAs

Die Adipokine Resistin und Progranulin wurden mit ELISA-Kits von R&D Systems (DuoSet ELISA Development System) gemessen. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen. Es wurden Mikrotiterplatten mit 96 Wells mit dem primären Antikörper beschichtet. Dazu wurde der primäre Antikörper zunächst in 1ml PBS rekonstituiert und aliquotiert. Aus diesen Aliquots wurden 27.8µl in 5ml PBS einfach für die Beschichtung einer Mikrotiterplatte verdünnt. Der humane primäre Antikörper hatte eine Endkonzentration von 4.0µg/ml, der murine von 1.0µg/ml. Von dieser Verdünnung wurden in jedes Well 50µl gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei waren die Platten abgedeckt, um Verdunstung und Verunreinigung zu minimieren. Am Folgetag wurden die Platten mit Waschpuffer (PBS + 0.05% Tween) dreimal gewaschen. Danach wurden in jedes Well 100µl 1%iges BSA (*bovines Serumalbumin*) in PBS (Probenpuffer) gegeben. Dieses wurde unter Rotationsbewegungen auf einem Schüttler (ThermoMixer F1.5, Eppendorf) bei

Raumtemperatur inkubiert und nach 1 Stunde wieder dreimal mit PBS einfach gewaschen. Für die Standardreihe wurde der Proteinstandard zunächst mit 0.5ml Probenpuffer rekonstituiert und aliquotiert. Hieraus wurde der höchste Standard mit einer Konzentration von 2000pg/ml durch Verdünnung mit 1%igem BSA in PBS hergestellt. Es erfolgte eine Reihenverdünnung mit einem Faktor von 1:2.5 in sieben Verdünnungsschritten in 1%igem BSA in PBS. Als Negativkontrolle wurde 1%iges BSA in PBS verwendet. Die Serumproben konnten 1:40 für Resistin und 1:80 für Progranulin in 1%igem BSA in PBS verdünnt werden. Die Liquorproben wurden für Resistin unverdünnt und für Progranulin 1:3 verdünnt eingesetzt. Bei den Überständen der Zellkulturversuche wurde die Probe für die Resistin-Messung 1:30 in 1%igem BSA in PBS verdünnt und für die Progranulin-Messung unverdünnt eingesetzt. Der Standard, die Proben beziehungsweise die Probenverdünnungen wurden mit je 45µl in Doppelbestimmungen in die Wells pipettiert und anschließend 1 Stunde unter Rotationsbewegungen bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um die nicht gebundenen Bestandteile der Proben zu entfernen. Der sekundäre Antikörper wurde mit 1ml 1%igem BSA in PBS rekonstituiert und aliquotiert. Davon wurden 27.8µl in 5ml 1%igem BSA in PBS für das Beladen einer Mikrotiterplatte verdünnt. Die Endkonzentration des sekundären Antikörpers waren bei humanem Resistin 0.25µg/ml, bei humanem Progranulin 1.0µg/ml, bei murinem Resistin 200ng/ml und bei murinem Progranulin 62.5ng/ml. Von diesem sekundären Antikörper wurden in jedes Well 50µl pipettiert und wieder zwei Stunden unter Rotationsbewegungen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer, wurden in jedes Well 50µl des Streptavidin-HRP-Konjugats pipettiert und für 20 Minuten lichtgeschützt unter Rotationsbewegungen bei Raumtemperatur inkubiert. Das Streptavidin-HRP-Konjugat wurde zuvor im Verhältnis 1:200 in 1%igem BSA für verdünnt. Nach dem nächsten dreifachen Waschschrift wurden in jedes Well 50µl der 1:1 Mischung der Chromogene A (H₂O₂) und B (Tetramethylbenzidin) pipettiert und weiterhin lichtgeschützt auf dem Schüttler bis zur Blaufärbung infolge der Lichtreaktion inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit je 25µl 2 N H₂SO₄ gestoppt und der Farbumschlag von blau zu gelb konnte beobachtet werden. Die Absorption wurde dann quantitativ mit dem ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

II.5 Zellkulturversuche an der murinen Zelllinie 3T3-L1

Für die Zellkulturversuche wurde die murine Zelllinie 3T3-L1 verwendet. Diese Zellreihe entstammt ursprünglich aus disaggregiertem embryonalem Mausgewebe. Die fibroblastischen Zellen lassen sich mit Hilfe von verschiedenen Zusätzen zu Adipozyten-

ähnlichen Zellen differenzieren, die zytoplasmatisch ausgeprägt und multiloculär Triglyzeride akkumulieren, Stoffwechseleigenschaften von Adipozyten aufweisen und adipozytenspezifische Adipokine produzieren und sezernieren.

Bis zur Zellernte wurden alle Schritte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle Materialien sind zunächst autoklaviert worden, bevor sie in Kontakt mit den Zellen kamen. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37° C bei einer auf 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre kultiviert.

II.5.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Nach Lieferung der Zellen wurden diese in Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von etwa 80% bis 90% angezogen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3ml Trypsin für 10 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Durch das Trypsin fand ein enzymatisch katalysierter Abbau der extrazellulären Matrix und dadurch die Ablösung der Zellen vom Untergrund statt. Hierzu wurden 7ml Anzuchtmedium (DMEM, (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) von Biochrom) hinzugegeben. Das darin enthaltene Albumin deaktiviert das Trypsin. Die Zellen konnten in Zentrifugenröhrchen mit Anzuchtmedium überführt werden. Die Röhrchen wurden für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder in 10 ml Anzuchtmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden in einem neuen Gefäß 3µl zu 27µl Trypanblau gegeben. Anschließend wurden davon 10µl auf eine Zählkammer gegeben. Durch Behandlung mit Trypanblau ließen sich die Zellen nach ihrer Viabilität unterscheiden, da es nur die abgestorbenen Zellen anfärbt. Mit Hilfe der Zählkammer wurde die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension unter dem Mikroskop abgeschätzt und das notwendige Volumen, um in jedem Aliquot etwa 10⁶ Zellen zu verteilen, berechnet. Dieses Volumen wurde in Kryo-Cups gegeben und auf je 1 ml mit der Mischung aus Anzuchtmedium und Lösungsmittel 5% DMSO (*Dimethylsulfoxid*) aufgefüllt. Dieses Vorgehen wurde bis zur Passage 3 wiederholt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C über Nacht eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

II.5.2 Splitten und Aussäen der Zellen

Zunächst wurden die Zellen aufgetaut und das Medium der angezogenen Zellen abgenommen. Danach wurden 3ml Trypsin/EDTA (*Ethylendiamintetraacetat*) auf die Zellen gegeben und diese im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach 10 Minuten wurden 7ml Anzuchtmedium (DMEM, von Biochrom) pro Flasche dazugegeben. Nach Spülen der Flasche mit dem Medium wurde ihr Inhalt vollständig abgenommen und in ein

Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 1200rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde in 5ml frischem Anzuchtmedium resuspendiert. Anschließend wurden davon 10 μ l auf eine Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Um die Zellen zu splitten, wurden zu 10ml frischen Anzuchtmediums circa 225000 Zellen pro Flasche gegeben. Um die Zellen auszusäen, wurden zu 1ml frischen Anzuchtmediums circa 11400 Zellen pro Well gegeben. Die Zellen wurden auf 12-Well-Platten ausgesät. Für Differenzierung und Stimulationsversuche wurden Zellen bis zu einer Passagenzahl von 7 verwendet.

II.5.3 Differenzierung der Zellen

Um die Fibroblasten zu reifen Adipozyten zu differenzieren, ist eine Differenzierung über 8 Tage notwendig. Die einzelnen Schritte der Differenzierung werden im Folgenden erläutert.

Die Zellen wurden in dem Medium DMEM/F-12 (von Lonza) differenziert. Dieses Medium setzt sich aus DMEM und HAM-F12 mit einem Mischungsverhältnis von 1:1 zusammen. Es hat eine Glukosekonzentration von 3.151g/l. Dem DMEM/F-12 wurden 1% Penicillin/Streptomycin zur Prophylaxe von Infektionen und 5% Fetales Kälberserum zugesetzt. Bei den ersten drei Differenzierungsschritten wird ein Differenzierungsmedium benötigt. Dieses setzt sich aus dem Kultivierungsmedium und diversen Zusätzen zusammen, die in **Tabelle II.1** mit den verwendeten Konzentrationen zusammengestellt sind.

Zusatz	Konzentration
Apo-Transferrin	2µg/ml
Pantothensäure	17µM
Biotin	1µM
Fetuin	300µg/ml
Insulin	100nM
Ascorbat	200µM
Corticosteron	1µM
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	20µM

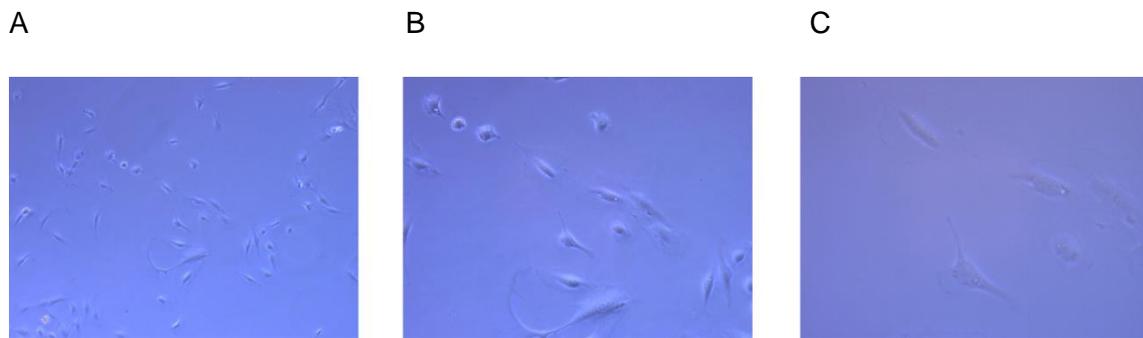
4: **Tabelle II.5.1:** Zusammenstellung der Zusätze für das Differenzierungsmedium und deren Konzentrationen

Apo-Transferrin, Pantothensäure, Biotin und Fetuin waren im Medium stabil und konnten in diesem gelöst bei 4°C gelagert werden. Insulin, Ascorbat, Corticosteron und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin wurden dagegen vor jeder Verwendung des Differenzierungsmediums neu hinzugegeben.

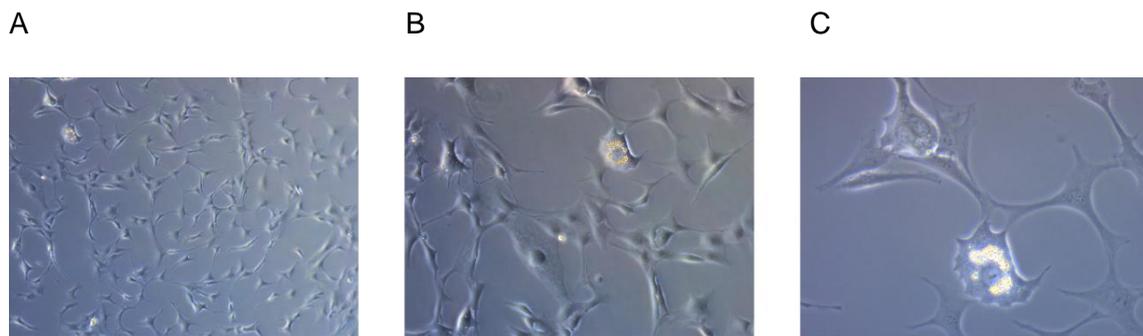
Am Tag vor dem Start der Differenzierung wurden die Zellen mit einer Zelldichte von circa 3×10^3 Zellen/cm² auf 12-Well Platten ausgesät. Am Tag 0, dem Start der Differenzierung, wurde das oben aufgeführte Differenzierungsmedium auf die Zellen gegeben. An Tag 3 und Tag 6 wurde dieses Medium gewechselt und durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt. An Tag 7 wurde das Medium entfernt und durch serumfreies DMEM/F12 mit 1% Penicillin/Streptomycin mit 1µM Insulin ersetzt, um die Zellen einer hohen Dosis an Insulin auszusetzen. An Tag 8 fand erneut ein Wechsel des Mediums zu serum- und insulinfreiem DMEM/F12 mit 1% Penicillin/ Streptomycin statt. Nach einer Inkubation von mindestens drei Stunden wurde mit dem jeweiligen Stimulationsversuch begonnen.

Bei den Zellkulturversuchen mit Präadipozyten wurden die Zellen nach dem Aussäen 24 Stunden zum Anwachsen auf den Kulturplatten inkubiert, anschließend den jeweiligen Stimulanzen über Nacht ausgesetzt und am darauf folgenden Tag geerntet.

Im Verlauf der Differenzierung ist die Entwicklung der Präadipozyten zu Adipozyten unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen. An Tag 0 haben die Zellen eine gestreckte Form mit fibroblastischen Ausläufern (**Abbildung II.1**). Der Kern ist das größte erkennbare Kompartiment und es sind noch keine Lipidtropfen sichtbar. Von Schritt zu Schritt wird der Zellrasen dichter und die Zellen nehmen einen zunehmend runden Phänotyp an. An Tag 3 haben die ersten Zellen bereits einzelne sichtbare Lipidtropfen gebildet (**Abbildung II.2**). An Tag 6 und 7 sind diese nahezu in jeder Zelle vorhanden (**Abbildung II.3** und **II.4**). Die vollständig differenzierten Adipozyten sind an Tag 8 an einer oder wenigen großen Lipidvakuolen zu erkennen (**Abbildung II.5**).

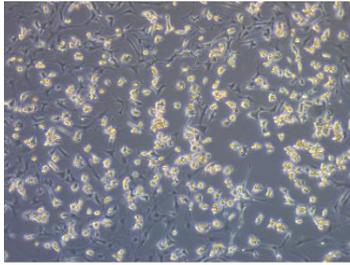


1: **Abbildung II.1:** Tag 0 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Fibroblasten-ähnliche Zellen mit fibroblastischen Ausläufern ohne Lipideinlagerungen (Prä-Adipozyten) sind sichtbar.

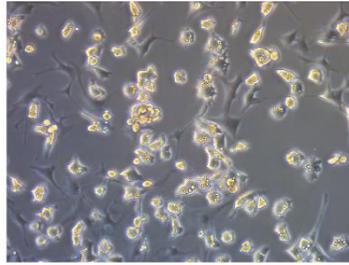


2: **Abbildung II.2:** Tag 3 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Es sind vereinzelt Lipideinlagerungen im Zytoplasma zu erkennen.

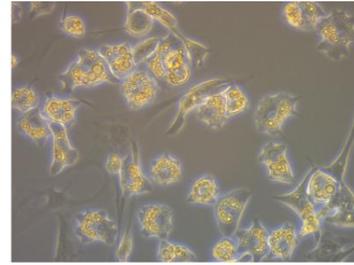
A



B

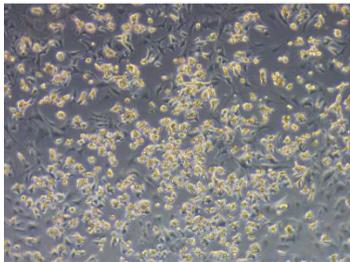


C

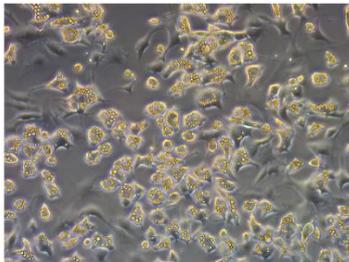


3: **Abbildung II.3:** Tag 6 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Die fibroblastischen Ausläufer bilden sich zurück und die Mehrzahl der Zellen enthält sichtbare Lipideinlagerungen.

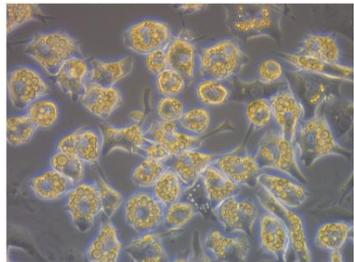
A



B

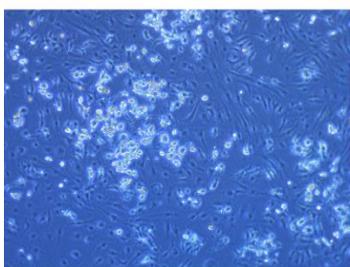


C

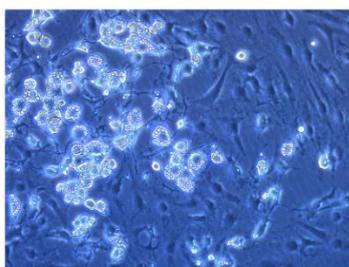


4: **Abbildung II.4:** Tag 7 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Die Lipideinlagerungen sind dichter.

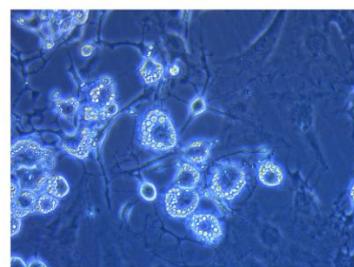
A



B



C



5: **Abbildung II.5:** Tag 8 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Die Zellen sind vollständig zu Adipozyten differenziert.

II.5.4 Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden den Stimulanzen ausgesetzt, nachdem sie nach dem Mediumwechsel mindestens 3 Stunden in serumfreien DMEM/F-12 inkubiert worden waren. Nach der Zugabe der Stimulanzen, wurden die Zellen erneut für 18 Stunden inkubiert.

Jeder Versuchsansatz wurde in 6 Replikaten durchgeführt. Zu jedem Stimulus wurde eine passende Kontrolle mitgeführt. Die Stimulanzen, die in Medium, H₂O oder Ethanol verdünnt wurden, erhielten jeweils 6 Wells mit einer entsprechenden Medium-, H₂O- oder Ethanol-Kontrolle, um Effekte der Lösungsmittel gegebenenfalls erkennen zu können.

Die verwendeten Stimulanzen sowie die jeweiligen Lösungsmittel und Konzentrationen sind in **Tabelle II.2** aufgeführt. Der letzte Verdünnungsschritt erfolgte jeweils in DMEM/F-12, so dass die Zellen während der Stimulation ihrem gewohnten Medium ausgesetzt waren. Nach dem Absaugen des alten Mediums wurden jeweils 0.5ml pro Well der in Medium gelösten Stimulanzen auf die Zellen gegeben.

Die Auswahl der Stimulanzen erfolgte anhand der in vivo gefundenen Ergebnisse aus dem Studienkollektiv und unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur. Die einzusetzenden, biologisch effektiven und dabei nicht zytotoxischen Konzentrationen der Substanzen wurden in Vorversuchen ermittelt [57], [66]. Hierzu wurden die Adipozyten mit Konzentrationen einer Dosis-Kurve stimuliert. Nachfolgend wurde eine eventuelle Zytotoxizität via LDH-Test bestimmt (siehe Abschnitt II.5.7).

Stimulanz	Endkonzentration	Lösungsmittel
Lipopolysaccharid	0.5ng/ml	H ₂ O + 0.1% BSA
	2ng/ml	
	10ng/ml	
Interleukin-6	10ng/ml	
	50ng/ml	
	200ng/ml	
Tumor-Nekrose-Faktor- α	0.5ng/ml	
	2ng/ml	
	10ng/ml	
Glukose (in DMEM-F12)	3.151g/l	-
Glukose + Insulin	3.151g/l Glc + 2nM Insulin	H ₂ O
Glukose (DMEM)	4.5g/l	-
Glukose + Insulin	4.5g/l Glc + 2nM Insulin	H ₂ O
Glucagon-like Peptide-1	1nM	H ₂ O
	10nM	
	100nM	
Glucose dependent insulinotropic Peptide	1nM	
	10nM	
	100nM	
Simvastatin	0.1 μ M	Ethanol
	1 μ M	
	10 μ M	

Palmitinsäure	50µM	10% BSA in Ethanol
	100µM	
Laurinsäure	10µM	
	100µM	
Myristinsäure	10µM	
	100µM	
Margarinsäure	10µM	
	100µMM	
Undecansäure	100µM	
Stearinsäure	10µM	
	100µM	
Ölsäure	10µM	
	150µM	
Palmitoleinsäure	1µM	
	10µM	
Linolsäure	1µM	
	10µM	
Eicosapentaensäure	1µM	
	10µM	
Arachidonsäure	1µM	
	10µM	
Docosahexaensäure	1µM	
	10µM	
Estradiol	0.5µM	H ₂ O
	2µM	
Testosteron	0.5µM	10% BSA in Ethanol
	2µM	

Estradiol*	0.1µM	H ₂ O
	0.5µM	
	2µM	
Testosteron*	0.1µM	10% BSA in Ethanol
	0.5µM	
	2µM	

5: **Tabelle: II.2** Liste der durchgeführten Stimulationsversuche mit Angabe des Lösungsmittels und der Endkonzentration

* Stimulationsversuche an Präadipozyten

II.5.5 Zellernte

Das Ziel der Zellernte war es zum einen, den Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen zu asservieren. Zum anderen sollte das Gesamtprotein aus den Zellen gewonnen werden.

Zur Zellernte wurden die Platten mit den Zellen zunächst auf Eis gestellt und dadurch heruntergekühlt. Der Überstand in den Wells wurde in Eppendorfgefäße überführt und bei 4000rpm bei 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch bildete sich ein Zellpellet am Boden der Eppendorfgefäße. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und bei 4° C kühl gestellt. Aus diesem Überstand konnten später mittels ELISA die Konzentrationen einzelner Proteine bestimmt werden.

In jedes Well der Platten wurden 350µl eines in PBS verdünnten Proteaseinhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Roche) gegeben, um die Proteine vor Degradierung zu schützen. Anschließend wurden die Zellen mechanisch mit einem Gummischaber vom Untergrund abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in die Eppendorfgefäße überführt, in denen zuvor das Zellpellet aus den Überständen abzentrifugiert wurde. Diese wurden wieder mit 4000rpm bei 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Hierbei setzte sich ein deutlich größeres Zellpelett am Boden der Eppendorfgefäße ab. Dieses wurde in je 50µl in RIPA-Puffer (mit Phosphatase/Protease Inhibitor Cocktail, Roche) resuspendiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension für 10 Sekunden sonifiziert, um die Zellwände aufzubrechen ohne die Zellen potentiell schädigenden Detergenzien auszusetzen (10 Sekunden bei 30% Intensität, Gerät Sonoplus von Bandelin). Die so gewonnen Zelllysate wurden bis zum Absinken des Schaumes ruhen gelassen, um sie dann dem BCA-Test zu unterziehen.

II.5.6 Proteinbestimmung der Zelllysate

Um die später gemessenen Adipokin-Konzentrationen der Zellkulturversuche miteinander vergleichen zu können, müssen diese auf die Menge des Gesamtproteins der Zellen normiert werden. Hierzu wird eine Proteinbestimmung der Zelllysate vorgenommen.

II.5.6.1 Prinzip des BCA-Tests

Mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Tests kann die Proteinkonzentration in Zelllysaten quantifiziert werden. Hierbei reduzieren Peptidbindungen und Aminosäuren Cu^{2+} zu Cu^+ . Die einwertigen Kupferionen bilden mit Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562nm hat. Dies kann in einem Spektralphotometer gemessen werden. Optisch ist ein Farbumschlag von grün zu violett zu beobachten. Außerdem wird eine Standardreihe aus Albumin-Lösungen erstellt und deren Reaktion mit Bicinchoninsäure gemessen. Die Absorption der zu quantifizierenden Probe wird mit der Standardkurve verglichen, sodass die genaue Proteinkonzentration ermittelt werden kann.

II.5.6.2 Durchführung des BCA-Tests

Nach Protokoll des Herstellers (Pierce, Thermo Fischer) wurden pro Well zu 10 μl des Lysats 100 μl des BCA-Working Reagent (Lösungen A und B in einem Mischungsverhältnis von 50:1) auf eine 96-Well ELISA-Platte pipettiert. Um eine Standardkurve zu erhalten, wurden von einer Verdünnungsreihe von Albumin (Konzentrationsbereich 15.63-2000ng/ml) je 10 μl und je 100 μl des BCA-Working-Reagent gemeinsam in ein Well pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Von jedem Lysat wurde eine dreifache Bestimmung und von jedem Standard eine zweifache Bestimmung durchgeführt, um ein möglichst genaues Ergebnis zu erzielen. Im ELISA-Reader konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen werden. Anhand der Standardkurve konnte die genaue Protein-Konzentration bestimmt werden.

II.5.7 Bestimmung der Zytotoxizität

Abgestorbene Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, würden die Proteinmessungen verfälschen. Durch Bestimmung der Zytotoxizität muss daher vor der

Bestimmung der Adipokin-Konzentrationen ausgeschlossen werden, dass zu viele Zellen abgestorben sind. Außerdem darf sich die Anzahl der abgestorbenen Zellen in dem Kontrollversuch nicht von dem Stimulationsversuch unterscheiden. Dies wurde mit dem Laktatdehydrogenase (LDH)-Test überprüft.

II.5.7.1 Prinzip der LDH-Methode

Die LDH ist eine ubiquitär vorkommende Oxidoreduktase und ein Enzym der anaeroben Glykolyse. Sie katalysiert reversibel den Reaktionsschritt von Pyruvat und NADH_2 zu Laktat und NAD (*Nicotinamidadeninukleotid*). Die LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 140kDa und kann bei intakter Zellmembran diese nicht überwinden. Kommt es durch den Einfluss von Noxen, wie es die in den beschriebenen Stimulationsexperimenten verwendeten Substanzen potentiell sein könnten, zu einer Schädigung der Membranintegrität, kann die LDH die Zellmembran überschreiten und ihre Aktivität kann extrazellulär gemessen werden. Das verwendete Working-Reagent enthält den Katalysator Diaphorase und das Tetrazolium-Salz INT. Unter der Oxidation von NADH_2 zu NAD, wird das Tetrazolium-Salz durch die LDH zu Formazan-Salz reduziert. Dadurch verändert sich das Absorptionsmaximum, was durch den ELISA-Reader messbar ist. Optisch ist ein Farbänderung zu rot zu erkennen. Der Umsatz des Salzes durch die LDH ist direkt proportional zu deren Konzentration im Zellüberstand und somit zur Menge an abgestorbenen Zellen.

II.5.7.2 Durchführung des LDH-Tests

Aus den zuvor gewonnenen Überständen wurde durch die LDH-Methode die Zelltoxizität bestimmt. Hierzu wurden nach Protokoll des Herstellers (Roche) pro Well 25 μl der Probe, 25 μl des DMEM beziehungsweise des DMEM/F-12 Mediums und 50 μl des LDH-Working-Reagent (Lösung A und B in einem Mischungsverhältnis von 1:45) in ein Well einer 96-Well ELISA-Platte pipettiert. Zur Kontrolle wurde ein Blank mit DMEM beziehungsweise DMEM/F-12 Medium anstatt einer Probe mitgemessen. Anschließend wurde es bei Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert. Im ELISA-Reader konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen werden.

Es wurden nur Überstände für die Adipokin-Bestimmung verwendet, deren LDH-Werte sich nicht signifikant von der Kontrolle ohne Stimulanz unterschieden, um einen Einfluss einer zytotoxischen Wirkung der Stimulanzen auf die Adipokin-Expression oder -Sekretion auszuschließen.

II.5.8 Bestimmung der Adipokin-Konzentrationen aus Überständen

Die Konzentrationen der Adipokine Resistin und Progranulin konnten in den Überständen der Zellkulturversuche mittels ELISA im Duplikat gemessen werden. Die Durchführung des ELISAs erfolgte wie oben unter Punkt II.4 bereits beschrieben. Hierbei wurden etablierte ELISA-Kits für murines Resistin und Progranulin verwendet (DuoSet ELISA-Kits, R&D Systems).

II.6 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des SPSS-Programms in der Version 22 durchgeführt. Die Korrelationsanalysen der numerischen Variablen wurden mit dem bivariaten Spearman-Test durchgeführt, da bei den gemessenen Parametern von einem nicht-linearen, monotonen Zusammenhang ausgegangen wurde. Aufgrund der Nominalskalierung der klassifizierten Parameter, die hier die unabhängige Variable darstellen, wurde für die Berechnung ihrer Korrelation eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem ANOVA-Test (*analysis of variance*) durchgeführt. Die Mittelwertvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test angestellt, da die abhängigen Variablen, zum Beispiel die Adipokin-Konzentrationen, nicht als normalverteilt vorausgesetzt werden können. In den betreffenden Abbildungen werden, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte mit dem doppelten Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM; repräsentiert durch Fehlerbalken) gezeigt.

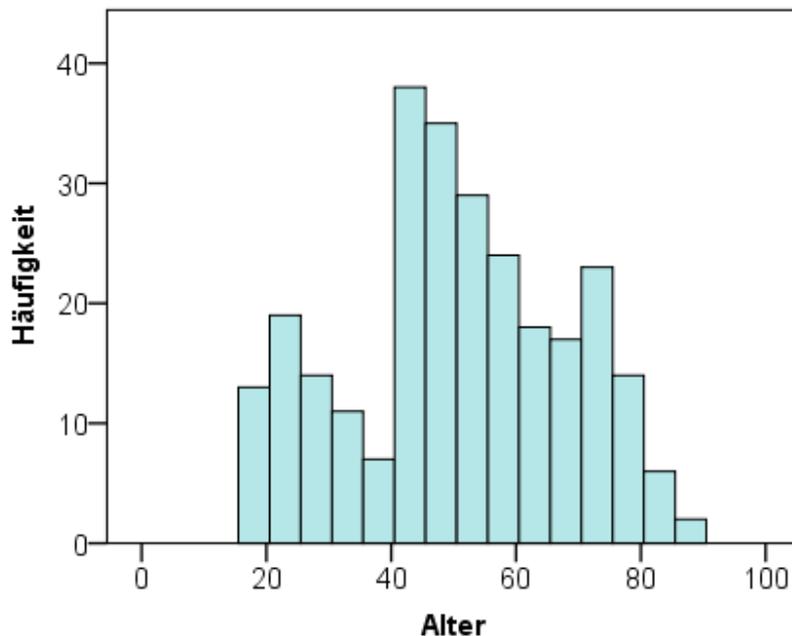
Des Weiteren wurden partielle Korrelationen bei einzelnen numerischen Parametern durchgeführt.

Als signifikant wurden p-Werte von unter 0.05 erachtet.

III Ergebnisse

III.1 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv bestand aus insgesamt $n = 270$ Patienten. Diese waren im Mittel 50.6 Jahre alt mit einer Standardabweichung (SD) von ± 17.5 Jahren und einer Streuung von 18 bis 90 Jahren. Die Altersverteilung zeigte einen zweigipfligen Verlauf (**Abbildung III.1.1**) mit dem ersten Gipfel bei 20-25 Jahren und dem zweiten bei 40-45 Jahren. Unter den Probanden befanden sich 110 männliche und 160 weibliche Personen.



6: **Abbildung III.1.1:** Altersverteilung der Studienteilnehmer

Der BMI der Studienteilnehmer lag durchschnittlich bei 26.6 kg/m^2 (17.4 bis 47.7 kg/m^2). Die BMI-Werte wurden in normal- ($< 25.0 \text{ kg/m}^2$) und übergewichtig ($\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$) unterteilt. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung mit 130 nicht-adipösen und 133 adipösen Probanden. Um eine genauere Einteilung der BMI-Gruppen vorzunehmen, wurden die Werte auch nach der Gewichtsklassifikation der WHO eingeteilt. Auf die erste Gruppe $< 18.5 \text{ kg/m}^2$ entfielen 3.3%, auf die Gruppe zwischen 18.5 und 24.9 kg/m^2 44.8%, auf 25.0 bis 29.9 kg/m^2 27.8%, auf 30.0 bis 34.9 kg/m^2 12.6%, auf 35.0 bis 39.9 kg/m^2 5.2% und auf $> 40 \text{ kg/m}^2$ 0.7% der Teilnehmer.

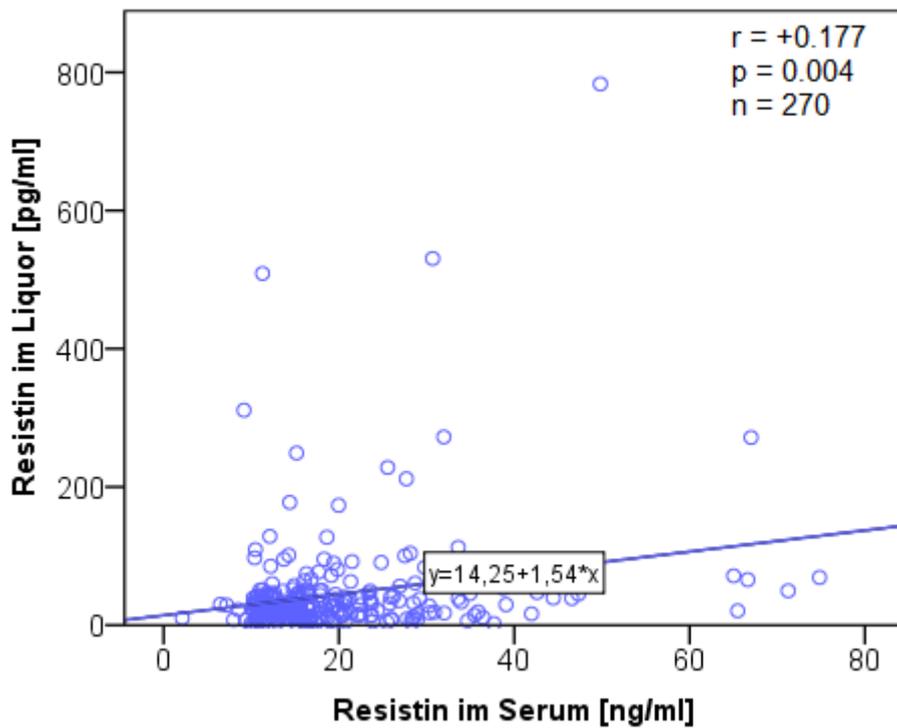
Im Serum ergab die Messung der für den Kohlenhydratstoffwechsel relevanten Parameter einen Glukosewert von $113 \pm 38 \text{ mg/dl}$ und einen HbA1c-Wert von $6.0 \pm 0.9 \%$. Unter den 270 Teilnehmern der Studie befanden sich 31 Personen mit Diabetes mellitus (Typ 1 und 2). Unter den Biomarkern für den Lipidstoffwechsel betragen das

Gesamtcholesterin im Mittel 202 ± 43 mg/dl, das LDL-Cholesterin 130 ± 42 mg/dl, das HDL-Cholesterin 55 ± 15 mg/dl und die Triglyzeride 140 ± 86 mg/dl. Im kleinen Blutbild lagen die Mittelwerte bei den Thrombozyten bei 260 ± 79 giga/l, beim Hämoglobin bei 143 ± 16 g/l und bei den Leukozyten bei 7.7 ± 2.7 giga/l. Als weiterer Entzündungsparameter wurde das CRP mit einem Mittelwert von 6.5 ± 16.5 mg/l und einer Streuung von 0.5 bis 149.0 mg/l erhoben. Die Serumwerte zeigten im Mittel einen Eiweißgehalt von 74 ± 6 g/l, einen Albuminwert von 41.9 ± 4.8 g/l und einen Kreatininwert von 0.98 ± 0.22 mg/dl.

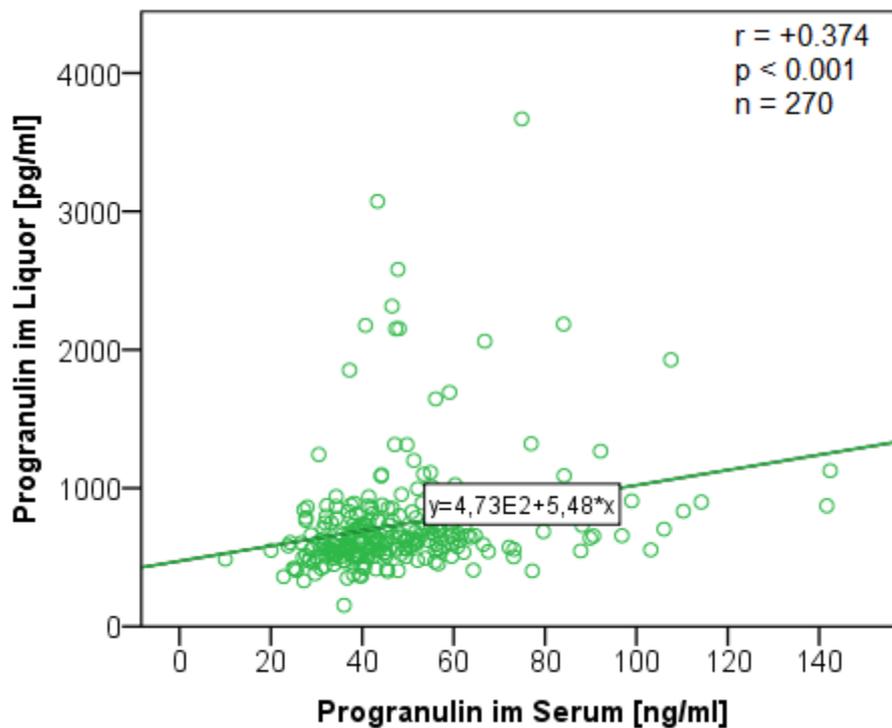
Im Liquor betragen im Mittel die Zellzahl 9 ± 37 / μ l mit einer Streuung von 0 bis 352 / μ l, der Eiweißgehalt 0.520 ± 0.281 g/l, der Albuminwert 0.277 ± 0.158 g/l, der Laktatwert 1.87 ± 0.36 mmol/l und der IgG-Spiegel 0.0461 ± 0.0545 g/l.

Auch die Konzentrationen der gemessenen Adipokine Resistin und Progranulin in Serum und Liquor wurden ermittelt. Beim Resistin zeigten sich im Serum Werte von 19.5 ± 11.2 ng/ml mit einer Streuung von 2.1 bis 74.8 ng/ml. Im Liquor lagen die Resistin-Konzentrationen lediglich bei 112 Proben im messbaren Bereich von ≥ 31.2 pg/ml. In diesem Bereich ergaben sich Mittelwerte von 82.5 ± 9.9 pg/ml mit einer Spannweite von 31.2 bis 783.3 pg/ml. Daraus ergab sich im Mittel ein **Liquor-/ Serum-Quotient für Resistin in diesen 112 Proben von $4.4 \cdot 10^{-3} \pm 5.8 \cdot 10^{-3}$** mit einer Spannweite von $0.7 \cdot 10^{-3}$ bis $45.1 \cdot 10^{-3}$. Für Progranulin betragen die Mittelwerte im Serum 48.7 ± 18.9 ng/ml mit einer Streuung von 10.0 bis 142.4 ng/ml. Im Liquor lagen alle gemessenen Konzentrationen im messbaren Bereich mit einem Mittel von 740.3 ± 408.5 pg/ml und einer Streuung von 153.1 bis 3668.5 pg/ml. Damit konnte der **Liquor-/ Serum-Quotient für Progranulin mit einem Mittelwert von $16.3 \cdot 10^{-3} \pm 8.6 \cdot 10^{-3}$** und einer Streuung von $4.3 \cdot 10^{-3}$ bis $70.9 \cdot 10^{-3}$ berechnet werden.

Dieser Liquor-/ Serum-Quotient gibt das Verhältnis der Liquorkonzentration und der Serumkonzentration der Adipokine an und stellt ein Maß für die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke für Adipokine dar. Die Erfassung eines solchen Quotienten ist hier erstmalig beschrieben und nur in einem großen Studienkollektiv, wie hier vorliegend, möglich.



7: **Abbildung III.1.2:** Korrelationsanalyse zwischen Resistin in Serum und Liquor



8: **Abbildung III.1.3:** Korrelationsanalyse zwischen Progranulin in Serum und Liquor

Die aktuellen neurologischen Diagnosen der Patienten zum Zeitpunkt der Liquorentnahme wurden in sieben Untergruppen eingeteilt. Wie unter II.3 bereits beschrieben, fanden sich hierbei 13 Patienten mit einer infektiösen Erkrankung des zentralen Nervensystems, 42 Patienten mit Multipler Sklerose, 22 Patienten mit vaskulärer Erkrankung, 26 Patienten mit Epilepsie, 26 Patienten mit Kopf- oder Gesichtsschmerz, 49 Patienten mit einer Neuropathie oder einer Hirnnervenparese und 92 weitere Patienten mit sehr heterogenen Krankheitsbildern, die als Gruppe „andere“ zusammengefasst wurden. Die Verteilung der neurologischen Diagnosen ist auch in **Abbildung III.1.4** dargestellt.

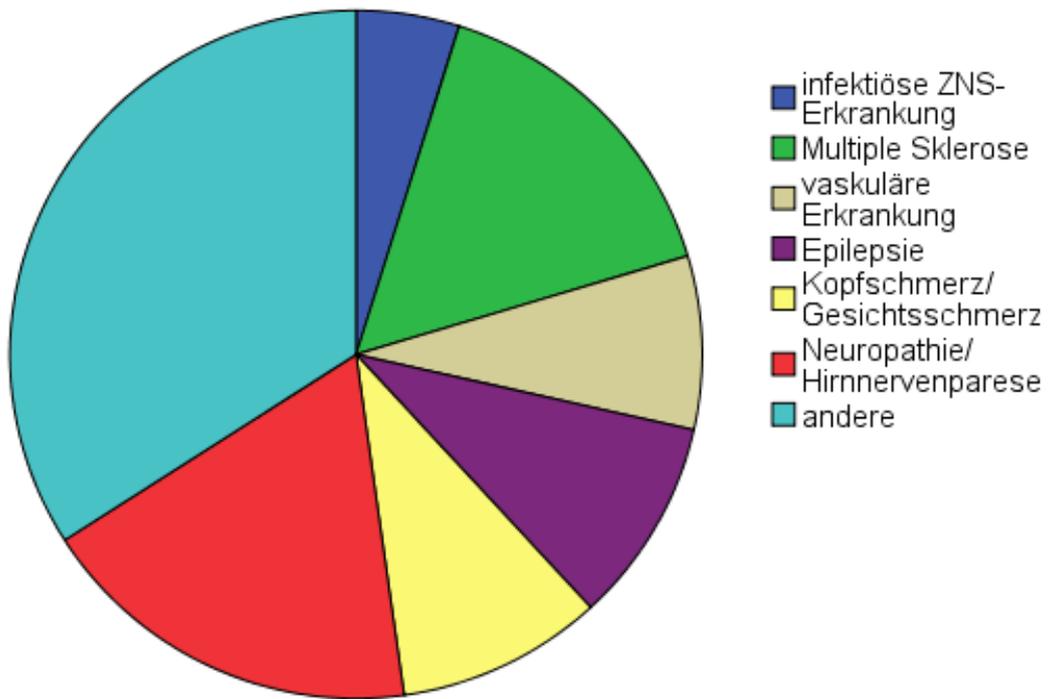
Die Charakteristika der Studienteilnehmer sind **Tabelle III.1.1** zu entnehmen.

Studienteilnehmer (n=270)	
Alter [Jahre]	50.6 ± 17.5 [18-90]
männlich n (%)	110 (40.7)
weiblich n (%)	160 (59.3)
Anthropometrische Daten	
BMI-Gruppen [kg/m ²]	26.6 ± 5.1 [17.4-47.7]
BMI < 18.5 kg/m ² n (%)	9 (3.3)
BMI 18.5 – 24.9 kg/m ² n (%)	121 (44.8)
BMI 25.0 – 29.9 kg/m ² n (%)	75 (27.8)
BMI 30.0 – 34.9 kg/m ² n (%)	34 (12.6)
BMI 35.0 – 39.9 kg/m ² n (%)	14 (5.2)
BMI ≥ 40.0 kg/m ² n (%)	2 (0.7)
BMI < 25.0 kg/m ² n (%)	130 (48.1)
BMI ≥ 25.0 kg/m ² n (%)	133 (49.3)
Kohlenhydratstoffwechsel	
Glucose [mg/dl]	113 ± 38 [64-289]
HbA1c [%]	6.0 ± 0.9 [5.2-10.4]
Bekannte Vorerkrankung: Diabetes mellitus n (%)	31 (11.5)
Lipidstoffwechsel	
Gesamtcholesterin [mg/dl]	202 ± 43 [105-333]
LDL-Cholesterin [mg/dl]	130 ± 42 [40-232]
HDL-Cholesterin [mg/dl]	55 ± 15 [22-93]
Triglyzeride [mg/dl]	140 ± 86 [29-605]
Entzündungsparameter	
CRP [mg/l]	6.5 ± 16.5 [0.5-149.0]
Leukozyten [giga/l]	7.7 ± 2.7 [3.3-19.9]
Kleines Blutbild	
Thrombozyten [giga/l]	260 ± 79 [83-724]
Haemoglobin [g/l]	143 ± 16 [96-198]

Serumparameter	
Eiweiß [g/l]	74 ± 6 [55-98]
Albumin [g/l]	41.9 ± 4.8 [17.8-53.2]
Kreatinin [mg/dl]	0.98 ± 0.22 [0.40-2.30]
Liquorparameter	
Zellzahl [/µl]	9 ± 37 [0-352]
Eiweiß [g/l]	0.520 ± 0.281 [0.176-2.700]
Albumin [g/l]	0.277 ± 0.158 [0.093-1.500]
Laktat [mmol/l]	1.87 ± 0.36 [1.25-3.47]
IgG [g/l]	0.0461 ± 0.0545 [0.0118-0.4140]
Adipokine	
Resistin im Serum [ng/ml] (n = 270)	19.5 ± 11.2 [2.1-74.8]
Resistin im Liquor [pg/ml] (n = 112)	82.5 ± 9.9 [31.2-783.3]
Resistin: Liquor/Serum-Quotient (n = 112)	$4.4 \cdot 10^{-3} \pm 5.8 \cdot 10^{-3}$ [$0.7 \cdot 10^{-3}$ - $45.1 \cdot 10^{-3}$]
Progranulin im Serum (ng/ml) (n = 270)	48.7 ± 18.9 [10.0-142.4]
Progranulin im Liquor (pg/ml) (n = 270)	740.3 ± 408.5 [153.1-3668.5]
Progranulin: Liquor/Serum-Quotient (n = 270)	$16.3 \cdot 10^{-3} \pm 8.6 \cdot 10^{-3}$ [$4.3 \cdot 10^{-3}$ - $70.9 \cdot 10^{-3}$]
Neurologische Diagnosen	
Infektiöse ZNS-Erkrankung n (%)	13 (4.8)
Multiple Sklerose n (%)	42 (15.6)
Vaskuläre Erkrankung Ursache n (%)	22 (8.1)
Epilepsie n (%)	26 (9.6)
Kopfschmerz/ Gesichtsschmerz n (%)	26 (9.6)
Neuropathie/ Hirnnervenparese n (%)	49 (18.1)
Andere n (%)	92 (34.1)

6: **Tabelle III.1.1:** Die Tabelle charakterisiert das Studienkollektiv bezüglich verschiedener anthropometrischer Daten, Serumparametern, Liquorparametern und neurologischen Diagnosen.

Bei numerischen Variablen sind Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima angegeben. Bei klassifizierten Parametern sind die absoluten und prozentualen Häufigkeiten angegeben.



9: **Abbildung III.1.4:** Verteilung der neurologischen Diagnosen

III.2 Resistin und Progranulin in Serum und Liquor

Im Folgenden wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Adipokin-Konzentrationen im Serum beziehungsweise im Liquor auf geschlechtsbezogene und BMI-bezogene Unterschiede hin untersucht. Dazu wurden die Mittelwerte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests miteinander verglichen. Angegeben sind minimaler Wert (*Min.*), maximaler Wert (*Max.*), Mittelwert (*MW*), Standardfehler (*SEM*), Standardabweichung (*SD*) und Varianz (*Var.*).

Für die Resistin-Konzentration im Serum ergab sich ein Mittelwert von 19.5 ± 11.2 ng/ml. Bei den männlichen Probanden lag er bei 17.4 ± 9.9 ng/ml, wohingegen er bei den weiblichen Probanden bei 20.9 ± 11.8 ng/ml lag ($p= 0.003$). In der Unterteilung in die Gruppen normal- ($BMI < 25$ kg/m²) und übergewichtig ($BMI \geq 25$ kg/m²) zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit einem Mittelwert von 19.5 ± 10.8 ng/ml in der normalgewichtigen und einem Mittelwert von 19.2 ± 10.9 ng/ml in der übergewichtigen Gruppe. Die genauen Ergebnisse zeigt **Tabelle III.2.1a**. Bei den Progranulin-Konzentrationen im Serum ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern oder zwischen den BMI-Gruppen (**Tabelle III.2.1b**). Auch bei den Resistin (**Tabelle III.2.1c**) und Progranulin-Konzentrationen (**Tabelle III.2.1d**) im Liquor bestanden keine signifikanten Geschlechts- und BMI-abhängigen Unterschiede. Auch hier wurden nur diejenigen Resistin-Konzentrationen im Liquor verwendet, die über der Nachweisgrenze von ≥ 31.2 pg/ml lagen.

		Resistin im Serum [ng/ml]					
		Min.	Max.	MW	SEM	SD	Var.
Gesamt-Kollektiv (n = 270)		2.1	74.8	19.5	0.7	11.2	125.0
Geschlecht	m (n = 110)	2.1	74.8	17.4*	0.9	9.9	97.5
	w (n = 160)	6.5	71.3	20.9*	0.9	11.8	139.4
BMI	< 25 kg/m ² (n = 130)	7.2	67.0	19.5	0.9	10.8	115.5
	≥ 25 kg/m ² (n = 133)	2.1	74.8	19.2	1.0	10.9	118.8

7: **Tabelle III.2.1a:** Deskriptive Statistik für die im Serum gemessenen Resistin-Werte [ng/ml].

* Statistische Signifikanz errechnet mittels des Mann-Whitney-U-Test ($p = 0.003$)

		Progranulin im Serum [ng/ml]					
		Min.	Max.	MW	SEM	SD	Var.
Gesamt-Kollektiv (n = 270)		10.0	142.4	48.7	1.2	18.9	357.2
Geschlecht	m (n = 110)	22.8	114.2	46.1	1.4	14.8	219.6
	w (n = 160)	10.0	142.4	50.5	1.7	21.1	445.7
BMI	< 25 kg/m ² (n = 130)	10.0	110.3	47.8	1.5	17.1	291.8
	≥ 25 kg/m ² (n = 133)	22.8	142.4	49.6	1.8	20.7	427.8

8: **Tabelle III.2.1b:** Deskriptive Statistik für die im Serum gemessenen Progranulin-Werte [ng/ml].

		Resistin im Liquor [pg/ml]					
		Min.	Max.	MW	SEM	SD	Var.
Teil-Kollektiv (n = 112)		31.2	783.3	82.5	9.9	104.6	10931.1
Geschlecht	m (n = 44)	31.2	271.6	70.3	8.7	57.9	3349.8
	w (n = 68)	31.2	783.3	90.4	15.2	125.7	15799.3
BMI	< 25 kg/m ² (n = 50)	31.2	311.0	73.4	8.5	59.8	3577.3
	≥ 25 kg/m ² (n = 58)	31.3	783.3	83.9	16.0	122.1	14898.3

9: **Tabelle III.2.1c:** Deskriptive Statistik für die im Liquor gemessenen Resistin-Werte [pg/ml]. Es wurden nur die über der Nachweisgrenze von ≥ 31.2 pg/ml liegenden Werte berücksichtigt (n = 112).

		Progranulin im Liquor [pg/ml]					
		Min.	Max.	MW	SEM	SD	Var.
Gesamt-Kollektiv (n = 270)		153.1	3668.5	740.3	24.9	408.5	166866.1
Geschlecht	m (n = 110)	153.1	3668.5	751.9	43.0	451.2	203543.4
	w (n = 160)	329.2	2580.6	732.3	29.9	377.7	142615.9
BMI	< 25 kg/m ² (n = 130)	329.2	3668.5	750.8	38.2	435.3	189522.7
	≥ 25 kg/m ² (n = 133)	153.1	3072.5	729.1	32.1	370.1	137001.0

10: **Tabelle III.2.1d**: Deskriptive Statistik für die im Liquor gemessenen Progranulin-Werte [pg/ml].

Mit Hilfe des Spearman-Tests wurden Korrelationsanalysen zwischen den Resistin-Konzentrationen im Serum und verschiedenen numerischen Variablen aus der SPSS-Datenbank durchgeführt.

Dabei ergab sich eine signifikante positive Korrelation mit der Progranulin-Konzentration im Serum ($p= 0.002$, $r= +0.186$). Auch zu den Thrombozyten ($p= 0.005$, $r= + 0.174$) und zum LDL-Cholesterin ($p= 0.002$, $r= +0.389$) korrelierte das Resistin im Serum positiv, wohingegen es mit dem Hämoglobin negativ korrelierte ($p= 0.001$, $r= -0.204$). Im Zusammenhang mit den Entzündungsparametern im Serum bestand sowohl bei den Leukozyten ($p < 0.001$, $r = +0.261$), als auch beim CRP ($p= 0.001$, $r= +0.195$) und den Immunglobulinen IgM ($p= 0.028$, $r= +0.252$) und IgG ($p= 0.014$, $r= +0.149$) jeweils eine positive Korrelation. Ferner ließen sich signifikante positive Korrelationen mit Liquorkonzentrationen von Resistin ($p= 0.004$, $r= +0.177$), Progranulin ($p= 0.015$, $r= +0.149$) und dem Immunglobulin IgM ($p= 0.008$, $r= +0.300$), IgG ($p= 0.008$, $r= +0.162$) und IgA ($p= 0.007$, $r= +0.305$) beobachten (**Tabelle III.2.2**).

Numerische Variable	Resistin im Serum [ng/ml]	
	p	r
Alter [a]	0.20	- 0.08
BMI [kg/m ²]	0.79	+ 0.02
Serum:		
Progranulin [ng/ml]	0.002*	+ 0.186
Leukozyten [giga/l]	< 0.001*	+ 0.261
Thrombozyten [giga/l]	0.005*	+ 0.174
Hämoglobin [g/l]	0.001*	- 0.204
Gesamtcholesterin [mg/dl]	0.06	+ 0.16
Triglyceride [mg/dl]	0.24	+ 0.10
LDL-Cholesterin [mg/dl]	0.002*	+ 0.389
HDL-Cholesterin [mg/dl]	0.33	- 0.13
Glucose [mg/dl]	0.17	+ 0.12
HbA1c [%]	0.84	- 0.02
Kreatinin [mg/dl]	0.48	+ 0.04
Harnstoff [mg/dl]	0.37	- 0.06
Harnsäure [mg/dl]	0.97	+ 0.00
LDH [U/l]	0.13	- 0.12
GOT [U/l]	0.85	+ 0.01
GPT [U/l]	0.81	- 0.02
Cholinesterase [U/l]	0.38	- 0.08
Bilirubin gesamt [mg/dl]	0.44	- 0.09
Gesamtprotein [g/l]	0.92	- 0.01
Albumin [g/l]	0.25	- 0.07
CRP [mg/l]	0.001*	+ 0.195
IgG [g/l]	0.014*	+ 0.149
IgA [g/l]	0.17	+ 0.16

IgM [g/l]	0.028*	+ 0.252
Liquor:		
Resistin [pg/ml]	0.004*	+ 0.177
Progranulin [pg/ml]	0.015*	+ 0.149
Zellzahl [/ μ l]	0.47	+ 0.05
Gesamteiweiß [g/l]	0.26	+ 0.07
Albumin [g/l]	0.25	+ 0.07
Ferritin [ng/ml]	0.50	+ 0.13
Lactat [mmol/l]	0.40	+ 0.05
IgG [g/l]	0.008*	+ 0.162
IgA [g/l]	0.007*	+ 0.305
IgM [g/l]	0.008*	+ 0.300

11: **Tabelle III.2.2:** Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Resistin im Serum und numerischen Variablen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Die Korrelationsanalysen zwischen den Adipokinen und den klassifizierten Parametern wurden mit dem ANOVA-Test durchgeführt.

Bei den Berechnungen mit Resistin im Serum und den klassifizierten Parametern bestätigte sich der signifikante Unterschied zwischen Männern und Frauen ($p= 0.010$), der auch im Mann-Whitney-U-Test gezeigt wurde. Bei allen anderen klassifizierten Parametern bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Subgruppen (**Tabelle III.2.3**).

Klassifizierte Parameter	Resistin im Serum
	p
Geschlecht (m/w)	0.010*
BMI ¹ (6 Gruppen)	0.29
BMI ² (2 Gruppen)	0.83
Oligoklonale Banden	0.16
Grad der Schrankenstörung ³	0.97
Beurteilung aus Liquorlabor ⁴	0.91
KHK	0.58
Diabetes mellitus Typ 1/ 2	0.73
Arterielle Hypertonie	0.33
Hypercholesterinämie	0.91
Neurologische Diagnosen	0.068
Andere Vorerkrankungen	0.19
Nikotinkonsum	0.22
Hormonelle Antikonzeption	0.90
Gabe von L-Thyroxin	0.14
Gabe von Simvastatin/ Pravastatin	0.46

12: **Tabelle III.2.3:** Korrelationsanalyse mittels des ANOVA-Tests zwischen Resistin im Serum und klassifizierten Parametern.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

1: Gewichtsklassifikation anhand des BMI nach WHO. 2000

2: Gewichtsklassifikation anhand des BMI: $< 25 \text{ kg/m}^2$ und $\geq 25 \text{ kg/m}^2$

3: Eingeteilt mit Hilfe des Albumin-Liquor/Serum-Quotienten in keine ($n = 214$) ($< 6,5 \cdot 10^{-3}$ bis 40 Jahre, $< 8 \cdot 10^{-3}$ bis 60 Jahre), leichte ($n = 22$) ($< 10 \cdot 10^{-3}$), mittelschwere ($n = 32$) ($< 20 \cdot 10^{-3}$) und schwere ($n = 2$) ($> 20 \cdot 10^{-3}$) Schrankenstörung

4: Beurteilungen des Liquors eingeteilt in: keine weitere Beurteilung (n = 206), entzündlicher Prozess (n= 16), chronische ZNS-Erkrankung (n = 4), chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung (n = 20), infektiöse ZNS-Erkrankung (n = 8), vaskuläre Störung (n = 2), Ausschluss (n = 3), andere (n =11)

Es wurden ebenfalls die Progranulin-Konzentrationen im Serum und die numerischen Variablen einer Korrelationsanalyse nach Spearman unterzogen.

Hierbei zeigte sich vergleichbar zu den Berechnungen für das Resistin im Serum eine signifikante positive Korrelation zum LDL-Cholesterin ($p= 0.002$, $r= +0.375$). Außerdem korrelierten auch die HbA1c-Werte ($p= 0.021$, $r= +0.226$) und das Gesamtprotein ($p= 0.016$, $r= +0.202$) positiv zum Progranulin im Serum. Im Zusammenhang mit den Entzündungsparametern im Serum ergab sich lediglich eine positive Korrelation zum CRP ($p= 0.024$, $r= +0.139$) und dem IgG ($p= 0.002$, $r= +0.185$), im Vergleich zum Resistin im Serum jedoch nicht zu den Leukozyten oder dem IgM.

Des Weiteren ließ sich mit dem Progranulin im Serum sowohl eine signifikant positive Korrelation zum Progranulin ($p < 0.001$, $r= +0.374$) als auch zum Resistin ($p= 0.010$, $r= +0.138$) im Liquor nachweisen. Auch im Liquor ergab sich eine positive Korrelation zum IgG ($p= 0.024$, $r= +0.138$), jedoch nicht mit dem IgM, vergleichbar zu Resistin im Serum (**Tabelle III.2.2**). Eine Zusammenfassung der gesamten Korrelationsanalyse für die Progranulin-Konzentrationen im Serum zeigt **Tabelle III.2.4**.

Numerische Variable	Progranulin im Serum [ng/ml]	
	p	r
Alter [a]	0.95	0
BMI [kg/m ²]	0.30	+ 0.07
Serum:		
Resistin [ng/ml]	0.002*	+ 0.186
Leukozyten [giga/l]	0.57	+ 0.04
Thrombozyten [giga/l]	0.67	+ 0.03
Hämoglobin [g/l]	0.85	- 0.01
Gesamtcholesterin [mg/dl]	0.08	+ 0.15
Triglyceride [mg/dl]	0.19	+ 0.11
LDL-Cholesterin [mg/dl]	0.002*	+ 0.375
HDL-Cholesterin [mg/dl]	0.75	+ 0.04
Glucose [mg/dl]	0.41	+ 0.07
HbA1c [%]	0.021*	+ 0.226

Kreatinin [mg/dl]	0.08	+ 0.11
Harnstoff [mg/dl]	0.26	- 0.07
Harnsäure [mg/dl]	0.48	+ 0.06
LDH [U/l]	0.53	+ 0.05
GOT [U/l]	0.19	+ 0.09
GPT [U/l]	0.46	+ 0.05
Cholinesterase [U/l]	0.50	+ 0.06
Bilirubin gesamt [mg/dl]	0.35	+ 0.11
Gesamtprotein [g/l]	0.016*	+ 0.202
Albumin [g/l]	0.20	- 0.08
CRP [mg/l]	0.024*	+ 0.139
IgG [g/l]	0.002*	+ 0.185
IgA [g/l]	0.08	+ 0.20
IgM [g/l]	0.86	- 0.02
Liquor:		
Resistin [pg/ml]	0.010*	+ 0.156
Progranulin [pg/ml]	< 0.001*	+ 0.374
Zellzahl [/ μ l]	0.30	- 0.06
Gesamteiweiß [g/l]	0.41	+ 0.05
Albumin [g/l]	0.83	+ 0.01
Ferritin [ng/ml]	0.32	+ 0.19
Lactat [mmol/l]	0.68	+ 0.03
IgG [g/l]	0.024*	+ 0.138
IgA [g/l]	0.11	+ 0.18
IgM [g/l]	0.23	+ 0.14

13: **Tabelle III.2.4:** Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Progranulin im Serum und numerischen Variablen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Bei der Korrelationsanalyse zwischen Progranulin im Serum und den klassifizierten Parametern ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen berechnen (Daten nicht gezeigt).

Da bei der Korrelationsanalyse nach Spearman bei Resistin und Progranulin im Serum besonders die signifikante positive Korrelation zum LDL-Cholesterin aufgefallen war, wurden für beide Parameter partielle Korrelationsanalysen zum Ausschluss potentieller Störvariablen durchgeführt. Die partielle Korrelation zwischen Resistin im Serum und dem LDL-Cholesterin war auch unter kumulativer Berücksichtigung der potentiellen Störvariablen Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und CRP signifikant ($p= 0.025$), nicht jedoch bei zusätzlicher Korrektur für die Störvariable Gesamtprotein ($p= 0.31$). Bei der Korrektur für das Gesamtprotein als alleinige Störvariable bei der Korrelation zwischen Resistin und LDL-Cholesterin, blieb der Zusammenhang hingegen signifikant ($p= 0.016$) (**Tabelle III.2.5**).

Kontrollvariablen	Resistin [ng/ml] und LDL-Cholesterin [mg/dl] im Serum
	p
Keine (n = 63)	0.002*
Geschlecht (n = 63)	< 0.001*
Geschlecht und Alter (n = 63)	< 0.001*
Geschlecht, Alter und BMI (n = 47)	0.007*
Geschlecht, Alter, BMI und Leukozyten (n = 46)	0.018*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten und Thrombozyten (n = 46)	0.019*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin (n = 46)	0.014*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und CRP (n = 46)	0.025*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP und Gesamtprotein (n = 30)	0.31
Gesamtprotein (n = 36)	0.016*

14: **Tabelle III.2.5:** Partielle Korrelationsanalyse zwischen Resistin und LDL-Cholesterin im Serum mit Kontrolle für potentielle Störvariablen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

Eine analoge partielle Korrelationsanalyse wurde für Progranulin und LDL-Cholesterin im Serum durchgeführt. Die signifikante Korrelation blieb unter Kontrolle der Störvariablen Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und CRP erhalten ($p= 0.010$), nicht jedoch bei Kontrolle für das Gesamtprotein als zusätzliche Störvariable ($p= 0.43$). Bei einer partiellen Korrelationsanalyse mit der alleinigen Störvariable Gesamtprotein bestand ein knapp signifikanter Zusammenhang zwischen Progranulin und LDL-Cholesterin im Serum ($p= 0.048$) (**Tabelle III.2.6**).

Kontrollvariablen	Progranulin [ng/ml] und LDL-Cholesterin [mg/dl] im Serum
	p
Keine (n = 63)	0.002*
Geschlecht (n = 63)	0.001*
Geschlecht und Alter (n = 63)	0.001*
Geschlecht, Alter und BMI (n = 47)	0.002*
Geschlecht, Alter, BMI und Leukozyten (n = 46)	0.001*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten und Thrombozyten (n = 46)	0.002*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin (n =46)	0.004*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und CRP (n = 46)	0.010*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP und Gesamtprotein (n = 30)	0.43
Gesamtprotein (n = 36)	0.048*

15: **Tabelle III.2.6:** Partielle Korrelationsanalyse zwischen Progranulin und LDL-Cholesterin im Serum unter Berücksichtigung potentieller Störvariablen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

Da Resistin und Progranulin im Serum in der partiellen Korrelationsanalyse mit LDL-Cholesterin ein sehr ähnliches Muster hinsichtlich potentieller Störvariablen aufwiesen, wurde auch der Zusammenhang zwischen Resistin und Progranulin im Serum einer partiellen Korrelationsanalyse unterzogen. Hierbei blieb der signifikante Zusammenhang zwischen Progranulin und Resistin im Serum auch bei Kontrolle für die potentiellen Störvariablen Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP, IgM und IgG erhalten ($p=0.010$). Die Signifikanz zwischen Progranulin und Resistin blieb auch erhalten, als das Gesamtprotein anstatt der beiden Immunglobuline den Störvariablen hinzugefügt wurde ($p=0.001$). Bei einer zusätzlichen Kontrolle für LDL-Cholesterin bestand hingegen keine signifikante Korrelation zwischen der Resistin- und Progranulinkonzentration. Auch eine partielle Korrelationsanalyse mit LDL-Cholesterin als einzige Störvariable, ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Resistin und Progranulin im Serum (**Tabelle III.2.7**).

Kontrollvariablen	Resistin [ng/ml] und Progranulin [ng/ml] im Serum
	p
Keine (n = 270)	0.002*
Geschlecht (n = 270)	< 0.001*
Geschlecht und Alter (n = 270)	< 0.001*
Geschlecht, Alter und BMI (n = 212)	< 0.001*
Geschlecht, Alter, BMI und Leukozyten (n = 204)	< 0.001*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten und Thrombozyten (n = 203)	< 0.001*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin (n = 203)	< 0.001*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und CRP (n = 203)	< 0.001*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP und IgM (n = 55)	0.009*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP, IgM und IgG (n = 55)	0.010*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP und Gesamtprotein (n = 116)	0.001*
Geschlecht, Alter, BMI, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, CRP und LDL-Cholesterin (n = 46)	0.60
LDL-Cholesterin (n = 63)	0.29

16: **Tabelle III.2.7:** Partielle Korrelationsanalyse zwischen Resistin und Progranulin im Serum unter Berücksichtigung potentieller Störvariablen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

Bei der Messung der Resistin-Konzentrationen im Liquor konnte nur bei 112 Proben eine Resistin-Konzentration im messbaren Bereich von größer oder gleich 31.2 pg/ml nachgewiesen werden. Daher wurden die Korrelationsanalysen mit numerischen und klassifizierten Variablen nur mit diesen 112 Ergebnissen durchgeführt.

Es existierte eine signifikante positive Korrelation zum Alter der Patienten ($p = 0.046$, $r = +0.189$). Mit den Serumparametern bestanden keine signifikanten Korrelationen. Im Liquor konnten signifikant positive Korrelationen zum Progranulin ($p = 0.003$, $r = +0.280$), zum Gesamteiweiß ($p = 0.004$, $r = +0.269$) und zu dem Albumin ($p = 0.001$, $r = +0.301$) nachgewiesen werden. Außerdem ließen sich positive Korrelationen zum IgG ($p < 0.001$, $r = +0.327$) und IgA ($p = 0.015$, $r = +0.407$) im Liquor beobachten, nicht jedoch zum IgM. Alle weiteren Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind **Tabelle III.2.8** zu entnehmen.

Numerische Variable	Resistin im Liquor [pg/ml]	
	p	r
Alter [a]	0.046*	+ 0.189
BMI [kg/m ²]	0.055	- 0.207
Serum:		
Resistin [ng/ml]	0.11	+ 0.15
Progranulin [ng/ml]	0.32	- 0.10
Leukozyten [giga/l]	1.00	+ 0.001
Thrombozyten [giga/l]	0.31	+ 0.10
Hämoglobin [g/l]	0.03	- 0.21
Gesamtcholesterin [mg/dl]	0.24	- 0.17
Triglyceride [mg/dl]	0.18	- 0.19
LDL-Cholesterin [mg/dl]	0.65	- 0.10
HDL-Cholesterin [mg/dl]	0.99	+ 0.00
Glucose [mg/dl]	0.97	+ 0.01
HbA1c [%]	0.09	+ 0.28
Kreatinin [mg/dl]	0.99	- 0.00
Harnstoff [mg/dl]	0.28	+ 0.11
Harnsäure [mg/dl]	0.73	+ 0.05

LDH [U/l]	0.56	+ 0.07
GOT [U/l]	0.05	+ 0.20
GPT [U/l]	0.27	+ 0.11
Cholinesterase [U/l]	0.12	- 0.22
Bilirubin gesamt [mg/dl]	0.66	+ 0.08
Gesamtprotein [g/l]	0.80	- 0.04
Albumin [g/l]	0.14	- 0.14
CRP [mg/l]	0.98	+ 0.00
IgG [g/l]	0.44	+ 0.07
IgA [g/l]	0.25	+ 0.20
IgM [g/l]	0.30	- 0.18
Liquor:		
Progranulin [pg/ml]	0.003*	+ 0.280
Liquor-/Serum-Albumin-Quotient	0.1	+0.43
Zellzahl [μ l]	0.16	+ 0.13
Gesamteiweiß [g/l]	0.004*	+ 0.269
Albumin [g/l]	0.001*	+ 0.301
Ferritin [ng/ml]	0.56	+ 0.17
Lactat [mmol/l]	0.059	+ 0.179
IgG [g/l]	< 0.001	+ 0.327
IgA [g/l]	0.015*	+ 0.407
IgM [g/l]	0.22	+ 0.22

17: **Tabelle III.2.8:** Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Resistin im Liquor und numerischen Variablen. Es wurden lediglich die über der Nachweisgrenze von 31.2 pg/ml gelegenen Resistin-Konzentrationen ausgewertet (n = 112).

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Bei der Korrelationsanalyse zwischen Resistin im Liquor und den klassifizierten Parametern ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Schweregraden der Schrankenstörung ($p= 0.001$) nachweisen. Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Nicht-Diabetikern, Diabetikern vom Typ 1 und Diabetikern vom Typ 2 ($p < 0.001$) sowie zwischen Patienten mit und ohne Einnahme von L-Thyroxin ($p= 0.024$) gezeigt werden. Zwischen anderen Subgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede (**Tabelle III.2.9**).

Klassifizierte Parameter	Resistin im Liquor
	p
Geschlecht (m/w)	0.32
BMI ¹ (6 Gruppen)	0.20
BMI ² (2 Gruppen)	0.58
Oligoklonale Banden	0.48
Grad der Schrankenstörung ³	0.001*
Beurteilung aus Liquorlabor ⁴	0.33
KHK	0.58
Diabetes mellitus Typ 1/ 2	< 0.001*
Arterielle Hypertonie	0.058
Hypercholesterinämie	0.24
Neurologische Diagnosen	0.89
Andere Vorerkrankungen	0.56
Nikotinkonsum	0.063
Hormonelle Antikonception	0.43
Gabe von L-Thyroxin	0.024*
Gabe von Simvastatin/ Pravastatin	0.58

18: **Tabelle III.2.9:** Korrelationsanalyse mittels des ANOVA-Tests zwischen Resistin im Liquor und klassifizierten Parametern. Es wurden lediglich die über der Nachweisgrenze von 31.2 pg/ml gelegenen Resistin-Konzentrationen ausgewertet ($n = 112$).

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

1: Gewichtsklassifikation anhand des BMI nach WHO 2000

2: Gewichtsklassifikation anhand des BMI: $< 25 \text{ kg/m}^2$ und $\geq 25 \text{ kg/m}^2$

3: Eingeteilt mit Hilfe des Albumin-Liquor/Serum-Quotienten in keine ($n = 214$) ($< 6,5 \cdot 10^{-3}$ bis 40 Jahre, $< 8 \cdot 10^{-3}$ bis 60 Jahre), leichte ($n = 22$) ($< 10 \cdot 10^{-3}$), mittelschwere ($n = 32$) ($< 20 \cdot 10^{-3}$) und schwere ($n = 2$) ($> 20 \cdot 10^{-3}$) Schrankenstörung

4: Beurteilungen des Liquors eingeteilt in: keine weitere Beurteilung (n = 206), entzündlicher Prozess (n= 16), chronische ZNS-Erkrankung (n = 4), chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung (n = 20), infektiöse ZNS-Erkrankung (n = 8), vaskuläre Störung (n = 2), Ausschluss (n = 3), andere (n =11)

Es wurde auch eine Korrelationsanalyse zwischen der Progranulin-Konzentration im Liquor und den numerischen Parametern durchgeführt. Bei den numerischen Parametern ergab sich eine positive Korrelation sowohl zur Resistin-Konzentration im Serum ($p= 0.015$, $r= +0.149$) als auch im Liquor ($p< 0.001$, $r= +0.255$). Des Weiteren ließ sich eine positive Korrelation zum CRP ($p= 0.014$, $r= +0.150$) und der GPT ($p= 0.031$, $r= +0.138$) nachweisen. Bei den Liquorparametern wurden signifikante positive Korrelationen zur Zellzahl ($p< 0.001$, $r= +0.299$), zum Gesamteiweißgehalt ($p< 0.001$, $r= +0.454$), zum Albuminwert ($p< 0.001$, $r= +0.407$) und zum Lactatwert ($p= 0.039$, $r= +0.126$) beobachtet. Es bestanden ferner signifikante positive Korrelationen zu den Immunglobulinen IgM ($p< 0.001$, $r= +0.609$), IgG ($p< 0.001$, $r= +0.530$) und IgA ($p< 0.001$, $r= +0.576$). Des Weiteren wurde ein Quotient aus Liquor- und Serumalbumin gebildet. Zwischen diesem und der Progranulin-Konzentration im Liquor bestand ebenfalls eine positive Korrelation ($p= 0.005$, $r= +0.43$). **Tabelle III.2.10** zeigt alle Ergebnisse der Korrelationsanalyse.

Numerische Variable	Progranulin im Liquor [pg/ml]	
	p	r
Alter [a]	0.52	+ 0.04
BMI [kg/m ²]	0.64	- 0.03
Serum:		
Resistin [ng/ml]	0.015*	+ 0.149
Progranulin [ng/ml]	< 0.001*	+ 0.374
Leukozyten [giga/l]	0.40	+ 0.05
Thrombozyten [giga/l]	0.40	+ 0.05
Hämoglobin [g/l]	0.42	- 0.05
Gesamtcholesterin [mg/dl]	0.74	- 0.03
Triglyceride [mg/dl]	0.66	+ 0.04
LDL-Cholesterin [mg/dl]	0.38	+ 0.11
HDL-Cholesterin [mg/dl]	0.20	- 0.16
Glucose [mg/dl]	0.91	+ 0.01
HbA1c [%]	0.40	+ 0.08
Kreatinin [mg/dl]	0.05	+ 0.12

Harnstoff [mg/dl]	0.63	- 0.03
Harnsäure [mg/dl]	0.19	+ 0.12
LDH [U/l]	0.92	+ 0.01
GOT [U/l]	0.11	+ 0.10
GPT [U/l]	0.031*	+ 0.138
Cholinesterase [U/l]	0.33	- 0.08
Bilirubin gesamt [mg/dl]	0.45	+ 0.09
Gesamtprotein [g/l]	0.13	+ 0.13
Albumin [g/l]	0.20	- 0.08
CRP [mg/l]	0.014*	+ 0.150
IgG [g/l]	0.05	+ 0.12
IgA [g/l]	0.11	+ 0.19
IgM [g/l]	0.23	+ 0.14
Liquor:		
Resistin [pg/ml]	< 0.001*	+ 0.255
Liquor-/Serum-Albumin-Quotient	0.005*	+0.43
Zellzahl [μ l]	< 0.001*	+ 0.299
Gesamteiweiß [g/l]	< 0.001*	+ 0.454
Albumin [g/l]	< 0.001*	+ 0.407
Ferritin [ng/ml]	0.10	+ 0.31
Lactat [mmol/l]	0.039*	+ 0.126
IgG [g/l]	< 0.001*	+ 0.530
IgA [g/l]	< 0.001*	+ 0.576
IgM [g/l]	< 0.001*	+ 0.609

19: **Tabelle III.2.10:** Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Progranulin im Liquor und numerischen Variablen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Bei der Korrelationsanalyse zwischen Progranulin im Liquor und den klassifizierten Parametern zeigte sich wie beim Resistin im Liquor ein signifikanter Unterschied zwischen den Schweregraden der Schrankenstörung ($p < 0.001$). Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne oligoklonale Banden ($p = 0.001$) im Liquor beobachtet. Auch innerhalb der klassifizierten Beurteilungen des Labors für Liquordiagnostik ($p < 0.001$) und innerhalb der klassifizierten neurologischen Diagnosen ($p < 0.001$) ergaben sich signifikante Unterschiede in der Progranulin-Konzentration. Es bestand ferner ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne arterieller Hypertonie ($p = 0.016$) (**Tabelle III.2.11**).

Klassifizierte Parameter	Progranulin im Liquor
	p
Geschlecht (m/w)	0.70
BMI ¹ (6 Gruppen)	0.54
BMI ² (2 Gruppen)	0.66
Oligoklonale Banden	0.001*
Grad der Schrankenstörung ³	< 0.001*
Beurteilung aus Liquorlabor ⁴	< 0.001*
KHK	0.44
Diabetes mellitus Typ 1/ 2	0.92
Arterielle Hypertonie	0.016*
Hypercholesterinämie	0.20
Neurologische Diagnosen	< 0.001*
Andere Vorerkrankungen	0.05
Nikotinkonsum	0.31
Hormonelle Antikonception	0.39
Gabe von L-Thyroxin	0.20
Gabe von Simvastatin/ Pravastatin	0.94

20: **Tabelle III.2.11:** Korrelationsanalyse mittels des ANOVA-Tests zwischen Progranulin im Liquor und klassifizierten Parametern.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

1: Gewichtsklassifikation anhand des BMI nach WHO. 2000

2: Gewichtsklassifikation anhand des BMI: $< 25 \text{ kg/m}^2$ und $\geq 25 \text{ kg/m}^2$

3: Eingeteilt mit Hilfe des Albumin-Liquor/Serum-Quotienten in keine (n = 214) ($< 6,5 \cdot 10^{-3}$ bis 40 Jahre, $< 8 \cdot 10^{-3}$ bis 60 Jahre), leichte (n = 22) ($< 10 \cdot 10^{-3}$), mittelschwere (n = 32) ($< 20 \cdot 10^{-3}$) und schwere (n = 2) ($> 20 \cdot 10^{-3}$) Schrankenstörung

4: Beurteilungen des Liquors eingeteilt in: keine weitere Beurteilung (n = 206), entzündlicher Prozess (n = 16), chronische ZNS-Erkrankung (n = 4), chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung (n = 20), infektiöse ZNS-Erkrankung (n = 8), vaskuläre Störung (n = 2), Ausschluss (n = 3), andere (n = 11)

Die gemäß den neurologischen Diagnosen gebildeten Subgruppen wurden hinsichtlich ihrer mittleren Resistin- und Progranulin-Konzentrationen mittels des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Es wurde die Gruppe der infektiösen ZNS-Erkrankungen mit den anderen Gruppen verglichen. Dabei ergab sich bei der Resistin-Konzentration im Serum ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der infektiösen Erkrankungen und der Gruppe der vaskulären Erkrankungen ($p = 0.03$), wie in **Tabelle III.2.12** gezeigt ist. Das Progranulin im Serum zeigte keinen Unterschied der Mittelwerte zwischen den Gruppen. Dies zeigt **Tabelle III.2.13**.

	MW ± SD [ng/ml]	
Infektiöse ZNS-Erkrankung (n = 13)	23.1 ± 14.2	
		p
Multiple Sklerose (n = 42)	18.5 ± 8.5	n.s.
Vaskuläre Erkrankung (n = 22)	15.9 ± 5.3	0.03*
Epilepsie (n = 26)	16.8 ± 6.6	n.s.
Kopfschmerz/ Gesichtsschmerz (n = 26)	18.7 ± 8.3	n.s.
Neuropathie/ Hirnnervenparese (n = 49)	21.4 ± 15.1	n.s.
Andere (n = 92)	20.2 ± 11.9	n.s.

21: **Tabelle III.2.12:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Resistin im Serum innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“. Angegeben sind die p-Werte zum Vergleich der Subgruppe „infektiöse Erkrankung“ und den anderen Subgruppen der neurologischen Erkrankungen sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen der Resistin-Konzentrationen im Serum in ng/ml innerhalb der einzelnen Subgruppen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$); n.s. = nicht signifikant

	MW ± SD [ng/ml]	
Infektiöse Erkrankung (n = 13)	56.1 ± 22.4	
		p
Multiple Sklerose (n = 42)	47.0 ± 19.7	n.s.
Vaskuläre Erkrankung (n = 22)	49.9 ± 14.1	n.s.
Epilepsie (n = 26)	46.0 ± 13.1	n.s.
Kopfschmerz/ Gesichtsschmerz (n = 26)	48.3 ± 16.8	n.s.
Neuropathie/ Hirnnervenparese (n = 49)	54.2 ± 23.6	n.s.
Andere (n = 92)	48.7 ± 18.9	n.s.

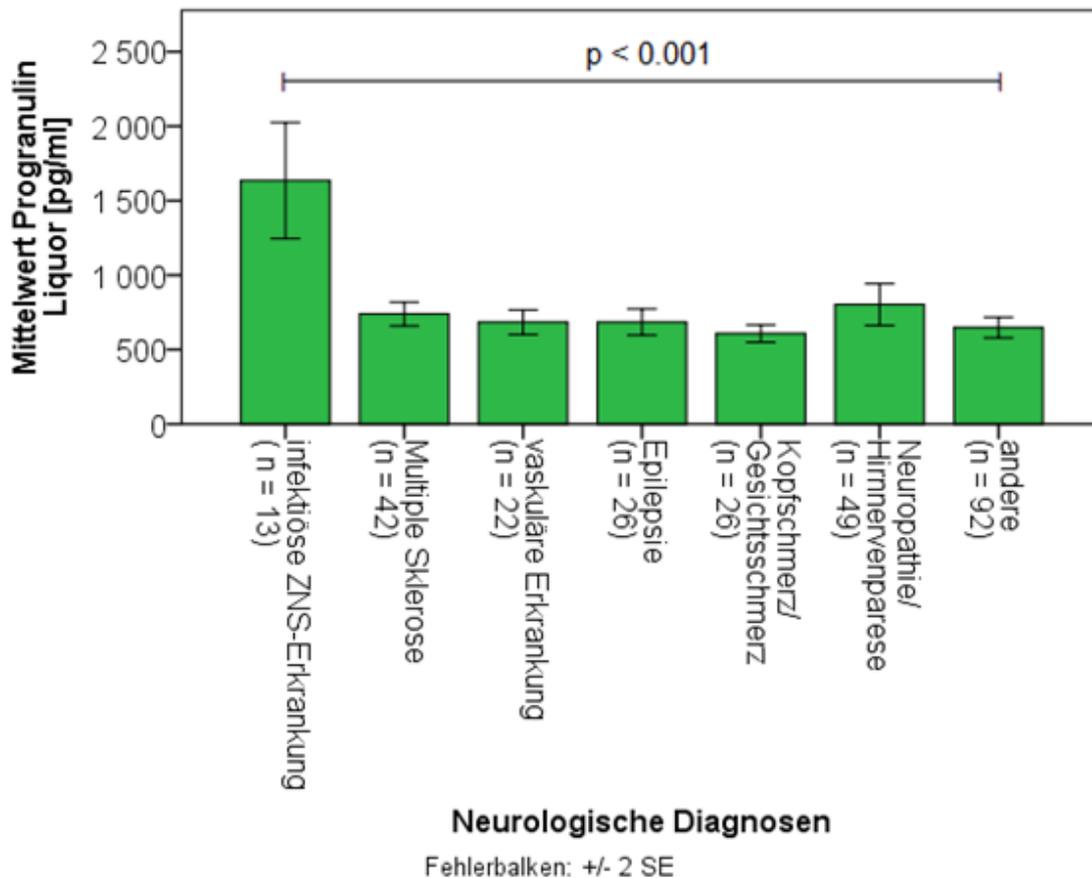
22: **Tabelle III.2.13:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Serum innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“.

Angegeben sind die p-Werte zwischen der Subgruppe „infektiöse Erkrankung“ und den anderen Subgruppen der neurologischen Erkrankungen sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen der Progranulin-Konzentrationen im Serum in ng/ml innerhalb der einzelnen Subgruppen.

* Statistisch signifikant ($p < 0.05$), n.s.= nicht signifikant

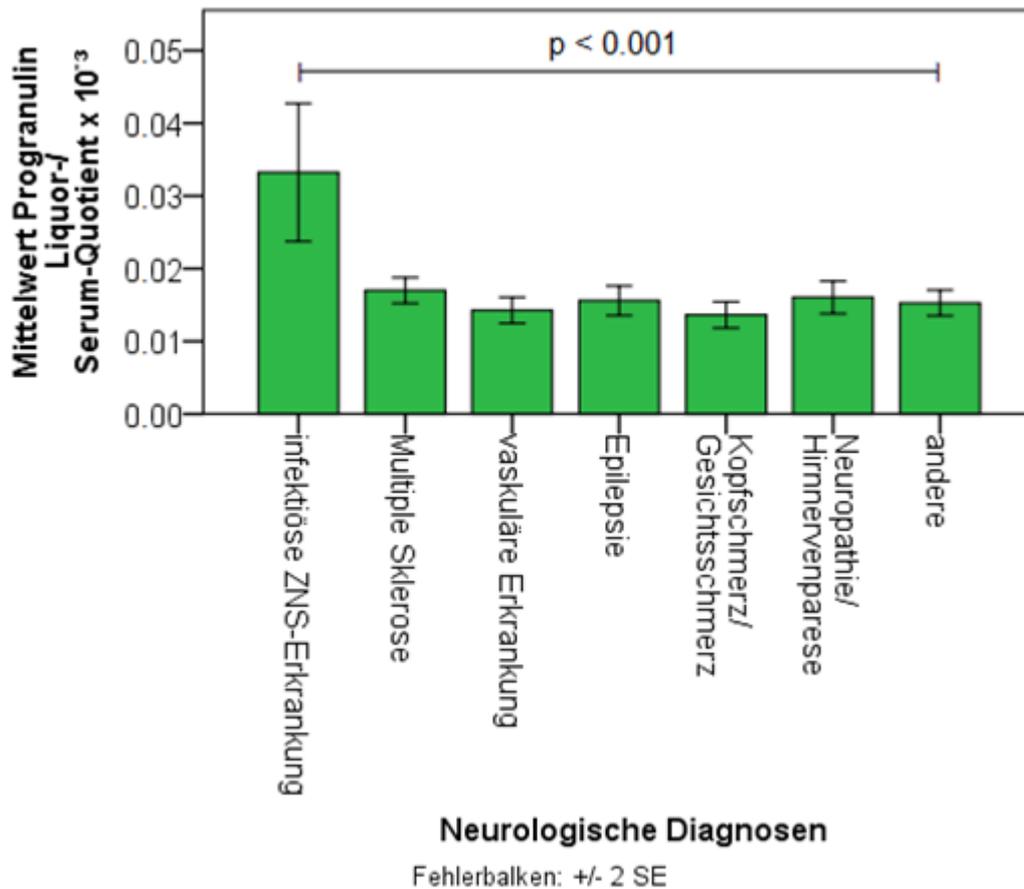
Für den klassifizierten Parameter „Neurologische Diagnosen“ ergab der Mann-Whitney-U-Test keinen signifikanten Unterschied der Resistin-Konzentration im Liquor beim Vergleich der Patienten mit infektiösen Erkrankungen mit den anderen Subgruppen (Daten nicht gezeigt).

Bezüglich Progranulin im Liquor bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Subgruppe mit infektiösen Erkrankungen und den anderen Subgruppen (jeweils $p < 0.001$) (**Abbildung III.2.1a**).



10: **Abbildung III.2.1a**: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Des Weiteren wurden die Unterschiede der Mittelwerte des Progranulin Liquor-/ Serum-Quotienten der Subgruppe „infektiöse Erkrankung“ und den anderen Subgruppen analysiert. Hierbei zeigten sich im Vergleich mit jeder anderen Subgruppe signifikante Unterschiede (**Abbildung III.2.1b**).



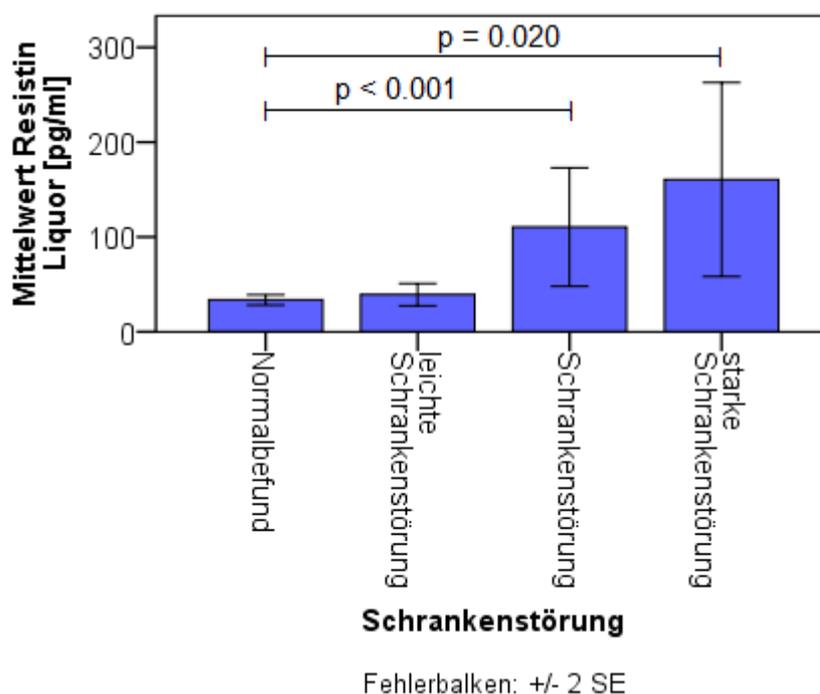
11: **Abbildung III.2.1b:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich des Liquor-/Serum-Progranulinquotienten innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Mit dem ANOVA-Test wurde für die Resistin-Konzentration im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Diabetes mellitus“ ein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen gezeigt ($p < 0.001$) (**Tabelle III.2.9**). Der Mann-Whitney-U-Test ergab für Resistin im Serum keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen (Daten nicht gezeigt). Bezüglich Resistin im Liquor bestand zwischen den einzelnen Subgruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Der ANOVA-Test ergab einen signifikanten Unterschied innerhalb der klassifizierten Variable „Grad der Schrankenstörung“ für Resistin und Progranulin im Liquor. Die

Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab für Resistin im Liquor zwischen den Gruppen „keine Schrankenstörung“ und „leichte Schrankenstörung“ keinen signifikanten Unterschied. Zwischen „keine Schrankenstörung“ und „mittelschwere Schrankenstörung“ ($p < 0.001$) sowie „schwere Schrankenstörung“ ($p = 0.020$) bestanden signifikante Unterschiede in der Resistin-Konzentration im Liquor. (**Abbildung III.2.2a**)

Bei Progranulin im Liquor ergab die Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test zwischen „keine Schrankenstörung“ und „leichte Schrankenstörung“ einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$), wie auch der Vergleich mit „mittelschwere Schrankenstörung“ ($p < 0.001$) und mit „schwere Schrankenstörung“ ($p = 0.020$) (**Abbildung III.2.2b**).

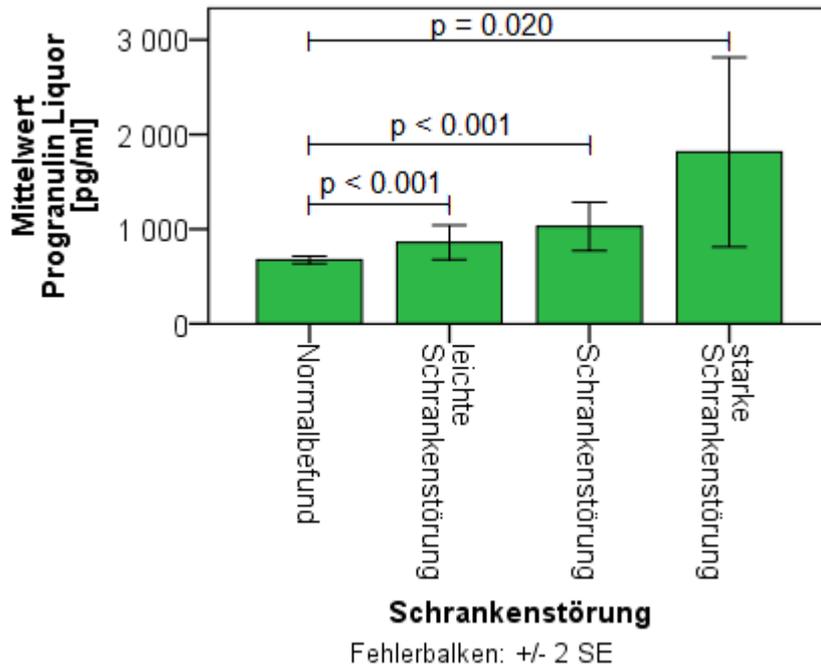


12: **Abbildung III.2.2a:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Resistin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Schrankenstörung“.

Der Grad der Schrankenstörung wurde mit Hilfe des Albumin-Liquor/Serum-Quotienten eingeteilt. Es wurden alle gemessenen Resistin-Werte ($n = 270$) gewertet.

Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Statistisch signifikant $p < 0.05$



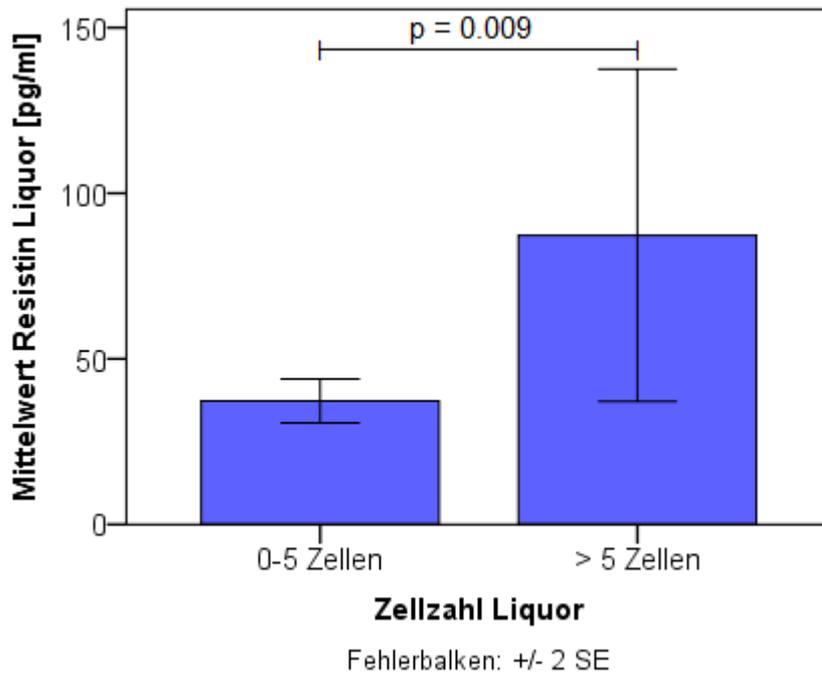
13: **Abbildung III.2.2b:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Schrankenstörung“.

Der Grad der Schrankenstörung wurde mit Hilfe des Albumin-Liquor/Serum-Quotienten eingeteilt in keine ($< 6,5 \cdot 10^{-3}$ bis 40 Jahre, $< 8 \cdot 10^{-3}$ bis 60 Jahre), leichte ($< 10 \cdot 10^{-3}$), mittelschwere ($< 20 \cdot 10^{-3}$) und schwere ($> 20 \cdot 10^{-3}$) Schrankenstörung. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Statistisch signifikant $p < 0.05$

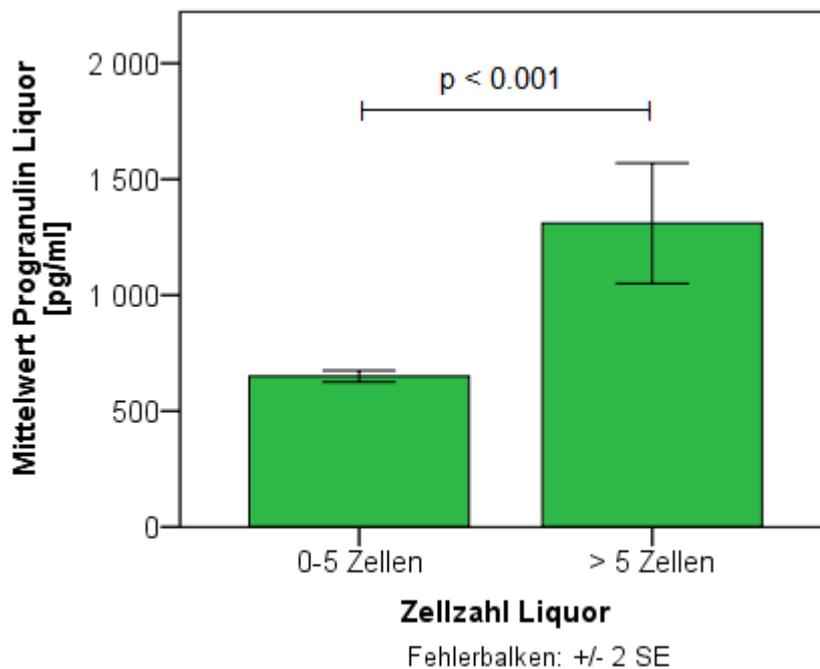
In der Subgruppenanalyse des klassifizierten Parameters „Zellzahl“ im Zusammenhang mit Resistin und Progranulin im Liquor ergab der Mann-Whitney-U-Test für Resistin einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen „0-5 Zellen“ ($n = 233$) und „ > 5 Zellen“ ($n = 37$) ($p = 0.009$). Es wurden alle gemessenen Resistin-Konzentrationen ($n = 270$) ausgewertet, da hierbei lediglich der qualitative Zusammenhang von Resistin-Konzentration und Zellzahl im Liquor überprüft werden sollte (**Abbildung III.2.3a**).

Es bestand ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte von Progranulin im Liquor zwischen den beiden Subgruppen des klassifizierten Parameters „Zellzahl“ ($p < 0.001$) (**Abbildung III.2.3b**).



14: **Abbildung III.2.3a:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Resistin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Zellzahl im Liquor“.

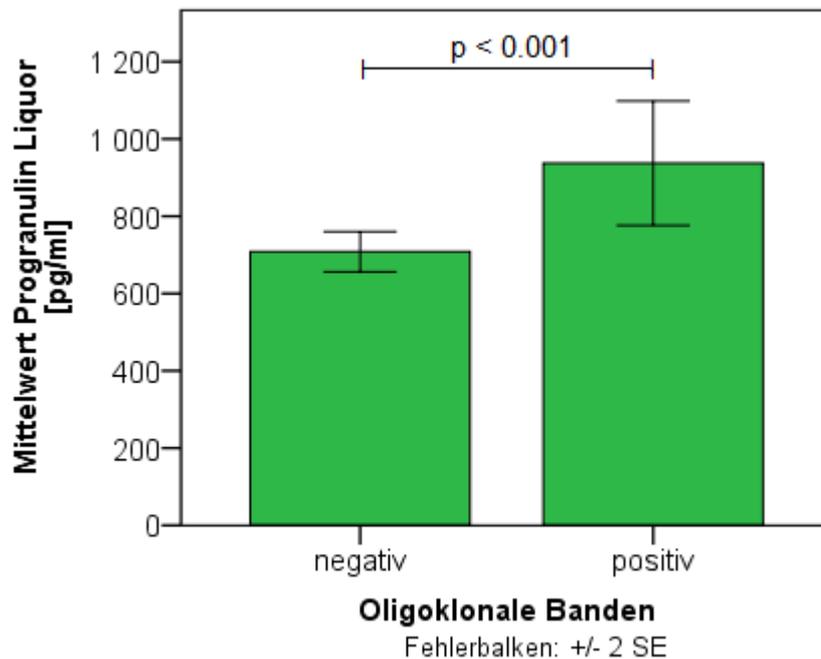
Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.
 Statistisch signifikant $p < 0.05$



15: **Abbildung III.2.3b:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Zellzahl im Liquor“.

Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.
 Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

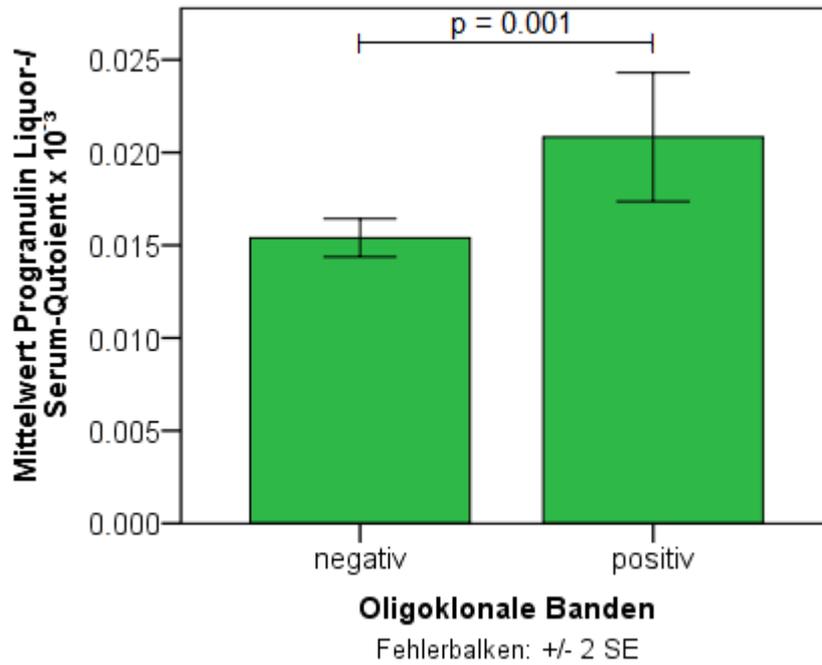
Des Weiteren wurde eine Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich des Vorkommens der oligoklonalen Banden durchgeführt. Der Mittelwertvergleich für Progranulin im Liquor ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Subgruppen mit (n = 43) und ohne (n = 214) oligoklonalen Banden ($p < 0.001$) (**Abbildung III.2.4a**). Auch bezüglich des Liquor-/ Serum-Quotienten des Progranulins zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0.001$) zwischen den beiden Subgruppen (**Abbildung III.2.4b**).



16: **Abbildung III.2.4a:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „oligoklonale Banden“.

Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

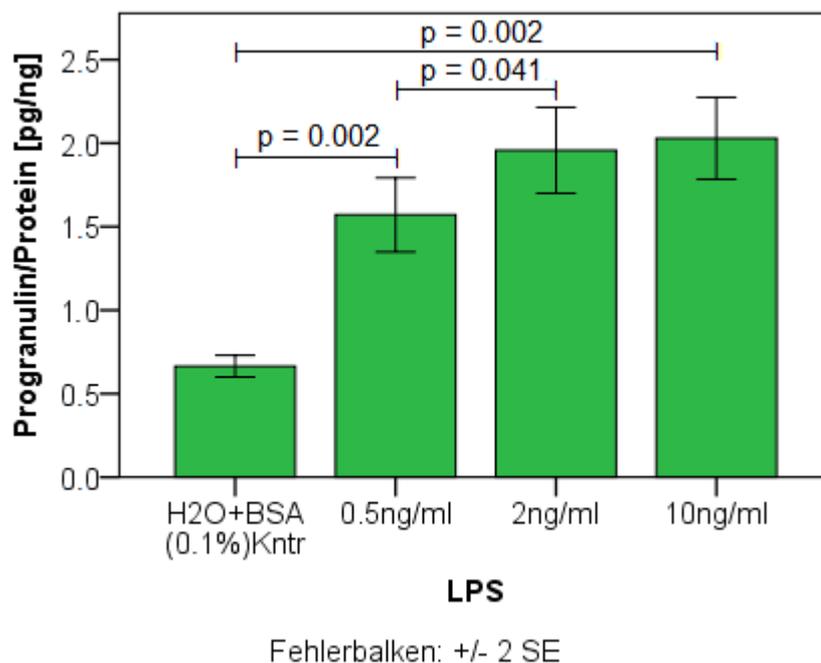


17: **Abbildung III.2.4b:** Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich des Progranulin Liquor-/ Serum-Quotienten innerhalb des klassifizierten Parameters „oligoklonale Banden“. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. Statistisch signifikant ($p < 0.05$)

III.3 Ergebnisse der Zellkulturversuche

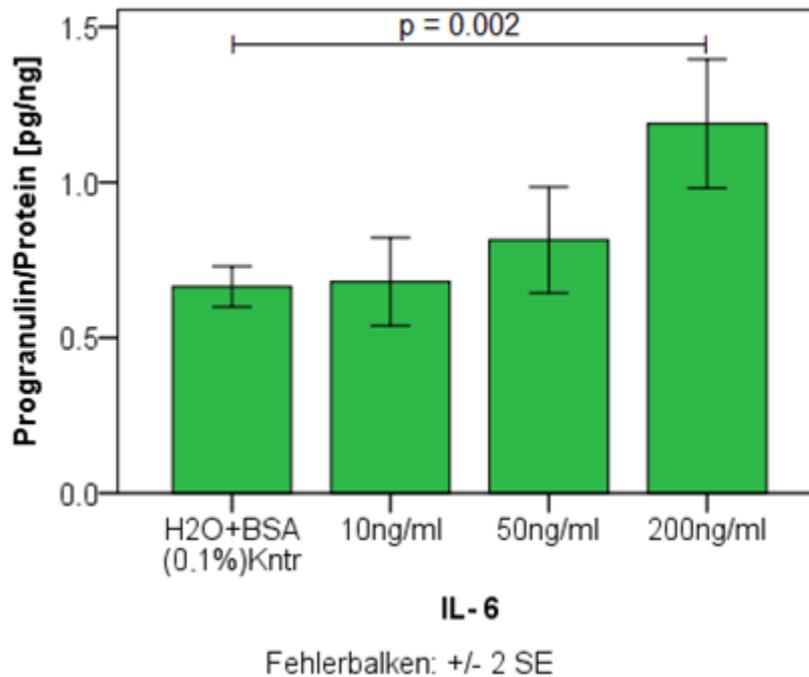
Die Ergebnisse aus Teil III.1 zeigten vor allem einen Zusammenhang der Adipokine Resistin und Progranulin zu inflammatorischen und metabolischen Faktoren, sowie einen geschlechtsspezifischen Unterschied. Deshalb wurden in den Zellkulturversuchen vor allem regulatorische Einflüsse dieser Faktoren auf die Resistin- und Progranulinsekretion der Adipozyten untersucht.

Bei der Stimulation reifer Adipozyten mit Lipopolysacchariden in verschiedenen Konzentrationen ließ sich ein dosisabhängiger Anstieg der Progranulin-Konzentration beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle war schon bei einer Stimulation mit 0.5ng/ml LPS eine Erhöhung der Progranulin-Konzentration zu erkennen ($p= 0.002$). Vergleicht man die Stimulation mit 0.5ng/ml und mit 2ng/ml, zeigte sich eine weiterer signifikanter Anstieg der Progranulin-Konzentration ($p= 0.041$) (**Abbildung III.3.1**). Die Resistin-Konzentration war im Gegensatz dazu nicht durch LPS beeinflussbar. (Daten nicht gezeigt)



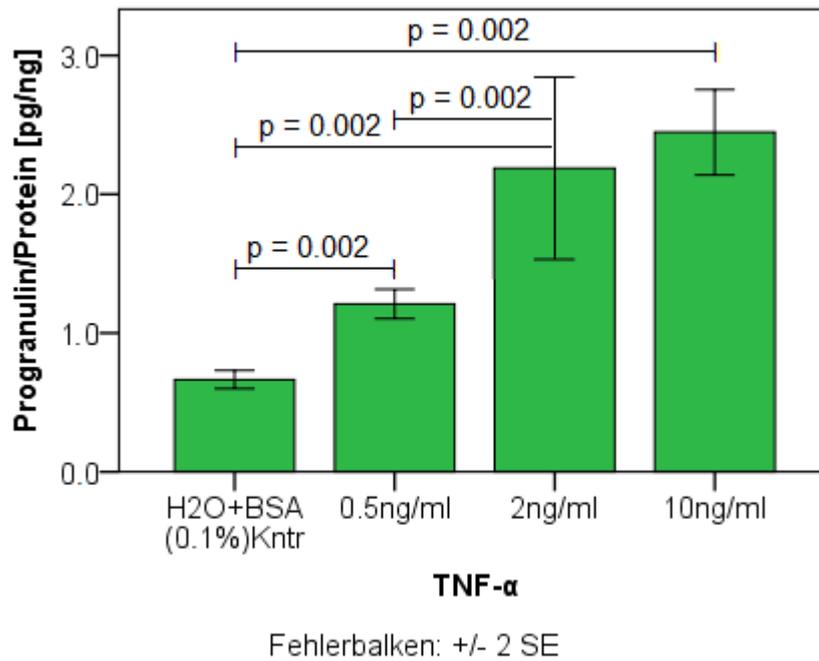
18: **Abbildung III.3.1:** Effekt von LPS auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Im Stimulationsversuch mit Interleukin-6 kam es zu einem Anstieg der Progranulin-Konzentration bei einer Stimulation mit 200ng/ml ($p= 0.002$). Bei niedrigeren Konzentrationen des Stimulanz ließ sich kein Unterschied zur Kontrolle beobachten (**Abbildung III.3.2**). Die Resistin-Konzentration änderte sich unter der Stimulation von IL-6 nicht. (Daten nicht gezeigt)



19: **Abbildung III.3.2:** Effekt von IL-6 auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

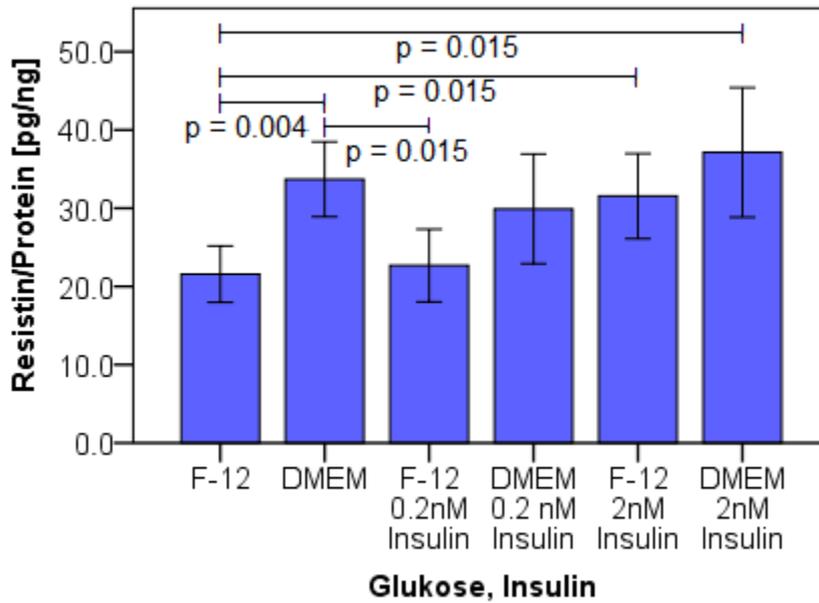
TNF- α hatte einen ähnlichen Einfluss auf die Progranulin-Konzentration wie LPS. Der Anstieg der Adipokin-Konzentration war dosisabhängig. Der Unterschied zwischen der Kontrolle und den verschiedenen Konzentrationen an TNF- α war jeweils mit einem p-Wert von 0.002 signifikant. Bei Erhöhung der Stimulationskonzentration von TNF- α von 0.5ng/ml auf 2ng/ml stieg die Progranulin-Konzentration signifikant an ($p= 0.002$). Eine weitere Erhöhung der TNF- α -Konzentration auf 10ng/ml führte nicht zu einem weiteren Anstieg der Progranulin-Konzentration (**Abbildung III.3.3**). Die Resistin-Konzentration änderte sich nicht unter dem Einfluss von TNF- α im Vergleich zur Kontrolle. (Daten nicht gezeigt)



20: **Abbildung III.3.3:** Effekt von TNF- α auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

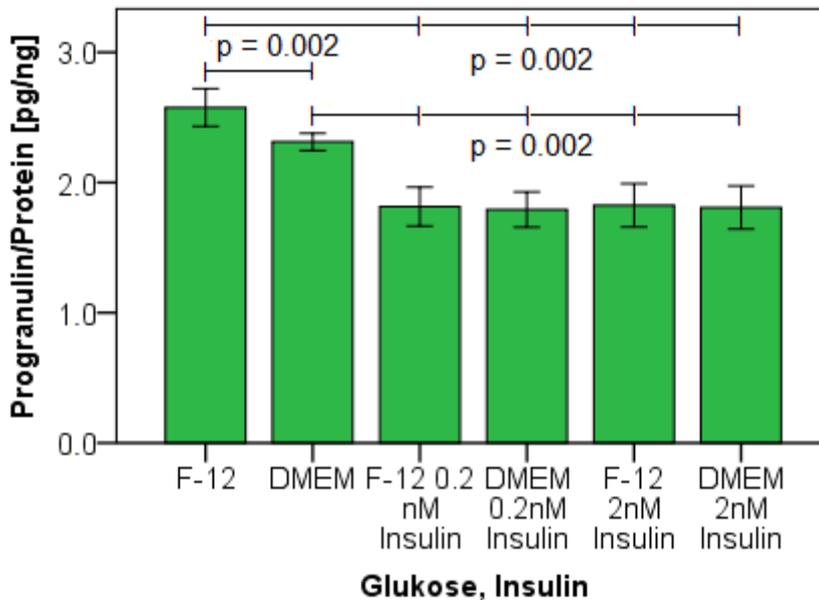
Die Resistin-Konzentration stieg durch die Erhöhung der Glukose-Konzentration von 3.151g/l auf 4.5g/l an. Dies ließ sich sowohl ohne Co-Stimulation von Insulin ($p= 0.004$) als auch mit Co-Stimulation von 0.2nM Insulin ($p= 0.015$) beobachten. Im Vergleich zur Stimulation mit nur 3.151g/l Glukose, erhöhten sich die Resistin-Konzentrationen unter Co-Stimulation mit 3.151g/l Glukose und 2nM Insulin ($p= 0.015$), sowie unter Co-Stimulation mit 4.5g/l Glukose und 2nM Insulin ($p= 0.015$) (**Abbildung III.3.4**). Die Progranulin-Konzentration war in den Co-Stimulationsversuchen an reifen Adipozyten nicht durch Änderungen der Glukose- oder Insulinkonzentration beeinflussbar. (Daten nicht gezeigt)

Bei Co-Stimulationsversuchen an Präadipozyten zeigte sich allerdings ein signifikanter Rückgang der Progranulin-Konzentrationen im Vergleich zur Stimulation mit 3.151g/l Glukose mit jeweils $p= 0.002$ (**Abbildung III.3.5**).



Fehlerbalken: +/- 2 SE

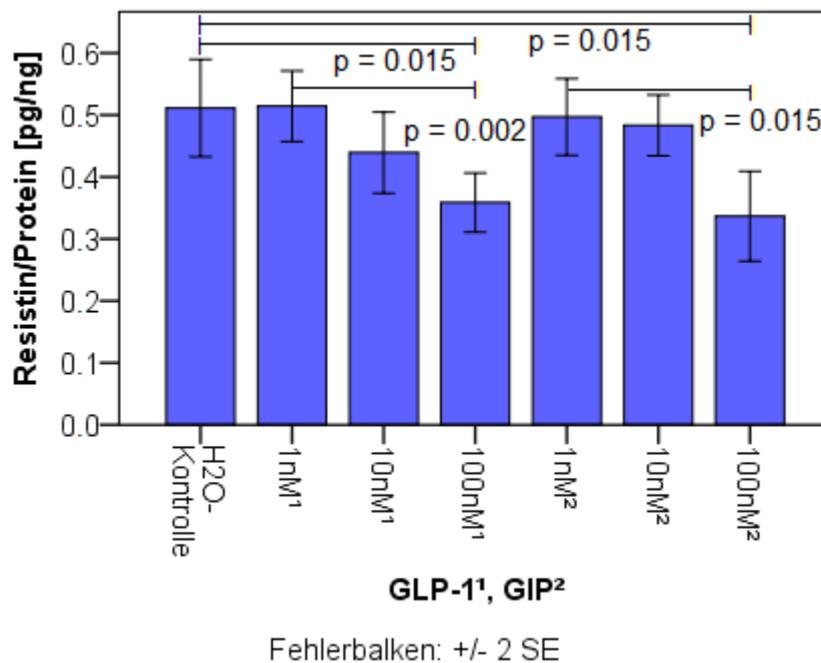
21: **Abbildung III.3.4:** Effekt von Glukose und Insulin in Co-Stimulation auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1. Das Medium F-12 enthält nur 3.151g/l Glukose, während das DMEM-Medium 4.5g/l Glukose enthält. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

22: **Abbildung III.3.5:** Effekt von Glukose und Insulin in Co-Stimulation auf die Progranulin-Konzentration im Überstand unreifer 3T3-L1 Prädipozyten. Das Medium F-12 enthält nur 3.151g/l Glukose, während das DMEM-Medium 4.5g/l Glukose enthält. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

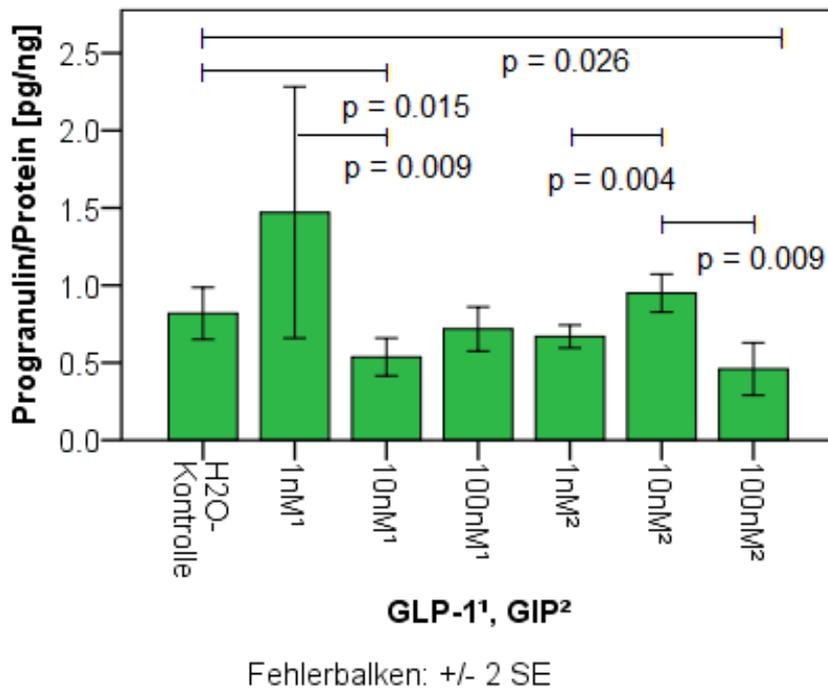
Der Effekt des GLP-1 (*Glucagon-like Peptide-1*) und des GIP (*Glucose dependent insulinotropic Peptide*) zeigte auf die Resistin-Konzentration ein vergleichbares Muster. Sowohl die Stimulation der Adipozyten mit GLP-1 als auch mit GIP führte bei einer Konzentration von 1nM und 10 nM nicht zu einer Änderung der Resistin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl bei der Erhöhung der Konzentration von GLP-1 auf 100nM als auch bei der Erhöhung der Konzentration von GIP auf 100nM fielen die Resistin-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle jeweils mit einem p-Wert von 0.015 signifikant ab. Die Reduktion der Resistin-Konzentration bei Anstieg der Peptid-Konzentrationen von 1nM auf 100nM war ebenfalls bei beiden Peptiden signifikant. Bei GLP-1 mit einem p-Wert von 0.002 und bei GIP mit einem p-Wert von 0.015 (**Abbildung III.3.6**).



23: **Abbildung III.3.6:** Effekt von GLP-1 und GIP auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit \pm 2 Standardfehlern.

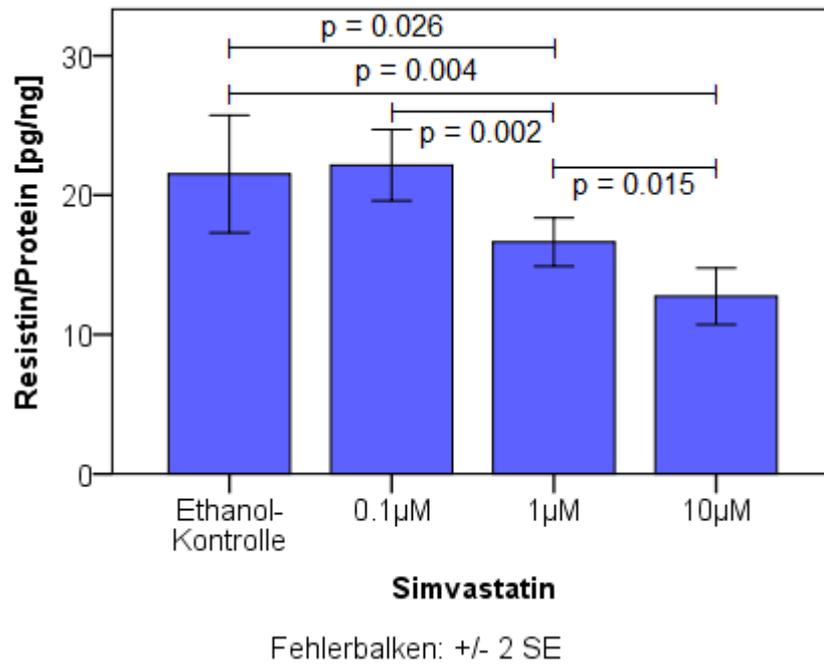
Die Progranulin-Konzentrationen ließen sich ebenfalls durch GLP-1 und GIP beeinflussen. Im Vergleich zur Kontrolle fiel die Progranulin-Konzentration bei Stimulation mit 10nM GLP-1 signifikant ab ($p=0.015$). Die anderen getesteten GLP-1-Konzentrationen (1nM und 100nM) hatten keinen Einfluss auf die Progranulin-Konzentration. Vergleicht man die Adipokin-Konzentrationen zwischen den Stimulationen mit 1nM und 10nM GLP-1, ließ sich auch hier ein signifikanter Abfall der Progranulin-Konzentration erkennen ($p=0.009$). Die Stimulation mit 100nM GIP führte zu einem Abfall der Progranulin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.026$).

Während ein Anstieg von 1nM auf 10nM GIP einen Anstieg der Progranulin-Konzentration bewirkte, ließ ein Anstieg von 10nM auf 100nM GIP die Progranulin-Konzentration wieder sinken ($p = 0.009$) (**Abbildung III.3.7**).



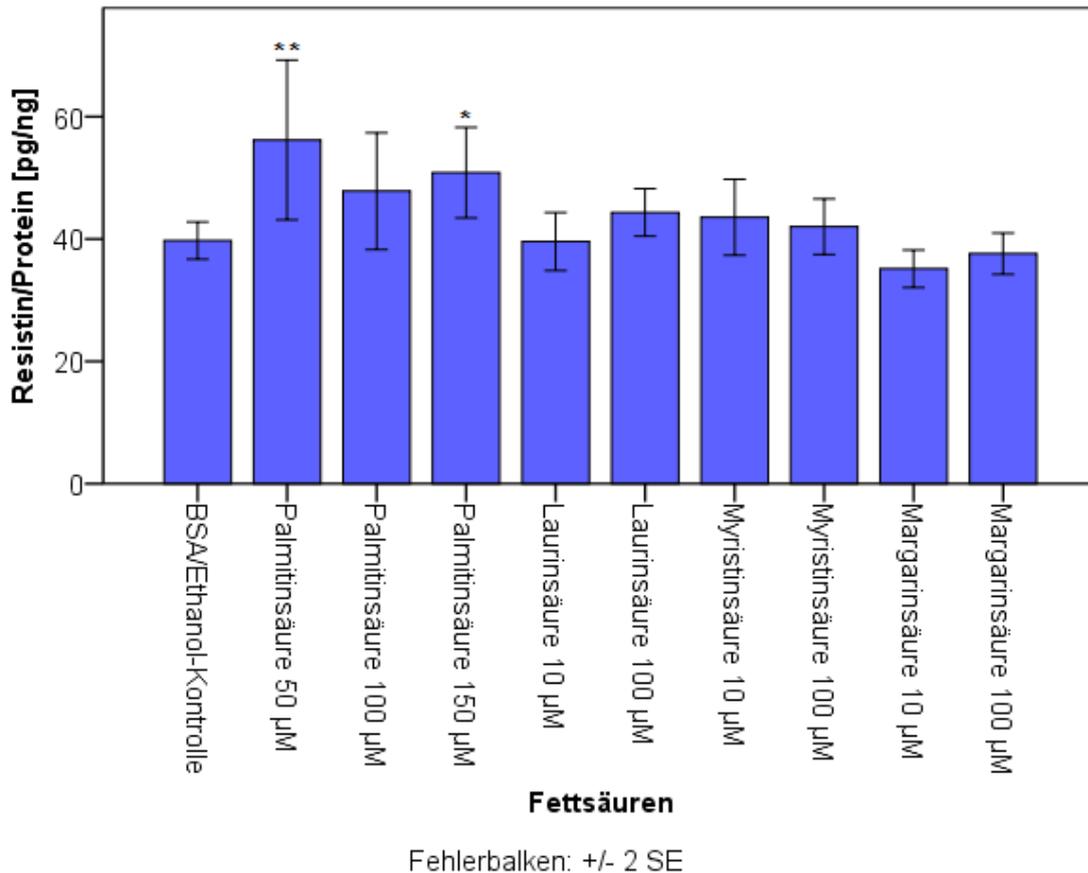
24: **Abbildung III.3.7:** Effekt von GLP-1 und GIP auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Im Vergleich zur Kontrolle hatte eine Stimulation mit 0.1 μ M Simvastatin noch keinen Einfluss auf die Resistin-Konzentration. Unter Stimulation mit 1 μ M Simvastatin ($p = 0.026$) und 10 μ M Simvastatin ($p = 0.004$) sank dagegen die Resistin-Konzentration signifikant. Der Rückgang der Resistin-Konzentration bei steigender Simvastatin-Konzentration war dosisabhängig. Sowohl bei Erhöhung der Simvastatin-Konzentration von 0.1 μ M auf 1 μ M ($p = 0.002$) als auch von 1 μ M auf 10 μ M ($p = 0.015$), fiel die Resistin-Konzentration signifikant ab (**Abbildung III.3.8**). Die Progranulin-Konzentration ließ sich nicht durch Stimulation mit Simvastatin beeinflussen. (Daten nicht gezeigt)

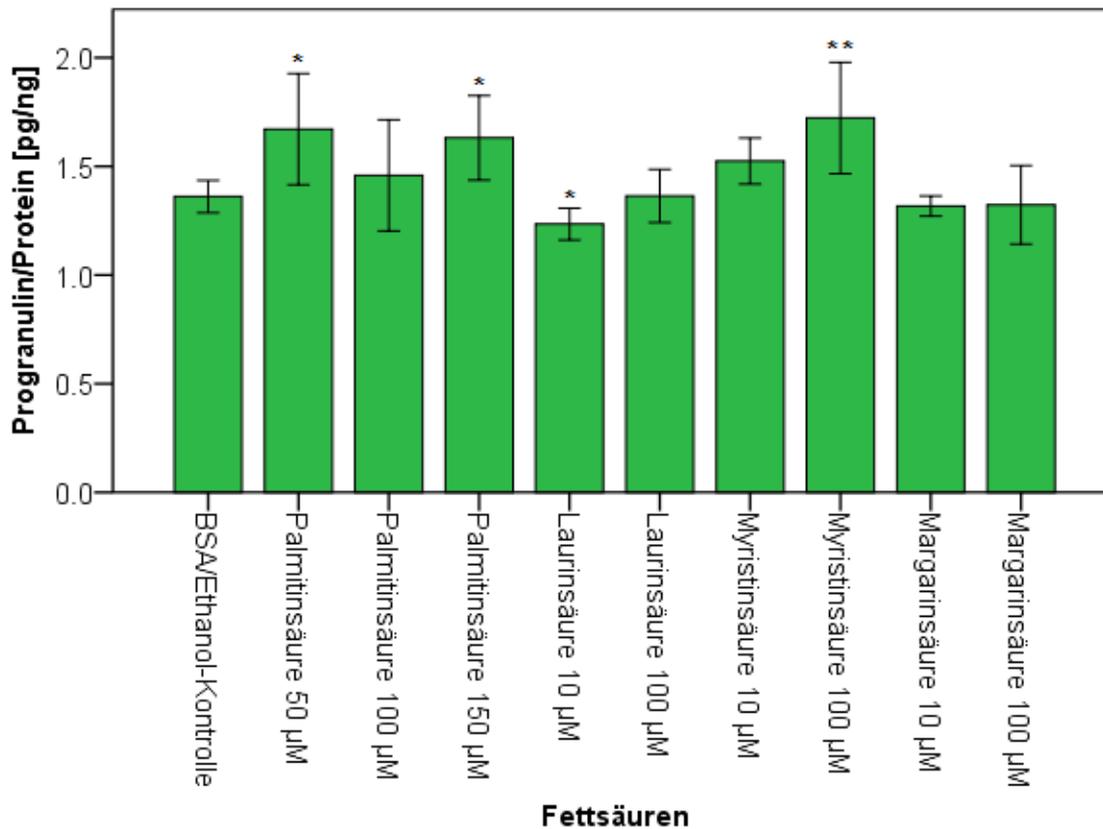


25: **Abbildung III.3.8:** Effekt von Simvastatin auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit \pm 2 Standardfehlern.

Sowohl die Resistin- als auch die Progranulin-Konzentrationen stiegen durch die Stimulation mit 50µM und 150µM Palmitinsäure im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Die Erhöhung der Resistin-Konzentrationen war bei 50µM mit $p= 0.009$ und bei 150µM mit $p= 0.041$ signifikant. Bei Progranulin ergab sich bei 50µM und 150µM jeweils ein p -Wert von 0.041. Des Weiteren sank die Progranulin-Konzentration unter dem Einfluss von 10µM Laurinsäure ab ($p= 0.041$) und stieg nach der Stimulation mit 100µM Myristinsäure an ($p= 0.002$) (**Abbildung III.3.9-10**).



26: **Abbildung III.3.9:** Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$

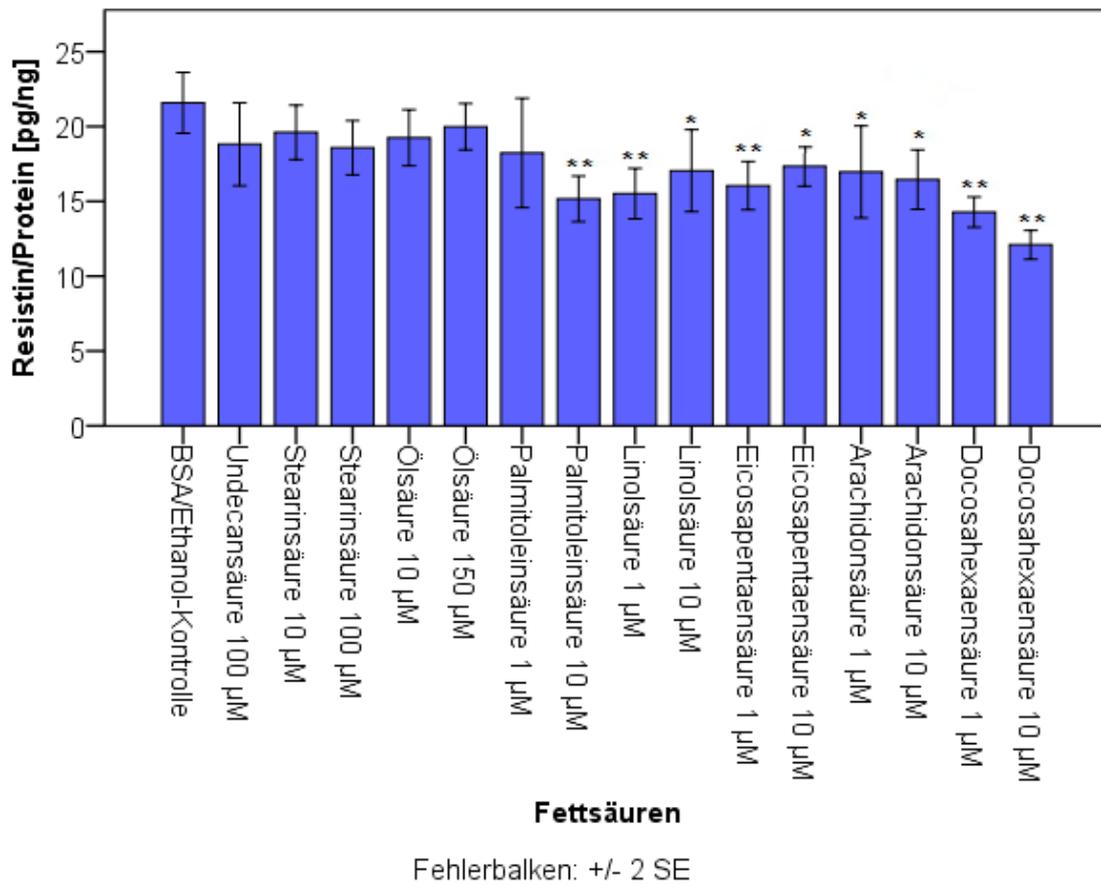


Fehlerbalken: +/- 2 SE

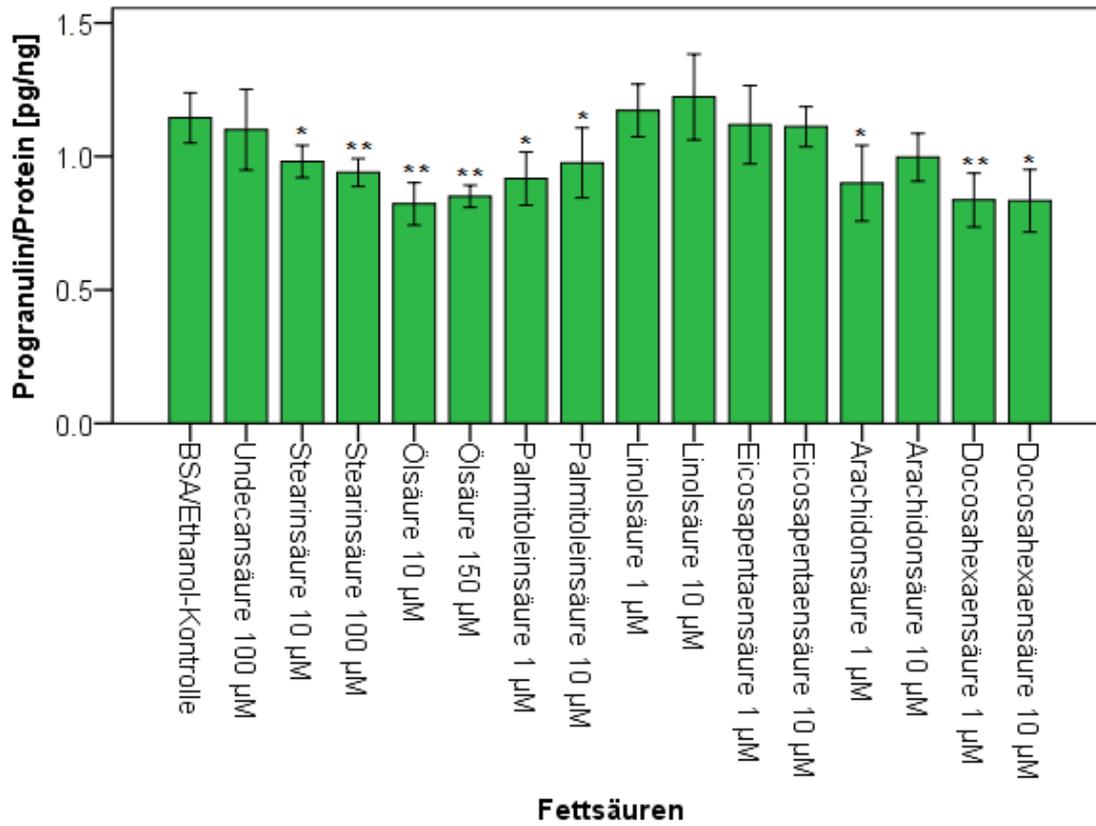
27: **Abbildung III.3.10:** Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$

Bei der Stimulation mit Stearinsäure (bei 10µM mit $p = 0.015$ und bei 100µM mit $p = 0.002$), Ölsäure (bei 10µM mit $p = 0.002$ und bei 150µM mit $p = 0.002$) und Palmitoleinsäure (bei 1µM mit $p = 0.015$ und bei 10µM mit $p = 0.041$) fielen die Progranulin-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Unter diesen Fettsäuren bewirkte lediglich die Stimulation mit 10µM Palmitoleinsäure einen Rückgang der Resistin-Konzentration ($p = 0.004$). Stearin- und Ölsäure hatten keinen Einfluss auf die Resistin-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit Linolsäure (bei 1µM mit $p = 0.004$ und bei 10µM mit $p = 0.041$) und mit Eicosapentaensäure (bei 1µM mit $p = 0.004$ und bei 10µM mit $p = 0.015$) zu einem signifikanten Abfall der Resistin-Konzentrationen. Diese Fettsäuren hatten hingegen keinen Einfluss auf die Progranulin-Konzentrationen. Sowohl die Resistin- als auch die Progranulin-Konzentrationen sanken unter dem Einfluss von Arachidonsäure und Docosahexaensäure. Für Resistin ließen sich Werte für 1µM Arachidonsäure von $p = 0.041$, für 10µM Arachidonsäure von $p = 0.010$, für 1µM Docosahexaensäure von $p = 0.002$ und für 10µM Docosahexaensäure von $p = 0.002$ berechnen. Bei Progranulin lagen die Werte für 1µM Arachidonsäure bei

p= 0.041, für 1µM Docosahexaensäure bei p= 0.002 und für 10µM Docosahexaensäure bei p= 0.015 (**Abbildung III.3.11-12**).



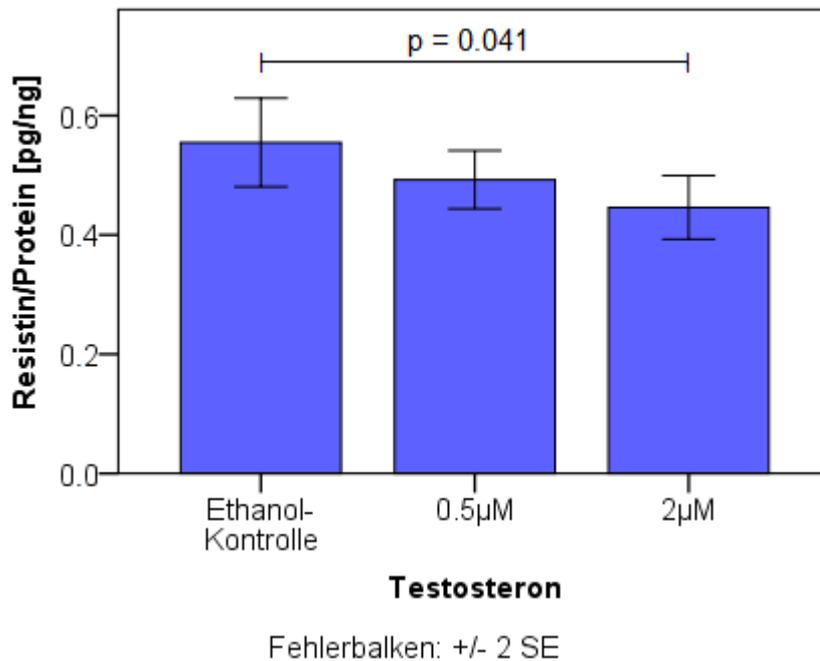
28: **Abbildung III.3.11:** Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit \pm 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$



Fehlerbalken: +/- 2 SE

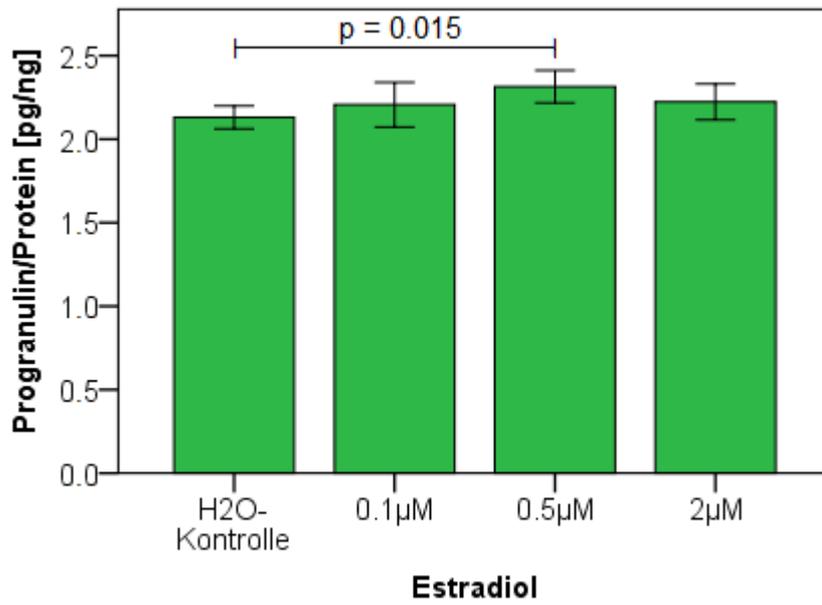
29: **Abbildung III.3.12:** Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$

Bei den Stimulationsversuchen an reifen Adipozyten mit Estradiol und Testosteron zeigte sich ein leicht signifikanter Rückgang der Resistin-Konzentration bei einer Stimulation mit 2µM Testosteron im Vergleich zur Kontrolle ($p= 0.041$) (**Abbildung III.3.13**). Die Progranulin-Konzentrationen ließen sich nicht durch die Stimulation von Estradiol oder Testosteron beeinflussen. (Daten nicht gezeigt)



30: **Abbildung III.3.13**: Effekt von Testosteron auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

Bei dem Stimulationsversuch an Präadipozyten mit 0.5µM Estradiol zeigte sich ein Anstieg der Progranulin-Konzentration mit $p= 0.015$ (**Abb.III.3.14**), während die anderen getesteten Estradiol-Konzentrationen die Progranulin-Konzentrationen unbeeinflusst ließen. Estradiol hatte keinen Einfluss auf die Resistin-Konzentrationen. Testosteron führte weder bei den Resistin- noch bei den Progranulin-Konzentrationen zu einer Veränderung. (Daten nicht gezeigt)



Fehlerbalken: +/- 2 SE

31: **Abbildung III.3.14:** Effekt von Estradiol auf die Progranulin-Konzentration im Überstand von Präadipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.

IV Diskussion

IV.1 Allgemeine Diskussion

Die Erforschung der Funktion und Regulation der Adipokine Resistin und Progranulin ist von besonderem wissenschaftlichem Interesse, da beide Adipokine eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Volkskrankheit Diabetes mellitus Typ II spielen könnten [135], [82]. Des Weiteren scheinen beide Adipokine in der Regulation von Inflammation und in der Entstehung atherosklerotischer Plaques und damit in das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse involviert zu sein [24], [58].

Ob, in welchem Maße und unter welchen Bedingungen Adipokine die Bluthirnschranke überqueren, ist bislang noch bei vielen Vertretern dieser Proteingruppe ungeklärt. Umso wichtiger ist die Erhebung von Daten aus gepaarten Serum- und Liquorproben für den Nachweis der Existenz einer Fettgewebe-Gehirn Achse, wie es zum Beispiel für Leptin bereits prominent gezeigt werden konnte [144].

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen der Adipokine Resistin und Progranulin in einem großen, gut charakterisierten Studienkollektiv in Serum und Liquor quantifiziert und in einen Kontext mit diversen klinischen und laborchemischen Parametern gesetzt. Hierdurch werden Rückschlüsse auf die physiologischen und pathophysiologischen Regulationsmechanismen der Adipokine im humanen Organismus ermöglicht. Insbesondere die Erhebung der Konzentrationen der Adipokine im Liquor stellt ein Alleinstellungsmerkmal dieser Studie dar. Die Liquorproben wurden nicht, wie zumeist in Kohortenstudien, prospektiv von Patienten mit einem einzigen einheitlichen Krankheitsbild gesammelt, sondern entstammen dem allgemeinen Patientengut der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen ohne vorherige Selektion.

Das Konzept dieser retrospektiven Studie erlaubt die Durchführung von Korrelationsanalysen, eine deskriptive Auswertung der Ergebnisse sowie die erstmalige und umfangreiche Berechnung von Serum- und Liquorquotienten im Krankheitsbezug.

Aufbauend auf und in Ergänzung zu den Daten aus dem klinischen Kollektiv wurde in einem umfangreichen grundlagenwissenschaftlichen Ansatz die adipozytäre Regulation von Expression und Sekretion der beiden untersuchten Adipokine erforscht. Zu diesem Zweck erfolgten Stimulationsversuche in-vitro an Zellen der Linie 3T3-L1, die ein etabliertes und hervorragend charakterisiertes Adipozyten-Modell darstellen. In diesem Modell konnten die Effekte verschiedener Stimulantien auf die Adipokin-Sekretion von Adipozyten auf zellulärer Ebene untersucht werden. Die Auswahl der Stimulantien erfolgte anhand der Ergebnisse aus dem Studienkollektiv sowie der aktuellen wissenschaftlichen Literatur.

Durch die kombinierte Betrachtung der Ergebnisse der Korrelationsanalysen aus dem Studienkollektiv und der Ergebnisse der Zellkulturversuche konnten neue Erkenntnisse über die Funktion und Regulation der Adipokine Resistin und Progranulin auf zellulärer wie physiologischer Ebene gewonnen werden.

IV.2 Spezielle Diskussion: Resistin

Die Resistin-Konzentrationen waren in allen Serumproben messbar, während im Liquor die Resistin-Konzentrationen nur bei 112 Proben über der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Kits lagen. Diese konnten im Hinblick auf verschiedene laborchemische und klinische Daten auf Zusammenhänge untersucht werden.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche können unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Studienkollektivs weitergehend interpretiert werden. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Zellkulturversuche zeigt **Tabelle IV.2.1**.

In dem untersuchten Studienkollektiv zeigte sich bei Frauen durchschnittlich eine höhere Resistin-Konzentration im Serum als bei Männern ($p= 0.003$). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse aus verschiedenen publizierten Kollektiven [160], [124]. In manchen Studien korrelierte die Resistin-Konzentration im Serum mit dem BMI [145] und dem prozentualen Fettanteil [160]. In der hier untersuchten Studienpopulation bestand indes kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem BMI der Probanden. Aufgrund des beobachteten Sexualdimorphismus der Serumspiegel wurde in-vitro eine Hypothese getestet, der zufolge die Geschlechtshormone einen Einfluss auf die Resistin-Produktion haben könnten. Im Stimulationsversuch mit Testosteron an 3T3-L1-Adipozyten ließ sich ein signifikanter Rückgang der Resistin-Sekretion nachweisen ($p= 0.041$), sodass eine durch Geschlechtshormone vermittelte Ursache für den Unterschied der Resistin-Konzentrationen im Serum bei Männern und bei Frauen denkbar ist. Estradiol hatte in den getesteten Dosierungen keinen Einfluss auf die Resistin-Sekretion aus Adipozyten.

Im Tiermodell konnte ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Resistin und der peripheren Insulinresistenz mit der Folge der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II nachgewiesen werden [135]. Ursächlich hierfür sind vermutlich unter anderem die durch Resistin gesteigerte Glukoneogenese [114] und die verminderte insulinabhängige Glukoseaufnahme in peripheren Geweben [87].

Ob im humanen Organismus eine ähnliche Kausalität existiert, wird aktuell in der Literatur kontrovers diskutiert. Obwohl in einigen Studien ein Zusammenhang der systemischen Resistin-Konzentration mit dem Metabolischen Syndrom [6], [98], Diabetes mellitus Typ II [2], [83] oder Adipositas [152] gezeigt werden konnte, konnte

kein direkter Zusammenhang zwischen der Resistin-Konzentration und dem Ausmaß der Insulinresistenz nachgewiesen werden [152], [71].

In der vorliegenden Studie wurde keine erhöhte Konzentration des Resistin im Serum bei Typ II Diabetikern festgestellt. Auch zeigte sich keine Korrelation mit dem HbA1c-Wert. Dennoch wurde in den Zellkulturversuchen die Regulation von Resistin unter dem Einfluss von metabolischen Parametern untersucht, da die Wirkung von Resistin auch auf zellulärer Ebene parakrin oder autokrin vermittelt sein könnte, ohne nachweisbare Änderung der systemischen Resistin-Konzentration.

Im Tiermodell ließen sich Veränderungen der Resistin-Konzentration in Abhängigkeit von der Ernährung zeigen [115]. Diese Veränderungen könnten sowohl über das direkte Substrat der Nahrung, wie zum Beispiel Glukose oder Fettsäuren, als auch indirekt über hormonelle Reize vermittelt sein. Zur Klärung dieser Fragen wurde die Sekretion von Resistin aus 3T3-L1 Adipozyten unter Stimulation mit verschiedenen Faktoren untersucht. Durch die Stimulation der Adipozyten mit Glukose, die Stimulation mit Insulin sowie durch die Costimulation mit Glukose und Insulin konnte die Resistin-Sekretion gesteigert werden. Des Weiteren wurde der Effekt von GIP und GLP-1 auf die Adipozyten untersucht. GIP und GLP-1 sind Inkretine, die die glukoseabhängige Insulinausschüttung induzieren und über zentrale Mechanismen bei Nahrungsaufnahme das Sättigungsgefühl vermitteln [11]. In den hier vorgestellten Zellkulturversuchen hemmten sowohl GIP als auch GLP-1 die Resistin-Sekretion dosisabhängig, was eine weitere Verknüpfung von Resistin mit dem Glukosemetabolismus nahe legt. Bei Ratten steigert Resistin die Bildung freier Fettsäuren [122] und die Expression der Enzyme der Lipogenese in der Leber und im weißen Fettgewebe [149]. In den Zellkulturversuchen konnte eine erhöhte Resistin-Sekretion unter Stimulation mit Palmitinsäure nachgewiesen werden. Palmitinsäure gehört zu den nichtessentiellen gesättigten Fettsäuren, die durch Lipogenese *de novo* produziert werden kann [73]. Im Gegensatz dazu sinkt die Resistin-Sekretion unter der Stimulation mit einfach ungesättigten Fettsäuren wie Palmitoleinsäure oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linolsäure, Eicosapentaensäure, Arachidonsäure oder Docosahexaensäure. Die Sekretion von Resistin aus 3T3-L1 Adipozyten kann also sowohl durch Glukose und Fettsäuren, als auch durch Insulin und Inkretine beeinflusst werden. Inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können, ist aktuell noch unklar und wird in künftigen Forschungsansätzen in humanen Adipozyten sowie im gewebe- und gesamtphysiologischen Kontext zu prüfen sein.

Burnett et al. [24] zeigten bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit eine erhöhte Resistin-Konzentration im Serum. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte sowohl in murinen als auch in humanen atherosklerotischen Plaques eine erhöhte Resistin-Expression nachgewiesen werden [24], die pathophysiologisch durch eine gesteigerte Expression von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) in Endothelzellen unter der Stimulation durch Resistin erklärt werden könnte [24], [151].

Die Resistin-Konzentration im Serum korrelierte im untersuchten Kollektiv positiv mit der LDL-Cholesterin-Konzentration ($p= 0.002$, $r= + 0.389$). Insbesondere ist diese Korrelation unabhängig von Geschlecht, Alter, BMI, sowie von Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und CRP im Serum. Durch diese partielle Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Resistin-Konzentration im Serum einen unabhängigen Risikofaktor für eine erhöhte LDL-Cholesterin-Konzentration im Serum darstellt.

Interessanterweise konnte in den Zellkulturversuchen durch die Stimulation mit Simvastatin eine Reduktion der Resistin-Sekretion erreicht werden ($p= 0.004$). Simvastatin ist ein Medikament, das über die Reduktion des LDL-Cholesterins im Serum zur Primärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse eingesetzt wird [123].

Die Resistin-Konzentration im Serum wäre folglich ein Statin-sensitiver Parameter, der zur Stratifizierung von Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko angewendet werden könnte.

Beim Menschen wird Resistin insbesondere von Monozyten [74] und Makrophagen [91] produziert. Wie bereits erwähnt, finden sich bei inflammatorischen Prozessen erhöhte Resistin-Konzentrationen, wie zum Beispiel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [56] oder der rheumatoiden Arthritis [23]. Konkordant hierzu zeigte die Resistin-Konzentration im Serum in der vorliegenden Studie positive Korrelationen zu systemischen Entzündungsparametern, wie der Leukozyten-, der CRP- und der Immunglobulin-Konzentration im Serum (**Tabelle III.2.2**). Die Resistin-Konzentration in humanem Serum kann also als Surrogatparameter für ein systemisches Entzündungsgeschehen gewertet werden.

In-vitro wurde die Resistin-Sekretion aus murinen 3T3-L1 Adipozyten nicht durch inflammatorische Stimuli wie LPS, IL-6 oder TNF- α beeinflusst.

Die Funktion, Resistin als proinflammatorisches Zytokin zu sezernieren, scheint im humanen Organismus hauptsächlich von Monozyten erfüllt zu werden.

Im Tiermodell beeinflusst Resistin über die Kommunikation zwischen Fettgewebe und Gehirn den Glukosemetabolismus [89], [149] und die Nahrungsaufnahme [29]. Inwieweit

auch im humanen Organismus eine Kommunikation zwischen dem Fettgewebe und dem Gehirn durch Resistin existiert, ist bisher noch nicht geklärt.

Im Liquor ließ sich die Resistin-Konzentration in 112 Proben quantifizieren. In den übrigen Liquorproben lag die Resistin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs von 31.2 pg/ml. Innerhalb dieser 112 Proben zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Resistin-Konzentration im Serum und der Resistin-Konzentration im Liquor ($p= 0.004$). Des Weiteren steigt die Resistin-Konzentration im Liquor in Abhängigkeit vom Grad der Schrankenstörung ($p= 0.001$). Ferner ist die Resistin-Konzentration auch dann erhöht, wenn sich eine größere Anzahl an Zellen im Liquor befinden ($p= 0.009$). Ein Unterschied der Resistin-Konzentration im Liquor zwischen den Subgruppen der neurologischen Diagnosen war allerdings nicht nachweisbar.

Eine besondere Bedeutung ist dem hier erstmals beschriebenen Liquor-/ Serum-Quotienten für Resistin zuzuschreiben. Durch ihn können Rückschlüsse auf die Permeabilität der Bluthirnschranke für Resistin gezogen werden. Allerdings sollte bei der Interpretation des Quotienten die Möglichkeit einer autochthonen Produktion von Resistin im zentralen Nervensystem nicht außer Acht gelassen werden, da dies den Quotienten beeinflussen würde. Die Beschreibung des Quotienten dient der Etablierung eines künftigen Normbereiches auf Basis dieser Daten.

Die aus dem Studienkollektiv gewonnenen Daten legen also eine Permeabilität der Bluthirnschranke für Resistin unter physiologischen Bedingungen nahe, die im Rahmen pathophysiologischer Prozesse durch Störung der Bluthirnschranke erleichtert ist. Dieses Erkenntnis lässt beim Menschen eine Kommunikation zwischen dem Fettgewebe und dem Gehirn über das Adipokin Resistin vermuten. Allerdings kann auch eine Eigenproduktion von Resistin durch Zellen im Liquor oder auch durch Mikroglia nach aktuellem Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Studie sollten anhand von prospektiven Studien bestätigt und anhand von ergänzenden in vitro Versuchen weitergehend untersucht werden.

Resistin	Induktion	Depression
Hormone:		
Testosteron		↓
Estradiol	=	=
GLP-1		↓
GIP		↓
Zytokine:		
TNF- α	=	=
IL-6	=	=
LPS	=	=
Metabolische Faktoren:		
Glukose	↑	
Insulin	↑	
Glukose + Insulin	↑	
Simvastatin		↓
Palmitinsäure	↑	
Palmitoleinsäure		↓
Linolsäure		↓
Eicosapentaensäure		↓
Arachidonsäure		↓
Docosahexaensäure		↓
Weitere freie Fettsäuren	=	=

23: **Tabelle IV.2.1:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Zellkulturversuche für Resistin.

IV.3 Spezielle Diskussion: Progranulin

Im vorliegend untersuchten Studienkollektiv konnten die Progranulin-Konzentrationen in allen 270 Serum- und Liquorproben bestimmt werden.

Eine zusammenfassende Darstellung der Zellkulturergebnisse für Progranulin zeigt **Tabelle IV.3.1**.

Die Progranulin-Konzentration im Serum zeigte keinen Unterschied hinsichtlich des Geschlechts. Todoric et al. [140] beschrieben hingegen einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Progranulin und Östrogen sowie Progesteron beim Menschen. In den Zellkulturversuchen ließ sich dieser Zusammenhang teilweise bestätigen. So wurde die Progranulin-Sekretion durch die Stimulation von Präadipozyten mit Estradiol gesteigert, während die Sekretion von reifen Adipozyten nicht durch Estradiol beeinflusst wurde. Die Stimulation mit Testosteron konnte weder bei unreifen, noch bei reifen Adipozyten die Progranulin-Sekretion beeinflussen.

Ein regulativer Einfluss von Geschlechtshormonen auf die zelluläre Progranulin-Sekretion scheint mithin denkbar, ohne allerdings Niederschlag in einem statistisch signifikanten Geschlechtsunterschied hinsichtlich der zirkulierenden Progranulin-Konzentration zu finden.

In der vorliegenden Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der Progranulin-Konzentration im Serum und dem HbA1c ($p= 0.021$) nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber keine Korrelation mit dem BMI oder ein Unterschied in den Subgruppen der Patienten mit Diabetes mellitus. Im Gegensatz hierzu konnte in einer Studie mit 168 chinesischen Patienten neben der positiven Korrelation zwischen Progranulin und dem HbA1c auch eine höhere Progranulin-Konzentration bei adipösen Menschen und an Diabetes mellitus Typ II Erkrankten nachgewiesen werden [113]. Es gab allerdings verschiedene Ausschlusskriterien der Studienteilnahme, unter anderem akute oder chronische entzündliche Erkrankungen [113]. In der hier vorliegenden Studie zeigte sich indessen eine positive Korrelation zwischen der Progranulin-Konzentration und der CRP-Konzentration, sodass der Nachweis eines möglichen Zusammenhangs zwischen Progranulin und Adipositas oder Diabetes mellitus Typ II hier durch den Einfluss von inflammatorischen Prozessen gestört worden sein könnte. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Zellkulturversuche insofern gestärkt, als dass die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-6, sowie die Stimulation mit LPS dosisabhängig zu einer gesteigerten Progranulin-Sekretion aus 3T3-L1 Adipozyten führte.

In den durchgeführten Zellkulturversuchen wurde die Progranulin-Sekretion durch die Stimulation mit Glukose, Insulin und durch die Co-Stimulation mit Glukose und Insulin in

Prädipozyten inhibiert. In Adipozyten konnte die Progranulin-Sekretion durch diese Stimuli nicht beeinflusst werden. Die Inkretine GLP-1 und GIP hatten dosisabhängig unterschiedliche Effekte auf die Progranulin-Sekretion. Insgesamt war allerdings eher ein Abfall der Progranulin-Sekretion zu beobachten.

Durch diese Versuche konnte ein Zusammenhang zwischen der Progranulin-Sekretion und dem Glukosemetabolismus auf zellulärer Ebene hergestellt werden. Diese Interaktionen scheinen aber systemisch betrachtet durch inflammatorische Prozesse gestört zu werden. Allerdings ist hierbei nicht geklärt, inwieweit Progranulin selbst oder die verschobene Relation zwischen Progranulin und Granulin im Rahmen inflammatorischer Prozesse [65] hierfür verantwortlich ist.

Die Zusammensetzung freier Fettsäuren im Plasma spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Metabolischen Syndroms [99]. Zum Beispiel ist eine verminderte Konzentration von ungesättigten Fettsäuren mit einer erhöhten Insulinresistenz assoziiert [141]. Ähnlich wie die Resistin-Sekretion, ließ sich die Progranulin-Sekretion aus Adipozyten durch die Stimulation mit Palmitinsäure steigern. Des Weiteren induziert auch die Stimulation mit der gesättigten Myristinsäure die Progranulin-Sekretion. Inhibiert wird die Progranulin-Sekretion vornehmlich durch die Stimulation mit ungesättigten Fettsäuren, wie der Öl-, Palmitolein-, Arachidon- oder Docosahexaensäure.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die pathophysiologische Grundlage für die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms in Abhängigkeit von der Zusammensetzung freier Fettsäuren unter anderem durch eine Modulation der Progranulin-Sekretion bedingt sein könnte.

Die Progranulin-Konzentration im Serum zeigt ähnlich wie die Resistin-Konzentration im Serum eine positive Korrelation zur LDL-Cholesterin-Konzentration ($p= 0.002$, $r= + 0.186$). Auch hier war diese Korrelation unabhängig von verschiedenen denkbaren Störvariablen wie Geschlecht, Alter, BMI, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinwert oder CRP-Konzentration, sodass auch Progranulin als ein möglicher kardiovaskulärer Risikofaktor infrage kommt. In humanen atherosklerotischen Plaques wurde eine gesteigerte Progranulin-Expression beschrieben, sodass auch ein kausaler Zusammenhang zwischen Progranulin und der Ausbildung einer Atherosklerose wahrscheinlich ist [65]. In den vorliegenden Zellkulturversuchen in Adipozyten konnte die Progranulin-Sekretion allerdings nicht durch die Stimulation mit Simvastatin beeinflusst werden, im Gegensatz zu Resistin. Bei der ferner beobachteten positiven Korrelation zwischen Resistin und Progranulin im Serum ließ sich die LDL-Cholesterin-Konzentration als entscheidend konfundierende Variable ermitteln.

Obwohl beide Adipokine eine Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose spielen [24], [65] und beide als potentielle Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse betrachtet werden können, konnte in der vorliegenden Studie somit kein direkter Zusammenhang auf Ebene der systemischen Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden.

Die Progranulin-Konzentration im Liquor korreliert signifikant mit verschiedenen inflammatorischen Parametern des zentralen Nervensystems im Liquor, wie zum Beispiel mit der Zellzahl, der Konzentration des Gesamteiweißes oder der Immunglobuline im Liquor. Dementsprechend steigt die Progranulin-Konzentration mit dem Grad der Schrankenstörung an.

Auch für Progranulin wurde der Liquor-/ Serum-Quotient als Grundlage zur Etablierung von Normbereichen erstmalig berechnet. Insbesondere zeigt sich sowohl ein erhöhter Liquor-/ Serum-Quotient für Progranulin ($p < 0.001$) als auch eine erhöhte Progranulin-Konzentration ($p < 0.001$) bei Patienten mit infektiösen ZNS-Erkrankungen im Vergleich zu allen anderen Subgruppen der neurologischen Diagnosen. Interessanterweise sind auch der Liquor-/ Serum-Quotient für Progranulin ($p = 0.001$) und die Progranulin-Konzentration im Liquor ($p < 0.001$) höher in Proben mit positiven oligoklonalen Banden, obwohl sich in der Subgruppe der Patienten mit Multipler Sklerose kein Unterschied in der Progranulin-Konzentration im Vergleich zu den anderen neurologischen Diagnosen zeigt. Die Patienten mit Multipler Sklerose wurden allerdings aufgrund der kleinen Fallzahl nicht nach der Verlaufsform oder der Aktivität der Erkrankung differenziert, wodurch ein möglicher Zusammenhang im vorliegenden Kollektiv verdeckt werden könnte. Vercellino et al. [150] konnten hingegen erhöhte Progranulin-Konzentrationen im Liquor während eines Schubes der Multiplen Sklerose nachweisen.

Während eine verminderte Progranulin-Konzentration im Liquor ein etablierter Marker für neurodegenerative Erkrankungen ist [118], legen die hier vorgestellten Daten eine potentielle Rolle des erhöhten Liquor-/ Serum-Quotienten für Progranulin und der erhöhten Progranulin-Konzentration als Biomarker für infektiöse ZNS-Erkrankungen nahe.

Obwohl die Progranulin-Konzentrationen im Serum und Liquor positiv korrelieren, ist letztendlich nicht geklärt, ob das Progranulin im Liquor vornehmlich durch ein Übertreten der Bluthirnschranke oder vielmehr in der Hauptsache aus autochthoner Produktion durch lokale Zellen des zentralen Nervensystems stammt. In der vorliegenden Studie wurden sowohl ein Zusammenhang mit dem Grad der Schrankenstörung und eine positive Korrelation zwischen den Liquor/Serum-Quotienten von Progranulin und Albumin, als auch ein Zusammenhang mit der Zellzahl im Liquor nachgewiesen, sodass

die gemessenen Progranulin-Spiegel im Liquor möglicherweise aus ein paralleles Wirken beider Mechanismen zurückzuführen sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Studie sollten künftig in prospektiven Studien bestätigt werden.

Progranulin	Induktion	Depression
Hormone:		
Testosteron	=	=
Estradiol	↑*	
GLP-1		↓
GIP		↓
Zytokine:		
TNF-α	↑	
IL-6	↑	
LPS	↑	
Metabolische Faktoren:		
Glukose		↓*
Insulin		↓*
Glukose + Insulin		↓*
Simvastatin	=	=
Palmitinsäure	↑	
Laurinsäure		↓
Myristinsäure	↑	
Stearinsäure		↓
Ölsäure		↓
Palmitoleinsäure		↓
Arachidonsäure		↓
Docosahexaensäure		↓
Weitere freie Fettsäuren	=	=

24: **Tabelle IV.3.1:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Zellkulturversuche für Progranulin. (* Versuch mit Präadipozyten)

IV.4 Fazit und Ausblick

Durch die kollektive Betrachtung der Ergebnisse aus dem Studienkollektiv und den Zellkulturversuchen lassen sich Rückschlüsse auf physiologische und zelluläre Funktionen und Regulation der Adipokine Resistin und Progranulin ziehen.

Beide Adipokine werden in ihrer adipozytären Sekretion durch Geschlechtshormone beeinflusst. Für Resistin zeigten sich die Ergebnisse aus dem Studienkollektiv und aus den Zellkulturversuchen als kongruent. Im Falle von Progranulin stand dem in den Zellkulturversuchen nachgewiesenen regulativen Einfluss von Estradiol hingegen kein statistisch signifikanter Sexualdimorphismus auf Ebene der zirkulierenden Proteinkonzentration gegenüber. Inwieweit die Regulation der Adipokine durch Geschlechtshormone im humanen Organismus relevant ist, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Die vorgelegten Daten bilden eine valide Grundlage für künftige Forschungsansätze in dieser Richtung, die humane Adipozyten ebenso einbeziehen sollten wie Untersuchungen zu mechanistischen und gewebephysiologischen Aspekten der Regulation beider Adipokine.

Sowohl die Resistin- als auch die Progranulin-Sekretion aus Adipozyten wurden durch verschiedene metabolische Faktoren, wie Glukose, Insulin, Inkretine oder Fettsäuren *in vitro* beeinflusst.

Während im Studienkollektiv kein Zusammenhang zwischen der Resistin-Konzentration und metabolischen Parametern gefunden werden konnte, zeigte sich Resistin im Serum als Surrogatparameter für ein systemisches Entzündungsgeschehen. Im Mausmodell konnten Steppan et al. [135] einen kausalen Zusammenhang zwischen Resistin und der Entwicklung der Insulinresistenz nachweisen. Resistin könnte also beim Menschen das entscheidende Bindeglied zwischen der chronischen Entzündung bei Adipositas und der Entwicklung von Insulinresistenz und der Volkskrankheit des Diabetes mellitus Typ II darstellen. Es könnte einen neuen Ansatzpunkt zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II bieten, indem es nicht direkt in den Glukosemetabolismus eingreift, sondern die für die Insulinresistenz verantwortliche chronische Inflammation beeinflusst.

Für Progranulin konnte im Studienkollektiv ein Zusammenhang mit der Höhe des HbA1c-Wertes nachgewiesen werden, während sich ansonsten keine Hinweise auf Verbindungen zu metabolischen Parametern zeigten. Wie bereits ausgeführt, könnte dies dem Einschluss von Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen geschuldet sein, da in den Zellkulturversuchen die Modulation der Progranulin-Sekretion durch proinflammatorische Zytokine nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass Progranulin im Rahmen von entzündlichen Prozessen in Granuline

gespalten wird [60]. Die Klärung der Frage, welche dieser Hypothesen zutreffend ist, sollte Gegenstand künftiger mechanistischer Studien sein.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss bedacht werden, dass es sich bei der verwendeten Zelllinie um murine Zellen handelt. Im humanen Organismus werden die vorgestellten Adipokine nicht nur von Adipozyten [69], [164], sondern zu großen Anteilen auch von anderen Zelltypen, insbesondere von Monozyten [116], [65], produziert. Die in vitro gewonnenen Ergebnisse sollten daher generell an Hand von geeigneten Zellkulturversuchen an humanen Adipozyten und humanen Monozyten verifiziert werden.

Die Resistin- und Progranulin-Konzentrationen im Serum stellen den Beobachtungen im vorgestellten Studienkollektiv zufolge unabhängige Risikofaktoren für die Höhe der LDL-Konzentration und damit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse dar. Inwieweit diese in der Praxis relevant sind und ob sie sogar Möglichkeiten zur Intervention und damit zur Reduktion solcher Ereignisse bieten, sollte in weiteren Studien an geeigneten Patientenkohorten untersucht werden. Es ist von großer Bedeutung, die Forschung dahingehend voranzutreiben, da die kardiovaskulären Ereignisse immer noch an erster Stelle der Todesfallstatistik in Deutschland stehen [117].

Als Hauptergebnis konnte für beide Adipokine die Existenz im humanen Liquor nachgewiesen und quantifiziert werden. Aufgrund der positiven Korrelation der jeweiligen Serum- und Liquor-Konzentrationen ist eine Permeabilität der Bluthirnschranke für beide Adipokine gegeben und es konnten erstmals valide Serum-/Liquor-Quotienten errechnet werden. Diese Daten liefern wertvolles Material für eine künftige Etablierung von Normbereichen.

Sowohl die Resistin- als auch die Progranulin-Konzentrationen im Liquor sind von dem Grad der Schrankenstörung und von der Höhe der Zellzahl im Liquor abhängig. Es ist daher noch unklar, ob die Adipokine ausschließlich durch die Überquerung der Bluthirnschranke oder zusätzlich durch eine autochthone Produktion des zentralen Nervensystems, zum Beispiel bei einer Infektion, in den Liquor gelangen. Hierzu sind weitere Untersuchungen, zum Beispiel Zellkulturversuche an humanen Mikroglia, humanen Neuronen und an primären Zellen aus dem humanen Liquor notwendig.

Interessanterweise ist die Progranulin-Konzentration bei Patienten mit infektiösen ZNS-Erkrankungen im Vergleich zu allen anderen Subgruppen der neurologischen Erkrankungen signifikant erhöht. Progranulin ist daher als ein potentieller Prädiktor für infektiöse ZNS-Erkrankungen zu betrachten. Welche Rolle Progranulin in diesem Zusammenhang spielt, muss noch detaillierter untersucht werden. Zum einen wurden

für Progranulin neuroprotektive [119] und antiinflammatorische [65] Effekte nachgewiesen. Zum anderen gelten die Spaltprodukte des Progranulins, die Granuline [167], als proinflammatorisch [46]. Zur weiteren Klärung der Funktion von Progranulin im Rahmen infektiöser ZNS-Erkrankungen, könnte in prospektiven Studien die quantitative Bestimmung der Granuline im Liquor vor und nach erfolgreicher Therapie dienen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen im Studienkollektiv wurden **2016 im „European Journal of Clinical Investigation“** publiziert [18].

In dem hier vorgestellten Studienkollektiv wurden neben Resistin und Progranulin auch die Serum- und Liquor-Konzentrationen der Adipokine Adipsin und CTRP-3 bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden für Adipsin im Jahr **2016 in „Clinical Endocrinology“** [128] und für CTRP-3 im Jahr **2017 im „European Journal of Clinical Investigation“** [127] publiziert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie leisten einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Funktion und Regulation der Adipokine Resistin und Progranulin und bieten die Grundlage für neue Forschungsinitiativen insbesondere im Hinblick auf die endokrine Kommunikation zwischen Fettgewebe und Gehirn.

Kernaussagen:

- Hauptergebnis dieser Arbeit ist der Proof-of-Principle einer Fettgewebe-Gehirn-Achse, als deren mögliche Mediatoren Resistin und Progranulin in humanem Liquor nachweisbar sind.
- Für beide Adipokine konnten erstmals in der Literatur die entsprechenden Liquor-/ Serum-Quotienten berechnet werden als Basis für eine künftige klinische Normwert-Etablierung (Resistin: $4.4 \pm 5.8 \times 10^{-3}$, Progranulin: $16.3 \pm 8.6 \times 10^{-3}$).
- Die Konzentrationen von Resistin und Progranulin im Liquor nehmen mit dem Grad der Schrankenstörung zu.
- Progranulin ist ein potentieller Prädiktor für infektiöse Erkrankungen des zentralen Nervensystems.
- Die Resistin-Konzentration im Serum ist ein Surrogatparameter für ein systemisches Entzündungsgeschehen.
- Die Resistin- und Progranulin-Konzentrationen im Serum sind unabhängige Risikofaktoren für die Konzentration des LDL-Cholesterins und damit auch für kardiovaskuläre Ereignisse.
- Die adipozytäre Resistin- und die Progranulin-Sekretion werden über verschiedene metabolische Faktoren, wie Glukose, Insulin, Inkretine oder Fettsäuren, beeinflusst.
- Die Progranulin-Sekretion aus Adipozyten unterliegt einer Regulation durch inflammatorische Prozesse.
- Die Resistin-Konzentration im Serum ist bei Männern niedriger als bei Frauen. In Übereinstimmung damit wird die adipozytäre Resistin-Sekretion durch Testosteron inhibiert.
- Die Progranulin-Sekretion kann durch Estradiol aus Präadipozyten beeinflusst werden.

V Zusammenfassung

Die Funktion des Fettgewebes als hormonproduzierendes Organ – und somit als endokrine Drüse – ist ein neues und sehr komplexes Forschungsgebiet. Durch Adipokine, die vom Fettgewebe produzierten Hormone, kann das Fettgewebe mit verschiedenen Organen kommunizieren und in diverse Regelkreise des menschlichen Körpers eingreifen. Bisher konnte nur für wenige Adipokine, wie Leptin und Adiponektin, die Permeabilität der Bluthirnschranke und damit ein Indiz für die Existenz einer Fettgewebe-Gehirn-Achse nachgewiesen werden. Dem Adipokin Resistin werden proinflammatorische Eigenschaften zugewiesen und es scheint, zumindest im Mausmodell, eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Insulinresistenz zu spielen. Progranulin ist ein Adipokin mit vornehmlich antiinflammatorischen, wachstumsfaktorähnlichen und neuroprotektiven Effekten.

In einem gut charakterisierten Kollektiv von 270 Patienten wurden in gepaarten Serum- und Liquorproben die Konzentrationen der Adipokine Resistin und Progranulin mittels ELISA bestimmt und in Zusammenhang mit anthropometrischen und laborchemischen Parametern gesetzt. Die Resistin-Konzentration im Serum war bei Frauen höher als bei Männern. Sowohl Resistin als auch Progranulin korrelierten unabhängig mit der LDL-Cholesterin-Konzentration und könnten damit neue unabhängige Risikofaktoren oder Surrogatparameter für kardiovaskuläre Ereignisse darstellen. Durch die positive Korrelation von Resistin im Serum mit verschiedenen Entzündungsparametern, wie der Leukozytenzahl oder der CRP-Konzentration, stellt Resistin einen Surrogatparameter für ein systemisches Entzündungsgeschehen dar. Beide Adipokine waren im humanen Liquor in einem breiten Konzentrationsbereich nachweisbar, wobei die Resistin-Konzentration nur bei 112 von 270 Patienten oberhalb der unteren Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs lag. Für beide Adipokine konnten erstmals in der Literatur die entsprechenden Liquor-/ Serum-Quotienten berechnet werden als Basis für eine künftige klinische Normwert-Etablierung (Resistin: $4.4 \pm 5.8 \times 10^{-3}$, Progranulin: $16.3 \pm 8.6 \times 10^{-3}$). Die Konzentrationen beider Adipokine im Liquor stiegen mit dem Grad der Störung der Bluthirnschranke und mit der Zellzahl im Liquor an. Bei Patienten mit infektiösen ZNS-Erkrankungen war die Progranulin-Konzentration im Liquor erhöht, sodass diese einen möglichen Prädiktor für infektiöse ZNS-Erkrankungen darstellt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Regulation dieser Adipokine anhand von Zellkulturversuchen mit der murinen Zelllinie der 3T3-L1 Adipozyten und Präadipozyten weitergehend untersucht. Beide Adipokine konnten in ihrer (prä-)adipozytären Sekretion durch Sexualhormone beeinflusst werden. Die Sekretion von Resistin und Progranulin aus Adipozyten wurde durch verschiedene metabolische Faktoren, wie Glukose, freie

Fettsäuren, Insulin und Inkretine, wie GLP-1 oder GIP, beeinflusst. In vitro konnte die Progranulin-Sekretion durch Stimulation mit proinflammatorischen Faktoren wie LPS, IL-6 oder TNF- α induziert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der lokalen, adipozytären und systemischen Funktion und Regulation der Adipokine Resistin und Progranulin und bieten die Grundlage für weiterführende Forschungsansätze einerseits im Hinblick auf die endokrine Kommunikation über die Fettgewebe-Gehirn-Achse andererseits für die Differentialdiagnose neurologischer Erkrankungen.

V Summary

The role of adipose tissue as a hormone-producing, hence endocrine organ, is a newly discovered and highly complex field of research. Through hormones secreted by adipose tissue, so-called adipokines, the adipose tissue is able to communicate with many organs and to affect various regulatory circuits in the human body. Up until now, the permeability of the blood-brain barrier for adipokines has been proven for only a few adipokines such as leptin and adiponectin and with it the potential existence of a postulated fat-brain axis. The adipokine resistin is known to have proinflammatory properties. It appears to be causally involved in the development of an insulin resistance at least in mice. Progranulin is an adipokine with antiinflammatory, growthfactor-like and neuroprotective functions.

In a well characterized study population of 270 patients, paired serum and cerebrospinal fluid concentrations of the adipokines resistin and progranulin were measured by ELISA and correlation analysis was applied involving anthropometric data and routine parameters. In serum, resistin concentration was higher in women compared to men. Resistin as well as progranulin concentration correlated with LDL-cholesterol in serum independently. They might represent novel and independent risk factors or surrogates for cardiovascular events. Resistin in serum is correlated with inflammatory markers such as cell count of leukocytes or CRP-concentration. Therefore, resistin might be a surrogate parameter for systemic inflammation. Both adipokines were detectable in a wide range in human cerebrospinal fluid, but resistin levels were within the ELISA's detection limit in 112 of total 270 samples only. For the first time, we provide data to establish a baseline for a CSF-/serum-quotient (Resistin: $4.4 \pm 5.8 \times 10^{-3}$, Progranulin: $16.3 \pm 8.6 \times 10^{-3}$). Concentrations of both adipokines were increased along with the level of functional dysregulation of the blood-brain barrier as well as along with the amount of cells in cerebrospinal fluid. Patients with infectious diseases in the central nervous system had increased progranulin concentrations in cerebrospinal fluid, suggesting progranulin to be a potential predictor of infectious diseases in the central nervous system.

Based on the findings, experiments within the murine cell-line of 3T3-L1 adipocytes and preadipocytes were performed in order to investigate the regulation of these adipokines on cellular level in detail. Both adipokines were influenced by sex hormones respective to their (pre-)adipocyte secretion levels. Secretion in 3T3-L1 adipocytes of resistin and progranulin was altered by diverse metabolic factors such as glucose, free fatty acids, insulin or incretins such as GLP-1 or GIP. In-vitro only progranulin was induced by proinflammatory parameters such as LPS, IL-6 or TNF- α .

The results of the presented study are a substantial contribution to the understanding of local as well as systemic function and regulation of the adipokines resistin and

progranulin and provide a basis for future research approaches, especially regarding the endocrine communication via a fat-brain axis as well as differential diagnosis of neurological diseases.

VI. Verzeichnisse

VI.1 Abkürzungsverzeichnis

ADSF	<i>adipose tissue-specific secretory factor</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ASP	<i>acylation stimulating protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninsäure</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
CAP1	<i>Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
CTRP-3	<i>C1q/TNF-related protein-3</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EphA2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i>
FIZZ1	<i>found in inflammatory zone 1</i>
FTD	<i>Frontotemporale Demenz</i>
GIP	<i>Glucose dependent insulinotropic Peptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>
GOT	<i>Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>
GPT	<i>Glutamat-Pyruvat-Transaminase</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HRP	<i>Meerrettichperoxidase</i>
IL-1 β	<i>Interleukin 1β</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>
LDH	<i>Laktatdehydrogenase</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MS	<i>Multiple Sklerose</i>
Max.	<i>maximaler Wert</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
Min.	<i>minimaler Wert</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
NAD	<i>Nicotinamidadenindinukleotid</i>

NAFLD	<i>nichtalkoholische Fettlebererkrankung</i>
NASH	<i>nichtalkoholische Steatohepatitis</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
ROR1	<i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor</i>
SD	<i>Standardabweichung</i>
SEM	<i>Standardfehler</i>
SLPI	<i>secretory leukocyte peptidase inhibitor</i>
TIA	<i>transitorisch ischämische Attacke</i>
TLR-4	<i>Toll-like Receptor-4</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor α</i>
TSH	<i>Thyreoidea-stimulierendes Hormon</i>
Var.	<i>Varianz</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
WHO	<i>world health organization</i>

VI.2 Abbildungsverzeichnis

1: Abbildung II.1: Tag 0 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Fibroblasten-ähnliche Zellen mit fibroblastischen Ausläufern ohne Lipideinlagerungen (Prä-Adipozyten) sind sichtbar.....	29
2: Abbildung II.2: Tag 3 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Es sind vereinzelt Lipideinlagerungen im Zytoplasma zu erkennen.	29
3: Abbildung II.3: Tag 6 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Die fibroblastischen Ausläufer bilden sich zurück und die Mehrzahl der Zellen enthält sichtbare Lipideinlagerungen.....	30
4: Abbildung II.4: Tag 7 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Die Lipideinlagerungen sind dichter.	30
5: Abbildung II.5: Tag 8 der Differenzierung, Vergrößerung: A x10, B x20, C x40. Die Zellen sind vollständig zu Adipozyten differenziert.....	30
6: Abbildung III.1.1: Altersverteilung der Studienteilnehmer.....	38
7: Abbildung III.1.2: Korrelationsanalyse zwischen Resistin in Serum und Liquor.....	40
8: Abbildung III.1.3: Korrelationsanalyse zwischen Progranulin in Serum und Liquor	40
9: Abbildung III.1.4: Verteilung der neurologischen Diagnosen	43
10: Abbildung III.2.1a: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	66
11: Abbildung III.2.1b: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich des Liquor-/Serum-Progranulinquotienten innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.....	67
12: Abbildung III.2.2a: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Resistin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Schrankenstörung“.....	68
13: Abbildung III.2.2b: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Schrankenstörung“.....	69
14: Abbildung III.2.3a: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Resistin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Zellzahl im Liquor“.....	70
15: Abbildung III.2.3b: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „Zellzahl im Liquor“.....	70

16: Abbildung III.2.4a: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Liquor innerhalb des klassifizierten Parameters „oligoklonale Banden“.	71
17: Abbildung III.2.4b: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich des Progranulin Liquor-/ Serum-Quotienten innerhalb des klassifizierten Parameters „oligoklonale Banden“.	72
18: Abbildung III.3.1: Effekt von LPS auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	73
19: Abbildung III.3.2: Effekt von IL-6 auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	74
20: Abbildung III.3.3: Effekt von TNF- α auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	75
21: Abbildung III.3.4: Effekt von Glukose und Insulin in Co-Stimulation auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1. Das Medium F-12 enthält nur 3.151g/l Glukose, während das DMEM-Medium 4.5g/l Glukose enthält. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	76
22: Abbildung III.3.5: Effekt von Glukose und Insulin in Co-Stimulation auf die Progranulin-Konzentration im Überstand unreifer 3T3-L1 Präadipozyten. Das Medium F-12 enthält nur 3.151g/l Glukose, während das DMEM-Medium 4.5g/l Glukose enthält. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	76
23: Abbildung III.3.6: Effekt von GLP-1 und GIP auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	77
24: Abbildung III.3.7: Effekt von GLP-1 und GIP auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	78
25: Abbildung III.3.8: Effekt von Simvastatin auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	79
26: Abbildung III.3.9: Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$	80
27: Abbildung III.3.10: Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$	81

28: Abbildung III.3.11: Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$	82
29: Abbildung III.3.12: Effekte verschiedener Fettsäuren auf die Progranulin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern. * signifikant mit $p < 0.05$, ** signifikant mit $p < 0.01$	83
30: Abbildung III.3.13: Effekt von Testosteron auf die Resistin-Konzentration im Überstand reifer 3T3-L1 Adipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.....	84
31: Abbildung III.3.14: Effekt von Estradiol auf die Progranulin-Konzentration im Überstand von Präadipozyten. Angegeben sind Fehlerbalken mit ± 2 Standardfehlern.	85

VI.3 Tabellenverzeichnis

1: Tabelle II.1.1: Auflistung der verwendeten Gerätetypen mit Herstellern	18
2: Tabelle II.1.2: Auflistung der verwendeten Materialien mit Herstellern	18
3: Tabelle II.1.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Herstellern	19
4: Tabelle II.5.1: Zusammenstellung der Zusätze für das Differenzierungsmedium und deren Konzentrationen	28
5: Tabelle: II.2 Liste der durchgeführten Stimulationsversuche mit Angabe des Lösungsmittels und der Endkonzentration	34
6: Tabelle III.1.1: Die Tabelle charakterisiert das Studienkollektiv bezüglich verschiedener anthropometrischer Daten, Serumparametern, Liquorparametern und neurologischen Diagnosen.	42
7: Tabelle III.2.1a: Deskriptive Statistik für die im Serum gemessenen Resistin-Werte [ng/ml].	44
8: Tabelle III.2.1b: Deskriptive Statistik für die im Serum gemessenen Progranulin-Werte [ng/ml].	45
9: Tabelle III.2.1c: Deskriptive Statistik für die im Liquor gemessenen Resistin-Werte [pg/ml]. Es wurden nur die über der Nachweisgrenze von ≥ 31.2 pg/ml liegenden Werte berücksichtigt (n = 112).	45
10: Tabelle III.2.1d: Deskriptive Statistik für die im Liquor gemessenen Progranulin-Werte [pg/ml].	46
11: Tabelle III.2.2: Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Resistin im Serum und numerischen Variablen.	48
12: Tabelle III.2.3: Korrelationsanalyse mittels des ANOVA-Tests zwischen Resistin im Serum und klassifizierten Parametern.	49
13: Tabelle III.2.4: Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Progranulin im Serum und numerischen Variablen.	52
14: Tabelle III.2.5: Partielle Korrelationsanalyse zwischen Resistin und LDL-Cholesterin im Serum mit Kontrolle für potentielle Störvariablen.	53
15: Tabelle III.2.6: Partielle Korrelationsanalyse zwischen Progranulin und LDL-Cholesterin im Serum unter Berücksichtigung potentieller Störvariablen.	54
16: Tabelle III.2.7: Partielle Korrelationsanalyse zwischen Resistin und Progranulin im Serum unter Berücksichtigung potentieller Störvariablen.	56
17: Tabelle III.2.8: Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Resistin im Liquor und numerischen Variablen. Es wurden lediglich die über der Nachweisgrenze von 31.2 pg/ml gelegenen Resistin-Konzentrationen ausgewertet (n = 112).	58

18: Tabelle III.2.9: Korrelationsanalyse mittels des ANOVA-Tests zwischen Resistin im Liquor und klassifizierten Parametern. Es wurden lediglich die über der Nachweisgrenze von 31.2 pg/ml gelegenen Resistin-Konzentrationen ausgewertet (n = 112).	59
19: Tabelle III.2.10: Korrelationsanalyse mittels des Spearman-Tests zwischen Progranulin im Liquor und numerischen Variablen.	62
20: Tabelle III.2.11: Korrelationsanalyse mittels des ANOVA-Tests zwischen Progranulin im Liquor und klassifizierten Parametern.	63
21: Tabelle III.2.12: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Resistin im Serum innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“.	64
22: Tabelle III.2.13: Subgruppenanalyse mittels des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich Progranulin im Serum innerhalb des klassifizierten Parameters „Neurologische Diagnosen“	65
23: Tabelle IV.2.1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Zellkulturversuche für Resistin.....	91
24: Tabelle IV.3.1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Zellkulturversuche für Progranulin. (* Versuch mit Präadipozyten)	95

VI.4 Literaturverzeichnis

1. Al Maskari MY, Alnaqdy AA (2006) Correlation between Serum Leptin Levels, Body Mass Index and Obesity in Omanis. Sultan Qaboos University medical journal 6:27–31
2. Al-Daghri N, Chetty R, McTernan PG et al. (2005) Serum resistin is associated with C-reactive protein & LDL cholesterol in type 2 diabetes and coronary artery disease in a Saudi population. Cardiovascular diabetology 4:10. doi: 10.1186/1475-2840-4-10
3. Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A (2013) The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. Frontiers in neuroscience 7:51. doi: 10.3389/fnins.2013.00051
4. Amonlirdviman K, Khare NA, Tree DRP, Chen W-S, Axelrod JD, Tomlin CJ (2005) Mathematical modeling of planar cell polarity to understand domineering nonautonomy. Science (New York, N.Y.) 307:423–426. doi: 10.1126/science.1105471
5. Anders H. Berg, Terry P. Combs and Philipp E. Scherer, Berg AH, Combs TP, Scherer PE (2002) ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. TRENDS in Endocrinology & Metabolism 13:84–89. doi: 10.1016/S1043-2760(01)00524-0
6. Aquilante CL, Kosmiski LA, Knutsen SD, Zineh I (2008) Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults. Metabolism: clinical and experimental 57:494–501. doi: 10.1016/j.metabol.2007.11.010
7. Arner P (2005) Resistin. Yet another adipokine tells us that men are not mice. Diabetologia 48:2203–2205. doi: 10.1007/s00125-005-1956-3
8. Arnoldussen IAC, Kiliaan AJ, Gustafson DR (2014) Obesity and dementia. Adipokines interact with the brain. European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology 24:1982–1999. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.03.002
9. Asgary S, SamsamShariat SZ, Ghorbani A, Keshvari M, Sahebkar A, Sarrafzadegan N (2015) Relationship between serum resistin concentrations with metabolic syndrome and its components in an Iranian population. Diabetes & metabolic syndrome 9:266–270. doi: 10.1016/j.dsx.2014.09.007
10. Azab SF, Abdalhady MA, Almalky MAA et al. (2016) Serum and CSF adiponectin, leptin, and interleukin 6 levels as adipocytokines in Egyptian children with febrile

- seizures. A cross-sectional study. *Italian journal of pediatrics* 42:38. doi: 10.1186/s13052-016-0250-y
11. Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins. GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131–2157. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054
 12. Bajnok L, Seres I, Varga Z et al. (2008) Relationship of serum resistin level to traits of metabolic syndrome and serum paraoxonase 1 activity in a population with a broad range of body mass index. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 116:592–599. doi: 10.1055/s-2008-1065350
 13. Baldo A, Sniderman AD, St-Luce S et al. (1993) The adipsin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *The Journal of clinical investigation* 92:1543–1547. doi: 10.1172/JCI116733
 14. Ball AK, Sinclair AJ, Curnow SJ et al. (2009) Elevated cerebrospinal fluid (CSF) leptin in idiopathic intracranial hypertension (IIH). Evidence for hypothalamic leptin resistance? *Clinical endocrinology* 70:863–869. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03401.x
 15. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, et al, Banerjee RR, Rangwala SM et al. (2004) Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303:1195–1198. doi: 10.1126/science.1092341
 16. Banks WA (2006) Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 14 Suppl 5:234S-237S. doi: 10.1038/oby.2006.315
 17. Benomar Y, Gertler A, Lacy P de et al. (2013) Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* 62:102–114. doi: 10.2337/db12-0237
 18. Berghoff M, Hochberg A, Schmid A et al. (2016) Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. *European journal of clinical investigation* 46:15–26. doi: 10.1111/eci.12558
 19. Bjersing JL, Erlandsson M, Bokarewa MI, Mannerkorpi K (2013) Exercise and obesity in fibromyalgia: beneficial roles of IGF-1 and resistin? *Arthritis research & therapy* 15:R34. doi: 10.1186/ar4187
 20. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A (2005) Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *The Journal of Immunology* 174:5789–5795. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5789
 21. Bokarewa MI, Erlandsson MC, Bjersing J, Dehlin M, Mannerkorpi K (2014) Smoking is associated with reduced leptin and neuropeptide Y levels and higher pain experience in patients with fibromyalgia. *Mediators of inflammation* 2014:627041. doi: 10.1155/2014/627041

22. Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A et al. (2000) Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 49:532–538. doi: 10.2337/diabetes.49.4.532
23. Boström EA, Svensson M, Andersson S et al. (2011) Resistin and insulin/insulin-like growth factor signaling in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 63:2894–2904. doi: 10.1002/art.30527
24. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD et al. (2005) The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis* 182:241–248. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.02.014
25. Cencello R, Tordjman J, Poitou C et al. (2006) Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55:1554–1561. doi: 10.2337/db06-0133
26. Carrasquillo MM, Nicholson AM, Finch N et al. (2010) Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma. *American journal of human genetics* 87:890–897. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.11.002
27. Chen X, Chang J, Deng Q et al. (2013) Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:9202–9213. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5336-12.2013.
28. Chen-Plotkin AS, Xiao J, Geser F et al. (2010) Brain progranulin expression in GRN-associated frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica* 119:111–122. doi: 10.1007/s00401-009-0576-2
29. Cifani C, Durocher Y, Pathak A et al. (2009) Possible common central pathway for resistin and insulin in regulating food intake. *Acta physiologica (Oxford, England)* 196:395–400. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01949.x
30. Côté M, Mauriège P, Bergeron J et al. (2005) Adiponectinemia in visceral obesity. Impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:1434–1439. doi: 10.1210/jc.2004-1711
31. Cruts M, Theuns J, van Broeckhoven C (2012) Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation* 33:1340–1344. doi: 10.1002/humu.22117
32. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A (2000) Cellular localization of gene expression for progranulin. *The journal of histochemistry and cytochemistry* :

- official journal of the Histochemistry Society 48:999–1009. doi: 10.1177/002215540004800713
33. Daquinag AC, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, Kolonin MG (2011) An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell stem cell* 9:74–86. doi: 10.1016/j.stem.2011.05.017
 34. David B. Savage, Ciaran P. Sewter, Ellen S. Klenk, David G. Segal, Antonio Vidal-Puig, Robert V. Considine, and Stephen O’Rahilly, Savage DB, Sewter CP et al. (2001) Resistin / Fizz3 Expression in Relation to Obesity and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Action in Humans. *Diabetes* 50:2199–2202. doi: 10.2337/diabetes.50.10.2199
 35. Deng W, Li C, Zhang Y et al. (2015) Serum C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) levels are decreased in obesity and hypertension and are negatively correlated with parameters of insulin resistance. *Diabetology & metabolic syndrome* 7:33. doi: 10.1186/s13098-015-0029-0
 36. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273–2282. doi: 10.1210/en.2003-1336
 37. Farooqi I. Sadaf, Jebb Susan A., Langmack Gill et al. (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *The New England journal of medicine* 341:879–884. doi: 10.1056/NEJM199909163411204
 38. Fry M, Smith PM, Hoyda TD et al. (2006) Area postrema neurons are modulated by the adipocyte hormone adiponectin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:9695–9702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2014-06.2006
 39. Gass J, Lee WC, Cook C et al. (2012) Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Molecular Neurodegeneration* 2012 // 7:33. doi: 10.1186/1750-1326-7-33
 40. Ghidoni R, Stoppani E, Rossi G et al. (2012) Optimal plasma progranulin cutoff value for predicting null progranulin mutations in neurodegenerative diseases: a multicenter Italian study. *Neuro-degenerative diseases* 9:121–127. doi: 10.1159/000333132
 41. Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration (BMI Mediated Effects), Lu Y, Hajifathalian K, Ezzati M, Woodward M, Rimm EB, Danaei G. (2014) Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke. A pooled analysis of 97 prospective

- cohorts with 1.8 million participants. *The Lancet* 383:970–983. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61836-X
42. Gokhan S, Hotamisligil, Narinder S, Shargill, Bruce M, Spiegelman, Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B (1993) Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science* 259:87–91. doi: 10.1126/science.7678183
 43. Hanayui Okura, Shiuya Yamashita, Okura H, Yamashita S et al. (2010) HDL/Apolipoprotein A-I Binds to Macrophage-Derived Progranulin and Suppresses its Conversion into Proinflammatory Granulins. *Japan Atherosclerosis Society* 17:568–577. doi: 10.5551/jat.3921
 44. Haugen F, Jørgensen A, Drevon CA, Trayhurn P (2001) Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 507:105–108. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02968-4
 45. He Z, Bateman A (1999) Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer research* 59:3222–3229
 46. He Z, Bateman A (2003) Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 81:600–612. doi: 10.1007/s00109-003-0474-3
 47. He Z, Ong, Colin H P, Halper J, Bateman A (2003) Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature medicine* 9:225–229. doi: 10.1038/nm816
 48. Hofmann C, Chen N, Obermeier F et al. (2011) C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) is secreted by visceral adipose tissue and exerts antiinflammatory and antifibrotic effects in primary human colonic fibroblasts. *Inflammatory bowel diseases* 17:2462–2471. doi: 10.1002/ibd.21647
 49. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B et al. (2000) FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *The EMBO Journal* 19:4046–4055. doi: 10.1093/emboj/19.15.4046
 50. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM (1994) Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:4854–4858. doi: 10.1073/pnas.91.11.4854
 51. Hu F, Padukkavidana T, Vægter CB et al. (2010) Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 68:654–667. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.034
 52. Isozumi K (2004) Obesity as a risk factor for cerebrovascular disease. *The Keio journal of medicine* 53:7–11. doi: 10.2302/kjm.53.7

53. Jiang S, Park DW, Tadie J-M et al. (2014) Human resistin promotes neutrophil proinflammatory activation and neutrophil extracellular trap formation and increases severity of acute lung injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192:4795–4803. doi: 10.4049/jimmunol.1302764
54. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389:374–377. doi: 10.1038/38717
55. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Kouroumalis EA (2007) The effect of infliximab on circulating levels of leptin, adiponectin and resistin in patients with inflammatory bowel disease. *European journal of gastroenterology & hepatology* 19:789–794. doi: 10.1097/MEG.0b013e3282202bca
56. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA (2006) Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 12:100–105. doi: 10.1097/01.MIB.0000200345.38837.46
57. Karrasch T, Leszczak S, Bala M et al. (2014) Short-term regulation of Visfatin release in vivo by oral lipid ingestion and in vitro by fatty acid stimulation. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 122:126–134. doi: 10.1055/s-0033-1363262
58. Kawase R, Ohama T, Matsuyama A et al. (2013) Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovascular research* 100:125–133. doi: 10.1093/cvr/cvt178
59. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:2548–2556. doi: 10.1210/jc.2004-0395
60. Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M et al. (2008) Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *The Journal of clinical investigation* 118:2438–2447. doi: 10.1172/JCI34694.
61. Kim H-K, Shin M-S, Youn B-S et al. (2011) Involvement of progranulin in hypothalamic glucose sensing and feeding regulation. *Endocrinology* 152:4672–4682. doi: 10.1210/en.2011-1221
62. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS (2001) A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* 276:11252–11256. doi: 10.1074/jbc.C100028200
63. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A et al. (2010) Insulin-sensitive obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299:E506-15. doi: 10.1152/ajpendo.00586.2009.

64. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W (2005) Adipocytokines. Leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism 19:525–546. doi: 10.1016/j.beem.2005.07.008
65. Kojima Y, Ono K, Inoue K et al. (2009) Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque. Atherosclerosis 206:102–108. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.017
66. Kopp A, Bala M, Buechler C et al. (2010) C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. Endocrinology 151:5267–5278. doi: 10.1210/en.2010-0571
67. Kos K, Harte AL, da Silva, Nancy F et al. (2007) Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92:1129–1136. doi: 10.1210/jc.2006-1841
68. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B (2012) The role of adipokines in connective tissue diseases. European journal of nutrition 51:513–528. doi: 10.1007/s00394-012-0370-0
69. Kusminski CM, da Silva NF, Creely SJ et al. (2007) The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92:270–276. doi: 10.1210/jc.2006-1151
70. Kusminski CM, McTernan PG, Schraw T et al. (2007) Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid. Distinct complex distribution from serum. Diabetologia 50:634–642. doi: 10.1007/s00125-006-0577-9
71. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N et al. (2003) Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration. Cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88:4848–4856. doi: 10.1210/jc.2003-030519
72. Lee S, Lee H-C, Kwon Y-W et al. (2014) Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. Cell Metabolism 19:484–497. doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.013
73. Lee W-NP, Lim S, Bassilian S, Bergner EA, Edmond J (1998) Fatty Acid Cycling in Human Hepatoma Cells and the Effects of Troglitazone. J. Biol. Chem. 273:20929–20934. doi: 10.1074/jbc.273.33.20929

74. Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA (2004) An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS medicine* 1:e45. doi: 10.1371/journal.pmed.0010045
75. Li J, Yu X, Pan W, Unger RH (2002) Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 282:E1334-41. doi: 10.1152/ajpendo.00516.2001.
76. Li X, Jiang L, Yang M, Wu Y-w, Sun J-z, Sun S-x (2014) CTRP3 improves the insulin sensitivity of 3T3-L1 adipocytes by inhibiting inflammation and ameliorating insulin signalling transduction. *Endokrynologia Polska* 65:252–258. doi: 10.5603/EP.2014.0034
77. Li X, Jiang L, Yang M, Wu Y-w, Sun S-x, Sun J-z (2014) CTRP3 modulates the expression and secretion of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine journal* 61:1153–1162. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0161
78. Lo JC, Ljubicic S, Leibiger B et al. (2014) Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes. *Cell* 158:41–53. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.005
79. Malaspina A, Kaushik N, Bellerocche J de (2001) Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem* 77:132–145. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00231.x
80. Mandviwala T, Khalid U, Deswal A (2016) Obesity and Cardiovascular Disease. A Risk Factor or a Risk Marker? *Current atherosclerosis reports* 18:21. doi: 10.1007/s11883-016-0575-4
81. Martínez HR, Escamilla-Ocañas CE, Camara-Lemarrooy CR, González-Garza MT, Tenorio-Pedraza JM, Hernández-Torre M (2017) CSF concentrations of adipsin and adiponectin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neurologica Belgica* 117:879–883. doi: 10.1007/s13760-017-0798-3
82. Matsubara T, Mita A, Minami K et al. (2012) PGRN is a Key Adipokine Mediating High Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity through IL-6 in Adipose Tissue. *Cell Metabolism* 15:38–50. doi: 10.1016/j.cmet.2011.12.002
83. McTernan PG, Fisher FM, Valsamakis G et al. (2003) Resistin and type 2 diabetes. Regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:6098–6106. doi: 10.1210/jc.2003-030898
84. McTernan PG, Kusminski CM, Kumar S (2006) Resistin. *Current opinion in lipidology* 17:170–175. doi: 10.1097/01.mol.0000217899.59820.9a

85. Meier U, Gressner AM (2004) Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clinical chemistry* 50:1511–1525. doi: 10.1373/clinchem.2004.032482
86. Mendall MA, Gunasekera AV, John BJ, Kumar D (2011) Is obesity a risk factor for Crohn's disease? *Digestive diseases and sciences* 56:837–844. doi: 10.1007/s10620-010-1541-6
87. Moon B, Kwan JJ-M, Duddy N, Sweeney G, Begum N (2003) Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285:E106-15. doi: 10.1152/ajpendo.00457.2002.
88. Morash BA, Wilkinson D, Ur E, Wilkinson M (2002) Resistin expression and regulation in mouse pituitary. *FEBS Letters* 526:26–30. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03108-3
89. Muse ED, Lam, Tony K T, Scherer PE, Rossetti L (2007) Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 117:1670–1678. doi: 10.1172/JCI30440.
90. Muse ED, Obici S, Bhanot S et al. (2004) Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 114:232–239. doi: 10.1172/JCI200421270
91. Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U (2006) Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PloS one* 1:e31. doi: 10.1371/journal.pone.0000031
92. Nakata M, Okada T, Ozawa K, Yada T (2007) Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochemical and biophysical research communications* 353:1046–1051. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.134
93. Neill T, Buraschi S, Goyal A et al. (2016) EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin. *The Journal of cell biology* 215:687–703. doi: 10.1083/jcb.201603079
94. Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U (2011) Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis and rheumatism* 63:1159–1169. doi: 10.1002/art.30291
95. Neumeier M, Weigert J, Buettner R et al. (2007) Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293:E965-9. doi: 10.1152/ajpendo.00119.2007
96. Nguyen AD, Nguyen TA, Martens LH, Mitic LL, Farese RV (2013) Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24:597–606. doi: 10.1016/j.tem.2013.08.003.

97. Nicholson AM, Finch NA, Thomas CS et al. (2014) Progranulin protein levels are differently regulated in plasma and CSF. *Neurology* 82:1871–1878. doi: 10.1212/WNL.0000000000000445
98. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL (2007) Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *European journal of endocrinology* 156:279–284. doi: 10.1530/eje.1.02338
99. Novgorodtseva TP, Karaman YK, Zhukova NV, Lobanova EG, Antonyuk MV, Kantur TA (2011) Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome. *Lipids in health and disease* 10:82. doi: 10.1186/1476-511X-10-82
100. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y et al. (2017) IDF Diabetes Atlas. Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice* 128:40–50. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024
101. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* 11:85–97. doi: 10.1038/nri2921
102. Pagano C, Soardo G, Pilon C et al. (2006) Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:1081–1086. doi: 10.1210/jc.2005-1056
103. Palmio J, Vuolteenaho K, Lehtimäki K, Nieminen R, Peltola J, Moilanen E (2016) CSF and plasma adipokines after tonic-clonic seizures. *Seizure* 39:10–12. doi: 10.1016/j.seizure.2016.04.010
104. Pan W, Kastin AJ (2007) Adipokines and the blood-brain barrier. *Peptides* 28:1317–1330. doi: 10.1016/j.peptides.2007.04.023
105. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohoou C, Stefanadis C (2005) The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation. The ATTICA study. *Atherosclerosis* 183:308–315. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.010
106. Paresh Dandona, Ahmad Aljada and Arindam Bandyopadhyay (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology* 25. doi: 10.1016/j.it.2003.10.014
107. Parimisetty A, Dorsemans A-C, Awada R, Ravanan P, Diotel N, Lefebvre d'Hellencourt C (2016) Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *Journal of neuroinflammation* 13:67. doi: 10.1186/s12974-016-0530-x
108. Park S, Hong SM, Sung SR, Jung HK (2008) Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by

- the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* 149:445–454. doi: 10.1210/en.2007-0754
109. Piguet O, Petersén A, Yin Ka Lam, Bonnie et al. (2011) Eating and hypothalamus changes in behavioral-variant frontotemporal dementia. *Annals of neurology* 69:312–319. doi: 10.1002/ana.22244
110. Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R et al. (2002) An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:4403–4406. doi: 10.1210/jc.2002-020096
111. Plowman GD, Green JM, Neubauer MG et al. (1992) The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *The Journal of biological chemistry* 267:13073–13078
112. Qi Y, Jia K, Zhang D-Q et al. (2016) Increased resistin levels in the serum and cerebrospinal fluid of patients with neuromyelitis optica. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 456:176–179. doi: 10.1016/j.cca.2016.03.011
113. Qu H, Deng H, Hu Z (2013) Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance. *Mediators of inflammation* 2013:360190. doi: 10.1155/2013/360190
114. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2003) Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule- β selectively impair insulin action on glucose production. *J. Clin. Invest.* 111:225–230. doi: 10.1172/JCI200316521
115. Rajala MW, Qi Y, Patel HR et al. (2004) Regulation of Resistin Expression and Circulating Levels in Obesity, Diabetes, and Fasting. *Diabetes* 53:1671–1679. doi: 10.2337/diabetes.53.7.1671
116. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ (2005) Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111:932–939. doi: 10.1161/01.CIR.0000155620.10387.43
117. Robert Koch-Institut Gesundheit in Deutschland Berlin, November 2015. doi: 10.25646/3173
118. Roberta Ghidoni, Anna Paterlini, Luisa Benussi, Ghidoni R, Paterlini A, Benussi L (2012) Circulating progranulin as a biomarker for neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis* 1:180–190
119. Ryan CL, Baranowski DC, Chitramuthu BP et al. (2009) Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival. *BMC neuroscience* 10:130. doi: 10.1186/1471-2202-10-130

120. Sánchez-Solana B, Laborda J, Baladrón V (2012) Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 26:110–127. doi: 10.1210/me.2011-1027
121. Sartipy P, Loskutoff DJ (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7265–7270. doi: 10.1073/pnas.1133870100
122. Satoh H, Nguyen MA, Miles PDG, Imamura T, Usui I, Olefsky JM (2004) Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J. Clin. Invest.* 114:224–231. doi: 10.1172/JCI200420785
123. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet* 344. doi: 10.1016/S0140-6736(94)90566-5
124. Schäffler A, Büchler C, Müller-Ladner U et al. (2004) Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research* 36:702–707. doi: 10.1055/s-2004-826015
125. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746–26749. doi: 10.1074/jbc.270.45.26746
126. Schleinitz D (2015) Genetic Determination of Serum Levels of Diabetes-Associated Adipokines. *The review of diabetic studies : RDS* 12:277–298. doi: 10.1900/RDS.2015.12.277
127. Schmid A, Berghoff M, Hochberg A, Schäffler A, Karrasch T (2017) CTRP-3 is permeable to the blood-brain barrier and is not regulated by glucose or lipids in vivo. *European journal of clinical investigation* 47:203–212. doi: 10.1111/eci.12709
128. Schmid A, Hochberg A, Berghoff M et al. (2016) Quantification and regulation of adipsin in human cerebrospinal fluid (CSF). *Clinical endocrinology* 84:194–202. doi: 10.1111/cen.12856
129. Schmid A, Kopp A, Hanses F, Karrasch T, Schäffler A (2014) C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation and adipose tissue Erk-1/-2 phosphorylation in mice in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 452:8–13. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.054
130. Schmid A, Leszczak S, Ober I, Schäffler A, Karrasch T (2015) Serum progranulin concentrations are not responsive during oral lipid tolerance test and oral glucose

- tolerance test. *Hormone and metabolic research* 47:571–576. doi: 10.1055/s-0034-1395679
131. Schofield EC, Halliday GM, Kwok J, Loy C, Double KL, Hodges JR (2010) Low serum progranulin predicts the presence of mutations: a prospective study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 22:981–984. doi: 10.3233/JAD-2010-101032
 132. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A (2015) Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Seminars in cell & developmental biology* 38:2–6. doi: 10.1016/j.semcd.2015.01.002
 133. Shojima N, Sakoda H, Ogihara T et al. (2002) Humoral Regulation of Resistin Expression in 3T3-L1 and Mouse Adipose Cells. *Diabetes* 51:1737–1744. doi: 10.2337/diabetes.51.6.1737
 134. Stein PD, Beemath A, Olson RE (2005) Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. *The American journal of medicine* 118:978–980. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.03.012
 135. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S et al. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307–312. doi: 10.1038/35053000
 136. Stojavljević S, Gomerčić Palčić M, Virović Jukić L, Smirčić Duvnjak L, Duvnjak M (2014) Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* 20:18070–18091. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18070
 137. Tang W, Lu Y, Tian Q-Y et al. (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science (New York, N.Y.)* 332:478–484. doi: 10.1126/science.1199214.
 138. Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI (2010) Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *Journal of cellular and molecular medicine* 14:1419–1431. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00899.x
 139. Tilg H, Moschen AR (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology* 6:772–783. doi: 10.1038/nri1937
 140. Todoric J, Handisurya A, Perkmann T et al. (2012) Circulating progranulin levels in women with gestational diabetes mellitus and healthy controls during and after pregnancy. *European journal of endocrinology* 167:561–567. doi: 10.1530/EJE-12-0060
 141. Toledo K, Aranda M, Asenjo S, Sáez K, Bustos P (2014) Unsaturated fatty acids and insulin resistance in childhood obesity. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 27:503–510. doi: 10.1515/jpem-2013-0281

142. Tovar S, Nogueiras R, Tung LYC et al. (2005) Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *European journal of endocrinology* 153:R1-5. doi: 10.1530/eje.1.01999
143. Trayhurn P, Wood IS (2004) Adipokines. Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *BJN* 92:347. doi: 10.1079/BJN20041213
144. Unger RH (2000) Leptin physiology. A second look. *Regulatory peptides* 92:87–95. doi: 10.1016/S0167-0115(00)00154-3
145. Utzschneider KM, Carr DB, Tong J et al. (2005) Resistin is not associated with insulin sensitivity or the metabolic syndrome in humans. *Diabetologia* 48:2330–2333. doi: 10.1007/s00125-005-1932-y
146. van Damme P, van Hoecke A, Lambrechts D et al. (2008) Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *The Journal of cell biology* 181:37–41. doi: 10.1083/jcb.200712039
147. van der Zee, Julie, Le Ber I, Maurer-Stroh S et al. (2007) Mutations other than null mutations producing a pathogenic loss of progranulin in frontotemporal dementia. *Human mutation* 28:416. doi: 10.1002/humu.9484
148. Vanni E, Bugianesi E (2014) Obesity and liver cancer. *Clinics in liver disease* 18:191–203. doi: 10.1016/j.cld.2013.09.001
149. Vázquez MJ, González CR, Varela L et al. (2008) Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* 149:4534–4543. doi: 10.1210/en.2007-1708
150. Vercellino M, Grifoni S, Romagnolo A et al. (2011) Progranulin expression in brain tissue and cerebrospinal fluid levels in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 17:1194–1201. doi: 10.1177/1352458511406164
151. Verma S, Li S-H, Wang C-H et al. (2003) Resistin promotes endothelial cell activation. Further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108:736–740. doi: 10.1161/01.CIR.0000084503.91330.49
152. Vozarova de Courten B, Degawa-Yamauchi M, Considine RV, Tataranni PA (2004) High Serum Resistin Is Associated With an Increase in Adiposity But Not a Worsening of Insulin Resistance in Pima Indians. *Diabetes* 53:1279–1284. doi: 10.2337/diabetes.53.5.1279
153. Waki H, Tontonoz P (2007) Endocrine functions of adipose tissue. *Annual review of pathology* 2:31–56. doi: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091859
154. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112:1796–1808. doi: 10.1172/JCI200319246

155. Wellen KE (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 115:1111–1119. doi: 10.1172/JCI200525102
156. White RT, Damm D, Hancock N et al. (1992) Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 267:9210–9213
157. Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B, Ur E (2005) Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* 81:19–30. doi: 10.1159/000084871
158. Xu H, Barnes GT, Yang Q et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112:1821–1830. doi: 10.1172/JCI200319451
159. Xu S-Q, Tang D, Chamberlain S et al. (1998) The Granulin/Epithelin Precursor Abrogates the Requirement for the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor for Growth in Vitro. *J. Biol. Chem.* 273:20078–20083. doi: 10.1074/jbc.273.32.20078
160. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Blüher S, Matalas A-L, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS (2003) Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:1730–1736. doi: 10.1210/jc.2002-021604
161. Yau SY, Li A, Hoo RLC et al. (2014) Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:15810–15815. doi: 10.1073/pnas.1415219111
162. Yin F, Banerjee R, Thomas B et al. (2010) Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 207:117–128. doi: 10.1084/jem.20091568
163. Yoo HJ, Hwang SY, Hong HC et al. (2013) Implication of progranulin and C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) on inflammation and atherosclerosis in subjects with or without metabolic syndrome. *PloS one* 8:e55744. doi: 10.1371/journal.pone.0055744
164. Youn B-S, Bang S-I, Klöting N et al. (2009) Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* 58:627–636. doi: 10.2337/db08-1147.
165. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V (2000) Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease. Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:109–214. doi: 10.1016/S0021-9150(99)00463-3

166. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432. doi: 10.1038/372425a0
167. Zhu J, Nathan C, Jin W et al. (2002) Conversion of Proepithelin to Epithelins: Roles of SLPI and Elastase in Host Defense and Wound Repair. *Cell* 111:867–878. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01141-8
168. Zlokovic BV (2000) Differential Regulation of Leptin Transport by the Choroid Plexus and Blood-Brain Barrier and High Affinity Transport Systems for Entry into Hypothalamus and Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Endocrinology* 141:1434–1441. doi: 10.1210/en.141.4.1434

VI.5 Persönliches Publikationsverzeichnis

1. Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. Berghoff M, **Hochberg A**, Schmid A et al. (2016) **European journal of clinical investigation 46:15–26**. [18]
2. Quantification and regulation of adiponin in human cerebrospinal fluid (CSF). Schmid A, **Hochberg A**, Berghoff M et al. (2016) **Clinical endocrinology 84:194–202**. [128]
3. CTRP-3 is permeable to the blood-brain barrier and is not regulated by glucose or lipids in vivo. Schmid A, Berghoff M, **Hochberg A**, Schäffler A, Karrasch T (2017) **European journal of clinical investigation 47:203–212**. [127]
4. Concentrations and regulation of adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. **Alexandra Hochberg**, Martin Berghoff, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Thomas Karrasch, Manfred Kaps, Andreas Schäffler DGE in Lübeck (2015), **Postervorstellung**
5. Regulation of the adipokines resistin and progranulin in 3T3-L1 adipocytes. **Alexandra Hochberg**, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Thomas Karrasch, Andreas Schäffler Endokrinologie DACH-Tagung in München (2016), **Postervorstellung** **Ausgezeichnet als „Best of 100 Abstracts“**

VII. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Unterschrift

Ort, Datum

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Professor Dr. med. Schäffler für die hervorragende und kontinuierliche Betreuung, die Initiative zu diesem Thema, die Bereitstellung der Materialien, sowie für die Möglichkeit der Kongressteilnahme bedanken.

Herrn PD Dr. med. Karrasch danke ich vor allem für die fachliche Unterstützung und die konstruktiven Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. Berghoff für die Unterstützung bei der Klassifizierung der Liquorparameter und die Bereitstellung der humanen Proben, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. rer. nat. Schmid für die sehr gute Betreuung im Labor und die zahlreichen Anregungen zur Erstellung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Kathrin Harges für die geduldige Einarbeitung in die Methodik und der gesamten Arbeitsgruppe für die nicht nur kollegiale, sondern auch freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch möchte ich mich bei dem Fachbereich 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Gewährung des Prägraduierten-Stipendiums und die damit verbundene Möglichkeit der Teilnahme an Seminaren sowie die finanzielle Unterstützung bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die Ermutigungen und für das rege Interesse an dieser Arbeit, allen voran meinem Vater Ulrich Hochberg, meinem Bruder Martin Hochberg, meiner Großmutter Charlotte Hochberg und meinem Partner Robin Höpfinger, danken.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

X. Ethikvotum

Alle erfolgten Analysen waren durch ein vorhandenes positives Ethikvotum der JLU - FB Medizin (AZ:278/13) abgedeckt.

XI. Publikationen

Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid

Martin Berghoff*, Alexandra Hochberg†, Andreas Schmid†, Jutta Schlegel†, Thomas Karrasch†, Manfred Kaps* and Andreas Schäffler†

*Department of Neurology, Giessen University Hospital, Giessen, Germany, †Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, Giessen, Germany

ABSTRACT

Background Adipokines bearing the potential to cross the blood–brain barrier (BBB) are promising candidates for the endocrine regulation of central nervous processes and of a postulated fat-brain axis. Resistin and progranulin concentrations in paired serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples of patients undergoing neurological evaluation and spinal puncture were investigated.

Materials and Methods Samples of $n = 270$ consecutive patients with various neurological diseases were collected without prior selection. Adipokine serum and CSF concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and serum and CSF routine parameters by standard procedures. Anthropometric data, medication and patient history were available.

Results Serum levels of resistin and progranulin were positively correlated among each other, with respective CSF levels, low-density lipoprotein cholesterol levels and markers of systemic inflammation. CSF resistin concentrations were generally low. Progranulin CSF concentrations and CSF/serum progranulin ratio were significantly higher in patients with infectious diseases, with disturbed BBB function and with elevated CSF cell count and presence of oligoclonal bands. Both adipokines are able to cross the BBB depending on a differing patency that increases with increasing grade of barrier dysfunction. Whereas resistin represents a systemic marker of inflammation, CSF progranulin levels strongly depend on the underlying disease and dysfunction of blood–CSF barrier.

Conclusions Resistin and progranulin represent novel and putative regulators of the fat-brain axis by their ability to cross the BBB under physiological and pathophysiological conditions. The presented data provide insight into the characteristics of BBB function regarding progranulin and resistin and the basis for future establishment of normal values for CSF concentrations and CSF/serum ratios.

Keywords Adipokines, cerebrospinal fluid, inflammation, progranulin, resistin.

Eur J Clin Invest 2016; 46 (1): 15–26

Introduction

The concentration of adipokines [1,2] in cerebrospinal fluid (CSF) is controlled by the blood–brain barrier (BBB) function. The individual concentration of these endocrine and adipose-specific molecules such as leptin [2,3], adiponectin or adipisin [4] differs significantly between plasma/serum and CSF and plays an important role under physiological and pathophysiological conditions. The regulation of satiety/appetite or the maintenance of the homeostasis of insulin signalling [2,3,5] by adipokines is prominent examples. Whereas some mediators such as NPY (neuropeptide Y) argue for the existence of a so-called *brain-fat axis* [6], adipokines such as leptin, adiponectin, adipisin and resistin provide the molecular basis of a *fat-brain axis* [2–4,7].

The proinflammatory and insulin-desensitizing adipokine resistin [8] is secreted by adipocytes and monocytes and plays a major and pleiotropic role in the regulation of carbohydrate metabolism, insulin sensitivity as well as systemic and adipose tissue-related inflammation. Progranulin [9] represents a TNF- α - and dexamethasone-inducible adipokine and an immunomodulating neurotrophic factor expressed in brain macrophages/microglia [10]. Progranulin is a cysteine-rich growth factor and secreted glycoprotein involved in tumorigenesis, wound repair, development, inflammation and neurodegeneration [11]. Progranulin is increased in peripheral blood and in adipose tissue of obese mice, and progranulin knockout mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance and obesity [9] due to a block of adipose tissue derived IL-6 synthesis and secretion. Based on this, progranulin and resistin

have been discussed as adipokines playing a role in obesity, insulin resistance [12,13], obesity-related inflammation [14] and atherosclerosis [15].

However, systematic data on human CSF concentrations of resistin and progranulin are sparse. CSF resistin was measured in animals such as dairy cows [16] and in very few and selected cohorts of patients with fibromyalgia [17,18], idiopathic intracranial hypertension [19] or in patients undergoing elective surgery under spinal anaesthesia [20]. Exact data on resistin concentrations in human CSF in relation to the respective serum levels are sparse and give an estimate of 100-fold less levels in CSF [20].

CSF progranulin levels could be detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 345 subjects of the *Mayo Clinic Study of Aging* and in this study, only 18% of the CSF variability could be explained by factors such as age, gender or progranulin genotypes [21]. However, in patients with frontotemporal lobar degeneration, plasma and CSF progranulin levels were shown to be dependent on certain progranulin gene mutations [22]. Some adipokines such as adiponectin and adipisin have been discussed to play a putative role multiple sclerosis due to higher CSF levels when compared to healthy controls [4]. Interestingly, CSF progranulin concentrations were reported to be higher in patients suffering from multiple sclerosis than in noninflammatory controls [10]. However, another study could not verify this observation [23].

It was the aim of this study

- To collect paired serum and CSF samples from an in detail characterized cohort of patients ($n = 270$) undergoing neurological evaluation and spinal puncture in a single and tertiary care centre.
- To quantify resistin and progranulin concentrations in serum and CSF by ELISA to describe the CSF/serum kinetics of these adipokines systematically.
- To characterize possible correlations of serum/CSF resistin and progranulin levels with anthropometric parameters, routine laboratory parameters and subgroups of neurological and internal medicine diseases.
- To gain insight in the regulation of BBB function with respect to the penetration of resistin and progranulin by providing novel, specific CSF/serum ratios and to correlate them with standard and routine parameters of the BBB function.

Material and methods

Study population

Paired serum and CSF samples were collected without prior selection from patients undergoing elective as well as emergency neurological evaluation at the Department of Neurology, University Hospital Giessen, Germany. Serum was prepared

from peripheral whole blood by centrifugation (4 °C, 10 min., 3756 g), and CSF samples were drawn under sterile conditions by cerebrospinal puncture. Samples were immediately stored at -20 °C. All patients included were informed about the aim of the study and gave informed consent. The study was approved by the local ethical committee (registration note AZ 287/13). The exclusion criteria were pregnancy and age < 18 years. Anthropometric and patient-related data such as age, gender, body mass index (BMI according to WHO), underlying diseases and medication were recorded. Comorbidity, especially the occurrence of type 1 or type 2 diabetes mellitus, dyslipidaemia, coronary artery disease and thyroid diseases, was documented. Smoking habits and medication, especially the use of levothyroxine, statins and hormonal contraceptives were also recorded. The final diagnosis was defined by a board-certified neurologist, and patients were divided into the following subgroups for further evaluation: 1 infectious diseases of the central nervous system (CNS), 2 multiple sclerosis, 3 vascular diseases (brain and spinal infarction), 4 epilepsy, 5 headache/facial pain, 6 neuropathy/cranial nerve palsy and 7 others (consisting of dementia, psychiatric disorders, normal pressure hydrocephalus (NPH) and patients undergoing spinal puncture for exclusion of other diseases). Concerning their CSF/serum albumin ratio, patients were divided into four subgroups: *grade 0*: ratio < 6.5×10^{-3} for age < 40 years and < 8.0×10^{-3} for age < 60 years; *grade 1*: < 10.0×10^{-3} ; *grade 2*: < 20.0×10^{-3} ; *grade 3*: > 20.0×10^{-3} . Concerning their CSF cell count, patients were divided into two subgroups: 0–5 cells/ μ L and > 5 cells/ μ L.

Measurement of serum and CSF routine parameters

Red and white blood count, serum total protein, serum albumin, serum creatinine, C-reactive protein (CRP), serum glucose, AST, ALT, uric acid, total bilirubin, cholinesterases, glycosylated haemoglobin concentration (HbA1c) and lipidological parameters [triglycerides, cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol] were analysed by standard and routine methods at the Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Giessen University Hospital, Germany. Total cell count, total protein, albumin, glucose, lactate, ferritin, and immunoglobulins G, A and M were measured in CSF using standard procedures. CSF/serum ratios were calculated for albumin, total protein, resistin and progranulin and plotted using double-logarithmic scales as used in typical *Reiber* diagrams.

Measurement of serum and cerebrospinal fluid concentrations of resistin and progranulin

Serum and CSF levels of resistin and progranulin were measured by ELISA in duplicate using the DuoSet ELISA development systems (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). The

lower detection limit was 31.2 pg/mL for resistin and 62.5 pg/mL for progranulin.

Statistics

For calculation of mean values \pm standard deviation (\pm SD), correlation analysis and regression analysis, a statistical software package (SPSS 22.0, IBM, NY, USA) was used. Means were compared by the nonparametric Mann–Whitney *U*-test. Correlation analysis was performed using the Spearman rho test for linear variables and the Pearson test for classified variables. A *P*-value below 0.05 (two tailed) was considered as statistically significant.

Results

Characteristics of the study population

n = 270 individuals (110 males, 160 females) were included in the study. The mean age was 50.6 ± 17.5 years. Table 1 summarizes the detailed characteristics of the entire study population with respect to anthropometric and laboratory parameters in serum and CSF. Furthermore, the subgroups of patients with the final diagnosis are shown at a glance. Progranulin and resistin levels could successfully be measured in all 270 probands by ELISA in duplicate. Progranulin concentrations ranged between 10.0 and 142.4 ng/mL in serum and between 153.1 and 3668.5 pg/mL in CSF. Resistin concentrations in serum ranged between 2.1 and 74.8 ng/mL. In CSF, several resistin concentrations ranged below 31.2 pg/mL, which is below the linear part of the dilution curve of the ELISA. Therefore, subgroup analysis was necessary for resistin CSF concentrations in those patients (*n* = 112 of 270) who had concentrations higher than 31.2 pg/mL. In these 112 patients, resistin concentrations ranged between 31.2 and 783.3 pg/mL.

Table 2 summarizes in detail the statistical distribution of resistin and progranulin concentrations in serum and CSF. Serum resistin concentrations were significantly higher (*P* = 0.003) in female than in male patients (20.9 ± 11.8 vs. 17.4 ± 9.9 ng/mL), whereas BMI and age (data not shown) had no effect on resistin. CSF resistin levels as well as serum and CSF progranulin levels were not different between genders and not dependent on BMI or age.

Correlation of serum resistin and serum progranulin concentrations with numerical and classified variables in serum

Serum resistin (Table 3) was significantly and positively correlated with systemic markers of inflammation such as leucocytes, thrombocytes, CRP and serum IgG, A and M. Furthermore, serum resistin was significantly and positively correlated with LDL cholesterol, as depicted in Fig. 1a. In contrast, serum progranulin (Table 3) was only weakly associated with CRP. Simi-

lar to resistin, serum progranulin was significantly and positively correlated to LDL cholesterol (Fig. 1b). Importantly, the positive correlation of resistin (*P* = 0.002; *r* = 0.389; *n* = 63) and progranulin (*P* = 0.002; *r* = +0.34, *n* = 63) with LDL cholesterol remained significant even after correction by gender, age, BMI, CRP, leucocytes, haemoglobin and thrombocytes (partial correlation analysis, data not shown).

Correlation of serum resistin and serum progranulin concentrations with numerical and classified variables in cerebrospinal fluid

Concerning CSF parameters (Table 3), serum resistin was positively correlated with CSF-IgG, A and M, but not with total cell count, lactate, albumin, protein or ferritin. Serum progranulin concentrations were positively correlated with CSF-IgG but with none of the additional CSF parameters (Table 3).

Correlation of cerebrospinal fluid resistin and CSF progranulin concentrations with numerical and classified variables in CSF

Cerebrospinal fluid resistin (Table 3) levels correlated significantly with CSF protein, albumin, IgG and IgA. Moreover, CSF resistin concentrations were significantly associated with the occurrence of diabetes mellitus and levothyroxine replacement therapy. However, there was no significant correlation of CSF resistin with serum glucose, serum HbA1c, and the mean values of CSF resistin were not different in patients with or without diabetes mellitus as analysed by Mann–Whitney *U*-test (data not shown). CSF progranulin (Table 3) concentrations were highly significantly and positively correlated with CSF total cell count, protein, albumin, lactate, IgG, M, A, presence of oligoclonal bands and CSF albumin/serum albumin ratio. The strong correlation of CSF progranulin with immunoglobulin levels argues for an association between progranulin concentration and inflammatory processes.

Correlation and regression analysis of resistin and progranulin in serum and cerebrospinal fluid

Serum concentrations of resistin and progranulin are positively correlated among each other (*P* = 0.002; *r* = +0.186), as depicted in Fig. 1c. Similarly, CSF concentrations of resistin and progranulin (Fig. 1d) are positively correlated among each other (*P* < 0.001; *r* = +0.28).

Importantly, serum resistin positively correlated with CSF resistin (*P* = 0.004; *r* = +0.177) and serum progranulin positively correlated with CSF progranulin (*P* < 0.001; *r* = +0.37), as depicted in Fig. 2a,b. These correlations, although not very strong, might hint on an important role of BBB permeability for CSF levels of resistin and progranulin. The mean CSF/serum ratio for albumin was only available in *n* = 41 subjects and was $5.8 \pm 2.5 \times 10^{-3}$ (normal range: < 6.5 for age < 40 years and

Table 1 Characteristics of the study population ($n = 270$ individuals). Anthropometric and laboratory parameters in serum and CSF are shown. Mean values \pm standard deviation (SD) and range are given for linear variables. For classified variables, absolute numbers and percentages are shown

Study population ($n = 270$)	
Age (years)	50.6 \pm 17.5 [18–90]
Males, n (%)	110 (40.7)
Females, n (%)	160 (59.3)
Anthropometric parameters	
Mean BMI* (kg/m ²)	
BMI < 18.5 kg/m ² , n (%)	9 (3.3)
BMI 18.5–24.9 kg/m ² , n (%)	121 (44.8)
BMI 25.0–29.9 kg/m ² , n (%)	75 (27.8)
BMI 30.0–34.9 kg/m ² , n (%)	34 (12.6)
BMI 35.0–39.9 kg/m ² , n (%)	14 (5.2)
BMI \geq 40.0 kg/m ² , n (%)	2 (0.7)
BMI < 25.0 kg/m ² , n (%)	130 (48.1)
BMI \geq 25.0 kg/m ² , n (%)	133 (49.3)
Carbohydrate-metabolism	
Plasma glucose (mg/dL)	113 \pm 38 [64–289]
HbA1c (%)	6.0 \pm 0.9 [5.2–10.4]
Diabetes mellitus n (%)	31 (11.5)
Lipoprotein-metabolism	
Total cholesterol (mg/dL)	202 \pm 43 [105–333]
LDL cholesterol (mg/dL)	130 \pm 42 [40–232]
HDL cholesterol (mg/dL)	55 \pm 15 [22–93]
Triglycerides (mg/dL)	140 \pm 86 [29–605]
Inflammation/White blood count	
CRP (mg/L)	6.5 \pm 16.5 [0.5–149.0]
Leukocytes (giga/L)	7.7 \pm 2.7 [3.3–19.9]
Red blood count	
Platelets (giga/L)	260 \pm 79 [83–724]
Haemoglobin (g/L)	143 \pm 16 [96–198]
Serum parameters	
Total protein (g/L)	74 \pm 6 [55–98]
Total albumin (g/L)	41.9 \pm 4.8 [17.8–53.2]
Creatinine (mg/dL)	0.98 \pm 0.22 [0.40–2.30]
CSF parameters	
Cell count (μ L)	9 \pm 37 [0–352]

Table 1 *Continued*

Total protein (g/L)	0.520 \pm 0.281 [0.176–2.700]
Albumin (g/L)	0.277 \pm 0.158 [0.093–1.500]
Lactate (mM)	1.87 \pm 0.36 [1.25–3.47]
IgG (g/L)	0.0461 \pm 0.0545 [0.0118–0.4140]
Adipokines	
Resistin in serum [ng/mL] ($n = 270$)	19.5 \pm 11.2 [2.1–74.8]
Resistin in CSF [pg/mL] ($n = 112$)	82.5 \pm 9.9 [31.2–783.3] [†]
Progranulin in serum [ng/mL] ($n = 270$)	48.7 \pm 18.9 [10.0–142.4]
Progranulin in CSF [pg/mL] ($n = 270$)	740.3 \pm 408.5 [153.1–3668.5]
Neurological diseases/Clinical subgroups	
Infectious CNS disease n (%)	13 (4.8)
Multiple sclerosis n (%)	42 (15.6)
Vascular disease n (%)	22 (8.1)
Epilepsy n (%)	26 (9.6)
Headache/facial pain n (%)	26 (9.6)
Neuropathy/cranial nerve palsy n (%)	49 (18.1)
Others [‡] n (%)	92 (34.1)

BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; HbA1c, glycosylated haemoglobin A1c; IgG, immunoglobulin G; MS, multiple sclerosis; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid.

*BMI was not available in 2.6% of patients.

[†]In CSF, several resistin concentrations ranged below 31.2 pg/mL, which is the below the linear part of the dilution curve of the enzyme-linked immunosorbent assay. Therefore, subgroup analysis was necessary for those patients ($n = 112$ of 270) who had concentrations higher than 31.2 pg/mL. In these 112 patients, resistin concentrations ranged between 31.2 and 783.3 pg/mL.

[‡]Consisting of dementia [9], psychiatric disorders [12], normal pressure hydrocephalus [9], and patients undergoing spinal puncture for exclusion of other diseases (60).

< 8.5 for age > 40 years). Therefore, we additionally calculated the CSF/serum total protein ratio with a mean of $6.7 \pm 3.1 \times 10^{-3}$ in $n = 141$ individuals.

The mean CSF/serum ratio for resistin was $4.4 \pm 5.8 \times 10^{-3}$ in $n = 112$ subjects with measurable values above the lower detection limit ($n = 158$ individuals ranged below the lower detection limit). In contrast, the mean CSF/serum ratio for progranulin was much higher and calculated as $16.3 \pm 8.6 \times 10^{-3}$.

Similar to classical *Reibergrams*, we plotted the CSF/serum quotients for progranulin against those for albumin and total

Table 2 Distribution of serum and CSF concentrations of the adipokines resistin and progranulin. Serum concentrations of resistin (A) and progranulin (B) are shown in the upper panel. CSF concentrations of resistin (C) and progranulin (D) are shown in the lower panel

	Minimum	Maximum	Mean	SEM	SD	Variance
(A) Serum resistin [ng/mL]						
Total population (<i>n</i> = 270)	2.1	74.8	19.5	0.7	11.2	125.0
Gender						
M (<i>n</i> = 110)	2.1	74.8	17.4	0.9	9.9	97.5
F (<i>n</i> = 160)	6.5	71.3	20.9*	0.9	11.8	139.4
BMI						
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	7.2	67.0	19.5	0.9	10.8	115.5
≥ 25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	2.1	74.8	19.2	1.0	10.9	118.8
(B) Serum progranulin [ng/mL]						
Total population (<i>n</i> = 270)	10.0	142.4	48.7	1.2	18.9	357.2
Gender						
M (<i>n</i> = 110)	22.8	114.2	46.1	1.4	14.8	219.6
F (<i>n</i> = 160)	10.0	142.4	50.5	1.7	21.1	445.7
BMI						
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	10.0	110.3	47.8	1.5	17.1	291.8
≥ 25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	22.8	142.4	49.6	1.8	20.7	427.8
(C) CSF resistin [pg/mL]						
Subgroup (<i>n</i> = 112)	31.2	783.3	82.5	9.9	104.6	10931.1
Gender						
M (<i>n</i> = 44)	31.2	271.6	70.3	8.7	57.9	3349.8
F (<i>n</i> = 68)	31.2	783.3	90.4	15.2	125.7	15799.3
BMI						
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 50)	31.2	311.0	73.4	8.5	59.8	3577.3
≥ 25 kg/m ² (<i>n</i> = 58)	31.3	783.3	83.9	16.0	122.1	14898.3
(D) CSF progranulin [pg/mL]						
Total population (<i>n</i> = 270)	153.1	3668.5	740.3	24.9	408.5	166866.1
Gender						
M (<i>n</i> = 110)	153.1	3668.5	751.9	43.0	451.2	203543.4
F (<i>n</i> = 160)	329.2	2580.6	732.3	29.9	377.7	142615.9
BMI						
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	329.2	3668.5	750.8	38.2	435.3	189522.7
≥ 25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	153.1	3072.5	729.1	32.1	370.1	137001.0

BMI, body mass index; M, male; F, female; CSF, cerebrospinal fluid; SEM, standard error of the mean; SD, standard deviation.

**P* = 0.003 for males vs. females.

Table 3 Correlation analysis of serum and CSF resistin/progranulin concentrations with numerical and classified parameters in serum and CSF

Parameter	P	r
Correlation analysis of serum resistin concentrations		
S-Leucocytes	< 0.001**	+0.26
S-Thrombocytes	0.005*	+0.17
S-hemoglobin	0.001**	-0.20
S-CRP	0.001**	+0.19
S-LDL cholesterol	0.002*	+0.39
S-IgM	0.028*	+0.25
CSF-IgG	0.008*	+0.16
CSF-IgA	0.007*	+0.30
CSF-IgM	0.008*	+0.30
Correlation analysis of serum progranulin concentrations		
S-CRP	0.024*	+0.14
S-IgG	0.002*	+0.19
S-LDL cholesterol	0.002*	+0.38
S-protein	0.016*	+0.20
CSF-IgG	0.024*	+0.14
Correlation analysis of CSF resistin concentrations		
CSF protein	0.004*	+0.27
CSF albumin	0.001**	+0.30
CSF IgG	< 0.001*	+0.33
CSF IgA	0.015*	+0.41
CSF albumin/serum albumin ratio	0.1	+0.43
Presence of diabetes mellitus	< 0.001**	+0.39
Levothyroxine replacement	0.024*	+0.22
Correlation analysis of CSF progranulin concentrations		
CSF total cell count	< 0.001**	+0.3
CSF protein	< 0.001**	+0.45
CSF albumin	< 0.001**	+0.41
CSF lactate	0.039*	+0.13
CSF IgG	< 0.001**	+0.53

protein using a logarithmic scale. We detected a significant ($P = 0.006$) and positive ($r = +0.42$) correlation of the CSF/serum ratio for albumin with progranulin (Fig. 2c), however, only in 41 available subjects. Therefore, we calculated the CSF/serum quotient for total protein and found in $n = 141$ subjects a

Table 3 Continued

Parameter	P	r
CSF IgA	< 0.001**	+0.58
CSF IgM	< 0.001**	+0.61
Oligoclonal bands	0.001**	+0.21
CSF albumin/serum albumin ratio	0.005*	+0.43

CRP, C-reactive protein; CSF, cerebrospinal fluid; Ig, immunoglobulin; LDL, low-density lipoprotein; r , regression coefficient for numerical (Spearman rho test) or classified (Pearson test) parameters; S, serum.

* $P < 0.05$; ** $P \leq 0.001$.

highly significant ($P < 0.001$) and positive ($r = +0.44$) correlation of the CSF/serum quotient for total protein with progranulin (Fig. 2d).

Spearman correlation analysis showed positive correlations between the progranulin CSF/serum ratio with CSF total cell count ($P = 0.004$; $r = +0.13$), CSF total protein ($P < 0.001$; $r = +0.36$), CSF albumin ($P < 0.001$; $r = +0.34$), CSF-IgG ($P < 0.001$; $r = +0.33$), CSF IgA ($P < 0.001$; $r = +0.41$), CSF IgM ($P < 0.001$; $r = +0.5$), presence of oligoclonal bands ($P < 0.001$; $r = +0.21$), grade of CSF patency ($P = 0.003$; $r = +0.18$).

Subgroup analysis of serum and cerebrospinal fluid resistin and progranulin concentrations in different neurological disease groups

Serum and CSF resistin concentrations (Table 4A) were not significantly different between disease subgroups, and both parameters were not higher in patients suffering from infectious diseases or multiple sclerosis. Similarly, serum progranulin concentrations were similar in all subgroups.

In contrast, CSF progranulin concentrations were highest in patients suffering from infectious CNS diseases (1634.9 ± 704.0 pg/mL) and significantly ($P < 0.001$) different from all the remaining disease subgroups (Table 4A). Based on this observation, we calculated the mean value of the CSF/serum progranulin ratio as a novel marker ratio for each subgroup to perform Mann-Whitney U -tests (Table 4B). The CSF/serum progranulin ratio was highest in patients suffering from infectious CNS diseases and was significantly different from all the remaining disease subgroups (Table 4B).

Subgroup analysis of cerebrospinal fluid resistin and progranulin concentrations with respect to classical markers of blood-brain barrier dysfunction, CSF cell count, and oligoclonal bands

Mean values \pm SD of CSF progranulin and CSF resistin concentrations were measured in patients and related to varying degrees of BBB dysfunction/patency (Table 4C). Interestingly, there is a stepwise and highly significant increase of CSF

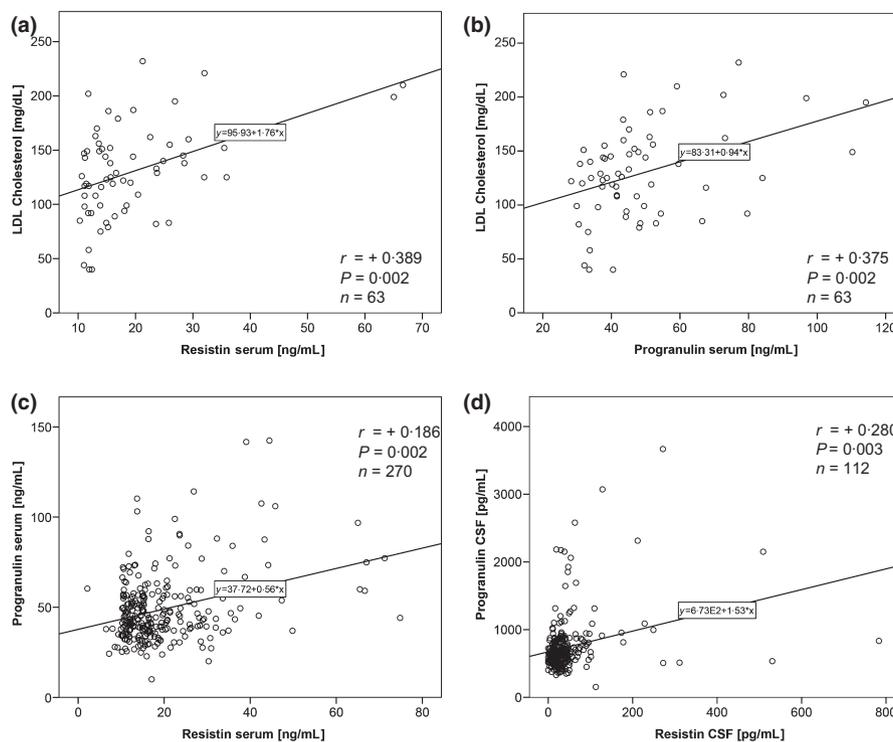


Figure 1 Regression analysis for serum and CSF resistin and progranulin concentrations. (a) Positive correlation of serum resistin concentrations with serum LDL cholesterol levels by regression analysis. (b) Positive correlation of serum progranulin concentrations with serum LDL cholesterol levels by regression analysis. (c) Positive correlation between serum and CSF resistin concentrations. (d) Positive correlation between serum and CSF progranulin concentrations. CSF, cerebrospinal fluid; LDL, low-density lipoprotein.

progranulin and CSF resistin mean values in patients with increasing grades of a disturbed blood–CSF barrier function. Moreover, patients were divided into two subgroups with respect to CSF total cell count ($0\text{--}5$ cells/ μL and > 5 cells/ μL) and subgroup analysis was performed for mean CSF progranulin and resistin concentrations (Table 4C). Importantly, the concentrations of CSF progranulin and resistin were significantly higher (more than twofold) in patients with a CSF cell count $> 5/\mu\text{L}$. When patients were divided into two subgroups with or without the presence of oligoclonal bands, both CSF progranulin concentrations as well as the logarithmic CSF/serum ratio for progranulin were significantly higher in patients positive for oligoclonal bands.

Discussion

The present study provides for the first time systematic data on the distribution and kinetics of resistin and progranulin CSF concentrations in relation to the respective serum concentrations in a large and neurologically well-characterized study population. These data may serve as a basis for the future development and establishment of normal ranges. Moreover,

specific CSF/serum ratios for resistin and progranulin are presented for a helpful interpretation of future studies in this field. In general, serum resistin levels are higher in females than in males and resistin can be regarded as a surrogate parameter of systemic inflammation. These observations have been repetitively reported in the literature [24–27]. In contrast, serum progranulin concentrations are only marginally correlated to systemic inflammation. Both adipokines are significantly and positively correlated to LDL cholesterol concentrations, even after correction for important anthropometric parameters and inflammation markers. Data describing a correlation between LDL cholesterol and progranulin are sparse, and there exists only one single and recent study that also reported on a positive correlation between serum progranulin and LDL cholesterol concentrations in younger and healthy individuals [28]. Regarding resistin, data from the literature are contradictory and dependent on the characteristics of the study population. Some studies reported on a negative correlation between LDL cholesterol and resistin in patients suffering from metabolic syndrome, obesity and type 2 diabetes [29,30] whereas others found no association [31]. Based on our study, resistin and

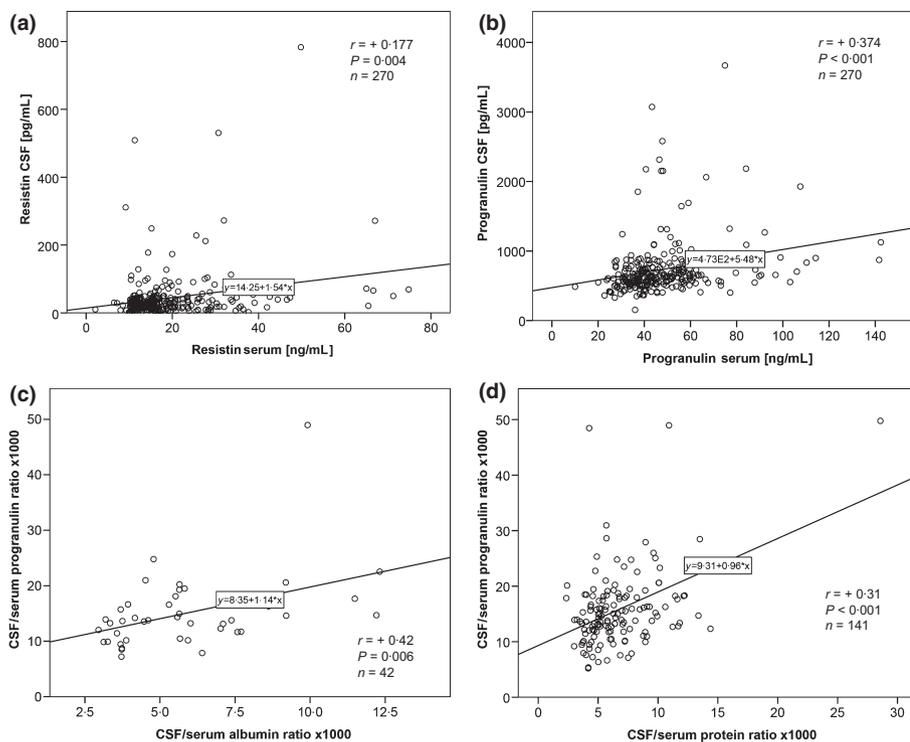


Figure 2 Correlation and regression analysis describing the blood–CSF barrier function for resistin and progranulin. (a) Positive correlation between serum and CSF resistin. (b) Positive correlation between serum and CSF progranulin. (c) Regression analysis of CSF/serum ratio for progranulin and albumin. Using a double-logarithmic scale (according to a classical *Reibergram*), CSF/serum ratio for progranulin was plotted against CSF/serum ratio for albumin (available in only $n = 41$ subjects). (d) Regression analysis of CSF/serum ratio for progranulin and total protein. Using a double-logarithmic scale (according to a classical *Reibergram*), CSF/serum ratio for progranulin was plotted against CSF/serum ratio for total protein (available in $n = 141$ subjects). CSF, cerebrospinal fluid.

progranulin might be discussed as independent predictors of LDL cholesterol and, putatively, of cardiovascular risk. Both adipokines are correlated positively among each other, both in serum and in CSF, however, with a weak correlation coefficient. The molecular mechanisms of this type of coregulation are currently unclear.

The positive correlations of serum resistin and progranulin concentrations with their respective CSF levels suggest BBB passage as a major source of these proteins in CSF. Furthermore, we aimed to give a detailed characterization of the BBB function with respect to the regulation of the respective CSF concentrations of these adipokines. Whereas the positive correlation between the absolute serum and CSF concentrations were significant but weak, the correlation between the adipokine's CSF/serum ratio on one hand and the CSF/serum albumin or protein ratio on the other hand showed high significance and higher regression coefficients. These data argue for a certain grade of physiological CSF permeability regarding resistin and progranulin. However, interpretations have to be carried out with caution as microglial cells and immigrated monocytes might express resistin and progranulin locally. The tremendous differences between serum and CSF quantities, along with discrepancies in progranulin expression between different brain areas as were reported in an earlier study [32], rather argue for an important role of autochthonous progranulin and resistin expression in the brain. Thus, it seems

somewhat difficult so far to identify the main source of CSF progranulin and resistin levels. Future studies in microglial cells and CSF monocytes as well as in animal models of autoimmune encephalitis may help to clarify this question.

Based on these observations, we set force to determine whether CSF concentrations of resistin and progranulin are determined by specific diseases and by a resulting barrier dysfunction. Whereas CSF concentrations of resistin were not different among disease subgroups, CSF progranulin was significantly higher in patients suffering from infectious CNS diseases and this difference was significant against all the other subgroups. Furthermore, the CSF/serum progranulin ratio was highest in the infectious disease subgroup and significantly different from all the remaining subgroups. It is intriguing to speculate that CSF progranulin might function as a possible predictor of infection and could be used as a discriminator against autoimmune inflammation or other mechanisms of inflammation. However, it may not be specific enough and could also compete with microbiological tests. Whereas progranulin concentrations and the CSF/serum progranulin ratio failed to serve as a predictor indicating multiple sclerosis, we observed higher progranulin levels and a higher CSF/serum ratio in patients positive for oligoclonal bands. However, larger and prospective cohorts are necessary to investigate whether a specific cut-off value for CSF progranulin or CSF/serum progranulin ratio can be calculated by receiver-operator

Table 4 Serum and CSF adipokines in relation to disease subgroups and dysregulation of blood/CSF barrier. Panel A: Mean values \pm SD of serum resistin, CSF resistin, serum progranulin and CSF progranulin are summarized for disease subgroups. CSF progranulin concentrations are highest in patients with infectious CNS diseases and significantly ($P < 0.001$) higher when compared to any other of the disease subgroups. In contrast, serum resistin and serum progranulin concentration as well as CSF resistin concentrations are not suitable to discriminate among subgroups. Panel B: Progranulin CSF/serum ratios (B) are shown for disease subgroups. The logarithmic progranulin CSF/serum ratio is significantly higher in patients with infectious CNS diseases when compared to all the remaining subgroups. Panel C: Mean values \pm SD for CSF progranulin and CSF resistin concentrations are shown according to the degree of blood-CSF dysfunction. The grade of blood-CSF dysfunction/patency is defined by the CSF/serum albumin ratio: grade 0: ratio $< 6.5 \times 10^{-3}$ for age < 40 years and $< 8.0 \times 10^{-3}$ for age < 60 years; grade 1: $< 10.0 \times 10^{-3}$; grade 2: $< 20.0 \times 10^{-3}$; grade 3: $> 20.0 \times 10^{-3}$. Total cell count was measured in CSF, and patients were divided into two subgroups (0–5 cells/ μ L and > 5 cells/ μ L). Mean values \pm SD were calculated for CSF progranulin and resistin concentrations in these subgroups. Note: All subjects including those with CSF resistin concentrations below the detection limit were included in part C. CSF, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; SD, standard deviation. Panel D: Mean values \pm SD for CSF progranulin concentrations and CSF/serum progranulin ratio in subgroups with (positive) and without (negative) the presence of oligoclonal bands. CSF progranulin concentrations and the logarithmic progranulin CSF/serum ratio are significantly higher in patients who are positive for the presence of oligoclonal bands

(A)	Resistin		Progranulin		P
	Serum (ng/mL)	CSF (pg/mL)	Serum (ng/mL)	CSF (pg/mL)	
<i>Disease groups</i>					
Infectious disease	23.1 \pm 14.2	116.8 \pm 147.2	56.1 \pm 22.4	1634.9 \pm 704.0	
Versus					
Multiple Sclerosis	18.5 \pm 8.5	53.6 \pm 26.5	47.0 \pm 19.7	739.1 \pm 258.9	n.s. < 0.001
Vascular disease	15.9 \pm 5.3	84.0 \pm 68.5	49.9 \pm 14.1	684.3 \pm 194.1	0.03 n.s. < 0.001
Epilepsy	16.8 \pm 6.6	47.9 \pm 20.7	46.0 \pm 13.1	684.5 \pm 224.7	n.s. < 0.001
Headache/facial pain	18.7 \pm 8.3	65.2 \pm 70.2	48.3 \pm 16.8	608.3 \pm 149.1	n.s. < 0.001
Neuropathy/cranial nerve palsy	21.4 \pm 15.1	65.7 \pm 52.0	54.2 \pm 23.6	802.6 \pm 492.9	n.s. < 0.001
Others	20.2 \pm 11.9	108.6 \pm 150.8	48.7 \pm 18.9	647.7 \pm 330.4	n.s. < 0.001
(B)	Progranulin CSF/serum ratio $\times 10^{-3}$				
<i>Disease groups</i>					
Infectious disease	33.2 \pm 17.1				

Table 4 Continued

(A)	Resistin Serum (ng/mL)	CSF (pg/mL)	Progranulin Serum (ng/mL)	CSF (pg/mL)
Versus				
Multiple sclerosis	17.0 ± 5.8	0.003		
Vascular disease	14.3 ± 4.2	0.001		
Epilepsy	15.6 ± 5.2	0.002		
Headache/facial pain	13.6 ± 4.6	0.001		
Neuropathy/cranial nerve palsy	16.0 ± 7.8	0.002		
Others	16.3 ± 8.6	< 0.001		
(C)	CSF progranulin (pg/mL)	CSF resistin (pg/mL)		
Blood-CSF dysfunction				
Grade 0	675 ± 292	33.6 ± 39.1		
Versus				
Grade 1	860 ± 425*	39.2 ± 27.4		
Grade 2	1028 ± 726*	110.5 ± 176.8*	< 0.001	
Grade 3	1814 ± 707*	160.5 ± 72.3*	0.02	
CSF cell count/ μ L				
0-5 cells	650 ± 192	37.3 ± 50.4		
> 5 cells	1310 ± 790*	87.3 ± 152.6*	0.009	
(D)	CSF progranulin (pg/mL)	CSF/serum progranulin ratio $\times 10^{-3}$		
Oligoclonal bands				
Negative (n = 214)	708.2 ± 79.4	14.4 ± 7.5*		
Positive (n = 43)	937.2 ± 46.5*	20.8 ± 11.4*	0.001	
Not available (n = 13)	–	–		

* $P \leq 0.05$.

characteristics to discriminate between specific diseases. The present data argue for a promising potential of CSF progranulin in this context. Whereas both CSF progranulin and CSF resistin concentrations are increasing with the grade of blood–CSF barrier dysfunction (determined by CSF/serum albumin and protein ratios), only CSF progranulin seems to have this potential. CSF progranulin levels are also higher in patients' subgroups with > 5 cells/ μ L CSF.

Cerebrospinal fluid progranulin has been discussed as a potential predictor for multiple sclerosis in one smaller study with only $n = 10$ patients suffering from progressive multiple sclerosis and with only $n = 5$ inflammatory controls [10], whereas another study with only 7 inflammatory controls found no association [23]. Based on the present large and well-characterized cohort, we demonstrate that CSF progranulin is not associated with multiple sclerosis but might help to discriminate infectious CNS diseases from other diseases.

A well-conducted study by Nicholson *et al.* [21] measured serum and CSF progranulin concentrations in 345 older individuals. We could confirm their observed positive correlation between serum and CSF progranulin concentrations but not the reported associations with age and gender. Our present data give a valuable insight into how the correlation between serum and CSF progranulin levels is regulated by the blood–CSF barrier.

As resistin is also expressed and secreted by monocytes that may cross the BBB in inflammation, CSF total cell count might affect CSF resistin levels as it is the case in the present study. Therefore, CSF resistin concentrations might be interpreted with caution and we cannot definitively rule out a monocytic and local release of resistin from immigrated cells. Moreover, CSF resistin concentrations ranging within the linear range of the dilution curve of the respective ELISA were only available in $n = 112$ patients.

Taken together, serum resistin and (to a lesser extent) serum progranulin levels are correlated to markers of systemic inflammation and LDL cholesterol. There exists CSF patency for both adipokines and CSF concentrations increase with increasing grade of blood–CSF barrier dysfunction. In particular, CSF progranulin concentrations are significantly regulated by blood–CSF barrier function under physiological and pathophysiological conditions such as infection. In contrast to the CSF concentrations, the serum levels of both adipokines are not correlated to any of the neurological disease subgroups. Specific *Reiber* quotients and graphs are presented as CSF/serum progranulin and CSF/serum resistin ratios for the first time.

Conclusions

The adipokines resistin and progranulin represent putative regulators of the fat-brain axis by their ability to cross the BBB under physiological and pathophysiological conditions.

Acknowledgements

The work of Kathrin Hardes is highly appreciated.

Disclosure

The authors have nothing to disclose.

Address

Department of Neurology, Giessen University Hospital, Klinikstrasse 33, 35392 Gießen, Germany (M. Berghoff, M. Kaps); Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, Klinikstrasse 33, 35392 Gießen, Germany (A. Hochberg, A. Schmid, J. Schlegel, T. Karrasch, A. Schäffler).

Correspondence to: Andreas Schäffler, Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, Klinikstrasse 33, 35392 Gießen, Germany. Tel.: 0049-641-985-42750; fax: 0049-641-985-42759; e-mail: andreas.schaeffler@innere.med.uni-giessen.de

Received 11 June 2015; accepted 24 October 2015

References

- 1 Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:2548–56.
- 2 Banks WA. The blood–brain barrier as a cause of obesity. *Curr Pharm Des* 2008;**14**:1606–14.
- 3 Unger RH. Leptin physiology: a second look. *Regul Pept* 2000;**92**: 87–95.
- 4 Hietaharju A, Kuusisto H, Nieminen R, Vuolteenaho K, Elovaara I, Moilanen E. Elevated cerebrospinal fluid adiponectin and adipisin levels in patients with multiple sclerosis: a Finnish co-twin study. *Eur J Neurol* 2010;**17**:332–4.
- 5 Park S, Hong SM, Sung SR, Jung HK. Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* 2008;**149**:445–54.
- 6 Yuzuriha H, Inui A, Goto K, Asakawa A, Fujimiya M, Kasuga M. Intracerebroventricular administration of NPY stimulates resistin gene expression in mice. *Int J Mol Med* 2003;**11**:675–6.
- 7 Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* 2001;**226**:963–77.
- 8 Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004;**255**:439–47.
- 9 Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K *et al.* PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab* 2012;**15**:38–50.
- 10 Vercellino M, Grifoni S, Romagnolo A, Masera S, Mattioda A, Trebini C *et al.* Progranulin expression in brain tissue and cerebrospinal fluid levels in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011;**17**:1194–201.
- 11 Ghidoni R, Paterlini A, Benussi L. Circulating progranulin as a biomarker for neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis* 2012;**1**:180–90.

- 12 Nguyen AD, Nguyen TA, Martens LH, Mitic LL, Farese RV Jr. Progranulin: at the interface of neurodegenerative and metabolic diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2013;**24**:597–606.
- 13 Hossein-Nezhad A, Mirzaei K, Ansar H, Emam-Gholipour S, Tootee A, Keshavarz SA. Obesity, inflammation and resting energy expenditure: possible mechanism of progranulin in this pathway. *Minerva Endocrinol* 2012;**37**:255–66.
- 14 Youn BS, Bang SI, Kloting N, Park JW, Lee N, Oh JE *et al.* Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* 2009;**58**:627–36.
- 15 Kawase R, Ohama T, Matsuyama A, Matsuwaki T, Okada T, Yamashita T *et al.* Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovasc Res* 2013;**100**:125–33.
- 16 Laeger T, Sauerwein H, Tuchscherer A, Bellmann O, Metges CC, Kuhla B. Concentrations of hormones and metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 2013;**96**:2883–93.
- 17 Bokarewa MI, Erlandsson MC, Bjersing J, Dehlin M, Mannerkorpi K. Smoking is associated with reduced leptin and neuropeptide Y levels and higher pain experience in patients with fibromyalgia. *Mediators Inflamm* 2014;**2014**:627041.
- 18 Bjersing JL, Erlandsson M, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. Exercise and obesity in fibromyalgia: beneficial roles of IGF-1 and resistin? *Arthritis Res Ther* 2013;**15**:R34.
- 19 Ball AK, Sinclair AJ, Curnow SJ, Tomlinson JW, Burdon MA, Walker EA *et al.* Elevated cerebrospinal fluid (CSF) leptin in idiopathic intracranial hypertension (IIH): evidence for hypothalamic leptin resistance? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;**70**:863–9.
- 20 Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S *et al.* Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:1129–36.
- 21 Nicholson AM, Finch NA, Thomas CS, Wojtas A, Rutherford NJ, Mielke MM *et al.* Progranulin protein levels are differently regulated in plasma and CSF. *Neurology* 2014;**82**:1871–8.
- 22 Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, Binetti G. Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2008;**71**:1235–9.
- 23 De Riz M, Galimberti D, Fenoglio C, Piccio LM, Scalabrini D, Venturelli E *et al.* Cerebrospinal fluid progranulin levels in patients with different multiple sclerosis subtypes. *Neurosci Lett* 2010;**469**:234–6.
- 24 Pang SS, Le YY. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;**3**:29–34.
- 25 Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;**19**:525–46.
- 26 Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;**174**:5789–95.
- 27 Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 2005;**48**:2203–5.
- 28 Schmid A, Leszczak S, Ober I, Schaffler A, Karrasch T. Serum progranulin concentrations are not responsive during oral lipid tolerance test and oral glucose tolerance test. *Horm Metab Res* 2015;**47**:571–6.
- 29 Asgary S, SamsamShariat SZ, Ghorbani A, Keshvari M, Sahebkar A, Sarrafzadegan N. Relationship between serum resistin concentrations with metabolic syndrome and its components in an Iranian population. *Diabetes Metab Syndr* 2015;**9**:266–70.
- 30 Owecki M, Nikisch E, Miczke A, Pupek-Musialik D, Sowinski J. Serum resistin is related to plasma HDL cholesterol and inversely correlated with LDL cholesterol in diabetic and obese humans. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;**31**:673–8.
- 31 Bajnok L, Seres I, Varga Z, Jeges S, Peti A, Karanyi Z *et al.* Relationship of serum resistin level to traits of metabolic syndrome and serum paraoxonase 1 activity in a population with a broad range of body mass index. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;**116**:592–9.
- 32 Chen-Plotkin AS, Xiao J, Geser F, Martinez-Lage M, Grossman M, Unger T *et al.* Brain progranulin expression in GRN-associated frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 2010;**119**:111–22.

ORIGINAL ARTICLE

Quantification and regulation of adipsin in human cerebrospinal fluid (CSF)

Andreas Schmid*, Alexandra Hochberg*, Martin Berghofft, Jutta Schlegel*, Thomas Karrasch*, Manfred Kapst and Andreas Schäffler*

*Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, and †Department of Neurology, Giessen University Hospital, Giessen, Germany

Summary

Context Data on quantification and regulation of adipsin in human cerebrospinal fluid (CSF) are sparse, and the physiological role of adipsin as an adipokine crossing the blood–brain barrier (BBB) is uncertain.

Objectives This study quantified adipsin concentrations in paired serum and CSF samples of patients undergoing neurological evaluation and spinal puncture.

Design A total of 270 consecutive patients with specified neurological diagnosis were included in this study without prior selection.

Main outcome measures Adipsin serum and CSF concentrations were measured by ELISA. A variety of serum and CSF routine parameters were measured by standard procedures. Anthropometric data, medication and patient history were available.

Results Adipsin concentrations ranged between 467 and 5148 ng/ml in serum and between 4.2 and 133.5 ng/ml in CSF. Serum adipsin concentrations were correlated positively with respective CSF concentrations and were approximately 40-fold higher when compared to CSF. The mean CSF/serum ratio for adipsin was $27 \pm 22 \times 10^{-3}$. Serum and CSF adipsin levels were independent of gender and significantly higher in overweight/obese individuals. Serum and CSF adipsin levels correlated significantly with age and were higher in patients suffering from diabetes mellitus or hypertension. CSF adipsin concentrations showed a significant correlation with markers of inflammation in CSF, but not with CSF total cell count or the presence of oligoclonal bands. Patients suffering from infectious diseases had higher CSF levels of adipsin than multiple sclerosis patients.

Conclusions Adipsin is present in human CSF under pathophysiological conditions. The positive correlation between serum and CSF concentrations, the positive correlation between the CSF/serum ratios for adipsin and total protein and the lack of

association with CSF cell count argue against an autochthonous production in the central nervous system. In contrast, the present data argue for a significant BBB permeability to adipsin.

(Received 14 April 2015; returned for revision 3 June 2015; finally revised 10 July 2015; accepted 10 July 2015)

Introduction

Adipokines¹ exert a pleiotropic role in human physiology, energy metabolism and endocrine regulation and some of them appear in human cerebrospinal fluid (CSF).² The concentration of these neuro-endocrine active adipokines such as leptin and adiponectin^{3–6} in cerebrospinal fluid is controlled by the blood–brain barrier (BBB) function. The individual concentration of these endocrine- and adipose-specific molecules differs significantly between plasma/serum and CSF and plays an important role under physiological and pathophysiological conditions. The regulation of satiety and appetite or insulin sensitivity^{2,3,5} by adipokines are prominent examples. Some mediators such as neuropeptide Y (NPY) argue for the existence of a *brain–fat axis*,⁷ whereas adipokines such as leptin, adiponectin or resistin provide the molecular basis of a *fat–brain axis*.^{2–4,6}

The adipose tissue⁸ does not only represent an endocrine organ¹ but can also be regarded as part of the immune system^{9–12} due to its expression of classical cytokines (e.g. interleukin-6), chemokines (e.g. monocyte chemoattractant protein-1), inflammatory acute phase proteins (e.g. C-reactive protein), C1q/TNF-related proteins (CTRPs), pattern recognition molecules (e.g. Toll-like receptor-4) and complement components.¹¹ Among the latter, complement factor D, also named adipsin,¹³ is highly expressed in untreated and in insulin-stimulated adipocytes and to a lower extent also in monocytes and macrophages.^{14–16} Adipsin is one of the most abundant adipokines and acts as a serine protease. Adipsin is part of the adipsin–ASP (acylation-stimulating protein) pathway regulating triglyceride synthesis.^{17,18} Beyond its metabolic function, adipsin is secreted by adipocytes into the blood stream¹³ and acts in the alternative complement activation pathway whereby it completes the formation of C3 convertase enzyme by cleaving factor

Correspondence: Andreas Schmid, Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, Klinikstrasse 33, 35392 Gießen, Germany. Tel.: 0049 641 985 46012; Fax: 0049 641 985 46032; E-mail: andreas.schmid@innere.med.uni-giessen.de

B bound to C3b yielding C3bBb. Adipsin-deficient mice have a defective antibacterial host defence.¹⁹ Adipsin-deficient animal models are characterized by fat loss, whereas adipsin deficiency caused by single point mutations is related to lipodystrophy or severe and recurrent meningococcal infections in humans.^{18,20,21}

Up to now, there is only one single publication addressing CSF adipsin levels in humans.⁴ Hietaharju *et al.*⁴ investigated the CSF and serum levels of adipsin in four twins discordant for multiple sclerosis and reported on higher CSF adipsin concentrations in twins suffering from multiple sclerosis ($P = 0.039$). In their study, adipsin CSF concentrations were not related to the respective serum concentrations. As the study cited above⁴ has limited power using only four probands and as other reports are currently not available, it was the aim of this study

- To quantify adipsin concentrations by ELISA in paired serum and CSF samples from a well-characterized cohort of patients ($n = 270$) who underwent neurological evaluation including spinal puncture in a single and tertiary care centre,
- To test for putative correlations of serum/CSF adipsin levels with anthropometric parameters, routine laboratory parameters and subgroups of neurological and internal medicine diseases,
- To obtain insight into the regulation of BBB function with respect to the penetration of adipsin by providing novel and specific CSF/serum ratios and to correlate them with standard and routine parameters of the BBB.

Material and methods

Study population

Serum and CSF samples were collected from patients undergoing neurological evaluation at the Department of Neurology, University Hospital Giessen, Germany. General patient characteristics have been published earlier by our group in a study on the role of progranulin/resistin in CSF.²² Serum was prepared from whole blood by centrifugation (4 °C, 10 min., 1520 g). CSF samples were obtained by lumbar puncture. Serum and CSF samples were immediately stored at -20 °C. All participants were informed about the aim of the study and gave informed consent. The study was approved by the local ethical committee (registration note AZ 287/13). The exclusion criteria were pregnancy and age <18 years. Anthropometric and patient-related data such as age, gender, body mass index (BMI), underlying diseases and medication were recorded. The occurrence of type 1 or type 2 diabetes mellitus, dyslipidaemia, coronary artery disease and thyroid disease was documented. Smoking habits and medication, especially the use of levothyroxine, statins and hormonal contraceptives, were also recorded. The final diagnosis was defined by a board-certified neurologist. Patients were divided into seven subgroups for evaluation: one infectious diseases of the central nervous system (CNS), two multiple sclerosis, three vascular diseases (brain and spinal infarction), four epilepsy, five headache/facial pain, six neuropathy/cranial nerve palsy, seven Others (consisting of dementia, psychiatric disorders, normal pressure hydrocephalus (NPH) and patients undergoing spinal puncture for exclusion of other diseases).

According to their CSF/serum albumin ratio, patients were divided into four subgroups: grade 0: ratio $<6.5 \times 10^{-3}$ for age <40 years and $<8.0 \times 10^{-3}$ for age <60 years; grade 1: $<10.0 \times 10^{-3}$; grade 2: $>10.0 \times 10^{-3}$; and grade 3: $>20.0 \times 10^{-3}$. According to their CSF cell count, patients were divided into 2 subgroups: 0-5 cells/ μ l and >5 cells/ μ l.

Measurement of CSF and serum parameters

Red and white blood counts, serum total protein, serum albumin, serum creatinine, C-reactive protein, serum glucose, AST, ALT, uric acid, total bilirubine, cholinesterases, glycosylated haemoglobin concentration (HbA1c) and lipidological parameters (triglycerides, cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol) were measured by standard methods at the Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Giessen University Hospital, Germany. Total cell count, total protein, albumin, glucose, lactate, ferritin, and immunoglobulins G, A and M were measured in serum and CSF using standard techniques in the Neurochemical Laboratory of the Department of Neurology. CSF/serum ratios were calculated for albumin, total protein and adipsin and plotted using double-logarithmic scales as used in typical Reibergrams.

Measurement of adipsin in serum and CSF

Serum and CSF levels of adipsin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in duplicate using the DuoSet ELISA development systems (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). The lower detection limit was 31.2 pg/ml.

Statistics

Means were compared by the nonparametric Mann–Whitney *U*-test. *Post hoc* power analysis (G*Power) was applied for calculation of achieved power for comparison of mean values of disease subgroups of given size. Correlation analysis was performed using the Spearman rho test for linear variables, and the nonparametric Mann–Whitney *U*-test was applied for comparison of classified variables. For calculation of mean values \pm standard deviation (\pm SD), correlation analysis and regression analysis, a statistical software package (SPSS 22.0), IBM (Armonk, New York, USA) was used. A *P*-value below 0.05 (two tailed) was considered as statistically significant.

Results

Characteristics of the study population

The baseline characteristics of this study population have been used earlier for investigations on resistin and progranulin in CSF.²² Briefly, $n = 270$ individuals (110 men, 160 women) were included in the study. The mean age was 50.6 ± 17.5 years. Table 1 summarizes the detailed characteristics of the entire study population with respect to adipsin and anthropometric as well as laboratory parameters in serum and CSF. Adipsin

concentrations could successfully be measured in all 270 probands by ELISA in duplicate. Adipsin concentrations ranged between 467 and 5148 ng/ml in serum (mean: 1385 ± 641 ng/ml) and between 4.2 and 133.5 ng/ml in CSF (mean: 34.4 ± 25.3 ng/ml). Serum adipsin concentrations were approximately 40-fold higher in serum when compared to CSF and the mean CSF/serum ratio was $27 \pm 22 \times 10^{-3}$.

Table 2 summarizes in detail the statistical distribution of adipsin concentrations in serum (a) and CSF (b). Adipsin levels in serum and CSF were independent of gender and significantly higher in overweight/obese individuals. Serum and CSF adipsin levels were significantly and positively correlated with age, even after correction for gender and BMI.

Correlation analysis of serum and CSF adipsin concentrations with numerical and classified variables

Serum adipsin (Table 3a) was significantly and positively correlated with a number of serum and CSF parameters. Among these positive correlations, the correlation with S-creatinine/urea and with S-glucose/HbA1c was most impressive. Moreover, we registered elevated levels of serum adipsin in the presence of diabetes mellitus (type 1 and type 2) and hypertension. CSF adipsin showed several significant correlations with CSF parameters (Table 3b). Among these positive correlations, the correlation with CSF inflammation markers such as total protein and albumin (markers for BBB permeability) as well as ferritin, lactate, IgG, IgA and IgM was most striking. Of note, partial correlation analysis showed that some of the correlations found for serum and CSF adipsin were dependent on age and on BMI (Table 3a, b).

In order to characterize the positive correlations of serum and CSF adipsin levels with diabetes mellitus and hypertension, subgroup analysis was performed (Table 3c). Patients suffering from diabetes mellitus or hypertension had significantly higher mean serum and CSF values when compared to patients without these diseases. This subgroup analysis confirms the results of the correlation analysis. The positive correlation of adipsin with HbA1c and serum glucose fits well with higher mean values in diabetes mellitus, and the association with renal markers of filtration might be caused by hypertension- and/or diabetes-induced nephropathy. Of note, the observed elevated serum adipsin levels in diabetes and in hypertension also correspond to both higher age and BMI in these subgroups.

Correlation and regression analysis of adipsin in serum and CSF

The serum concentration of adipsin is significantly ($P < 0.001$) and positively ($r = +0.32$) correlated with the respective CSF concentration of adipsin (Fig. 1a). This correlation argues against a predominant autochthonous expression of adipsin in the central nervous system. Fig. 1b depicts the positive correlation of BMI and serum adipsin levels. The positive correlation of age with serum adipsin concentrations is shown in Fig. 1c.

Table 1. Characteristics of the study population ($n = 270$ individuals)

Study population ($n = 270$)	
Age (years)	50.6 ± 17.5 [18–90]
Males n (%)	110 (40.7)
Females n (%)	160 (59.3)
Anthropometric parameters	
Mean BMI* (kg/m ²)	
BMI < 25.0 kg/m ² n (%)	130 (48.1)
BMI \geq 25.0 kg/m ² n (%)	133 (49.3)
Carbohydrate Metabolism	
Plasma glucose (mg/dl)	113 ± 38 [64–289]
HbA1c (%)	6.0 ± 0.9 [5.2–10.4]
Diabetes mellitus n (%)	31 (11.5)
Lipoprotein Metabolism	
Total cholesterol (mg/dl)	202 ± 43 [105–333]
LDL cholesterol (mg/dl)	130 ± 42 [40–232]
HDL cholesterol (mg/dl)	55 ± 15 [22–93]
Triglycerides (mg/dl)	140 ± 86 [29–605]
Inflammation	
CRP (mg/l)	6.5 ± 16.5 [0.5–149.0]
Leucocytes (giga/l)	7.7 ± 2.7 [3.3–19.9]
Red blood count	
Platelets (giga/l)	260 ± 79 [83–724]
Haemoglobin (g/l)	143 ± 16 [96–198]
Serum parameters	
Total protein (g/l)	74 ± 6 [55–98]
Total albumin (g/l)	41.9 ± 4.8 [17.8–53.2]
Creatinine (mg/dl)	0.98 ± 0.22 [0.40–2.30]
Cerebrospinal fluid parameters	
Cell count (μ l)	9 ± 37 [0–352]
Total protein (g/l)	0.520 ± 0.281 [0.176–2.700]
Albumin (g/l)	0.277 ± 0.158 [0.093–1.500]
Lactate (mmol/l)	1.87 ± 0.36 [1.25–3.47]
IgG (g/l)	0.0461 ± 0.0545 [0.0118–0.4140]
Adipsin	
Adipsin in serum [ng/ml] ($n = 270$)	1385 ± 641 [467–5148]
Adipsin in cerebrospinal fluid [ng/ml] ($n = 270$)	34.4 ± 25.3 [4.2–133.5]
CSF/serum adipsin ratio ($\times 10^{-3}$) ($n = 270$)	27 ± 22 [4–159]
Neurological diseases/Clinical subgroups	
Infectious CNS disease n (%)	13 (4.8)
Multiple sclerosis n (%)	42 (15.6)
Vascular disease n (%)	22 (8.1)
Epilepsy n (%)	26 (9.6)
Headache/facial pain n (%)	26 (9.6)
Neuropathy/cranial nerve palsy n (%)	49 (18.1)
Others† n (%)	92 (34.1)

Anthropometric and laboratory parameters in serum and CSF (cerebrospinal fluid) are shown. General patient characteristics have been published earlier by our group in a study on the role of progranulin/resistin in CSF.22 Mean values \pm standard deviation (SD) and range are given for linear variables. For classified variables, absolute numbers and percentages are shown. BMI, body mass index; CSF, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; CRP, C-reactive protein; HbA1c, glycosylated haemoglobin A1c; IgG, immunoglobulin G; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein.

*BMI was not available in 2.6% of patients.

†Consisting of dementia, (9) psychiatric disorders, (12) normal pressure hydrocephalus (9) and patients undergoing spinal puncture for exclusion of other diseases (60).

Table 2. Distribution of serum and CSF adipsin concentrations

	Minimum	Maximum	Mean	SD
(a) Serum adipsin [ng/ml]				
Total population (<i>n</i> = 270)	467	5148	1385	642
Gender				
m (<i>n</i> = 110)	467	3521	1345	545
f (<i>n</i> = 160)	496	5148	1413	700
BMI				
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	467	3084	1258*	503
≥25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	508	5148	1497*	727
Age	50.6 ± 17.5 years	Positive correlation: <i>r</i> = +0.34; <i>P</i> < 0.001		
(b) CSF adipsin [ng/ml]				
Total population (<i>n</i> = 270)	4.2	133.5	34.4	25.3
Gender				
m (<i>n</i> = 110)	7.0	133.5	34.9	25.2
f (<i>n</i> = 160)	4.2	122.3	34.0	25.4
BMI				
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	5.4	109.7	31.8**	23.5
≥25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	4.2	133.5	37.0**	26.4
Age	50.6 ± 17.5 years	Positive correlation: <i>r</i> = +0.32; <i>P</i> < 0.001		

Serum concentrations of adipsin (a) and CSF concentrations of adipsin (b) are shown. Mean serum concentrations of adipsin are approximately 40-fold higher than the respective CSF concentrations. Serum and CSF adipsin concentrations are significantly higher in overweight/obese individuals when compared to lean subjects. Both serum and CSF adipsin levels were significantly correlated with age (Spearman rho test), even after correction for gender and BMI (partial correlation analysis). BMI, body mass index; M, male; f, female; CSF, cerebrospinal fluid; *r*, correlation coefficient; SD, standard deviation. **P* = 0.002 for BMI < 25 vs BMI ≥25 kg/m²; ***P* = 0.016 for BMI < 25 vs BMI ≥25 kg/m².

Similar to classical *Reibergrams*, we plotted the CSF/serum ratios for adipsin against those for albumin and total protein using a logarithmic scale. As the CSF/serum ratios for albumin were only available in 41 subjects, we calculated the CSF/serum ratio for total protein and found in *n* = 141 subjects a highly significant (*P* = 0.01) and positive (*r* = +0.22) correlation of the CSF/serum ratio for total protein with the CSF/serum ratio for adipsin. Taken together, an increased CSF patency for total protein (BBB dysfunction) is correlated with an increased CSF patency for adipsin.

Subgroup analysis of serum and CSF adipsin concentrations in different neurological disease groups

Serum and CSF adipsin concentrations (Table 4a and b) were highest in patients of the infectious disease subgroup. CSF

levels were lowest in the multiple sclerosis subgroup. Concerning serum adipsin, the differences between the infectious disease subgroup on the one hand and multiple sclerosis or epilepsy on the other hand were not significant after Bonferroni correction. Due to comparison of seven subgroups, differences were considered as statistically significant at *P* < 0.007. Concerning CSF adipsin, differences between the infectious disease subgroup on the one hand and patients with multiple sclerosis and headache/facial pain on the other hand were statistically significant. Moreover, multiple sclerosis patients had significantly lower CSF adipsin levels than patients with vascular disease. Despite the limited sample size of the compared subgroups (Table 1), sufficient power was achieved for the comparison of mean CSF adipsin concentrations (>89%). Although conclusions and interpretations must be made with caution, the application of Bonferroni correction for multiple subgroups and *post hoc* power analysis, respectively, reduce the chance of false-positive results and help to detect underpowering. As patients were significantly older in the infectious disease subgroup when compared to the headache/facial pain patients and also in the vascular disease subgroup when compared to the multiple sclerosis patients, higher age might account for at least part of the elevated CSF adipsin levels in the respective subgroups.

Subgroup analysis of CSF adipsin concentrations with respect to classical markers of BBB dysfunction, CSF cell count and oligoclonal bands

Mean values ± SD of CSF adipsin concentrations were measured in patients and related to varying degrees of BBB dysfunction (Table 4c). Interestingly, there is a stepwise increase in CSF adipsin mean values in patients with increasing grades of a disturbed blood–CSF barrier function. Moreover, patients were divided into two subgroups with respect to CSF total cell count (0–5 cells/μl and >5 cells/μl), and subgroup analysis was performed for mean CSF adipsin concentrations (Table 4c). Adipsin levels were not significantly different in these two subgroups. When patients were divided into two subgroups with or without the presence of oligoclonal bands, both CSF adipsin concentrations and the logarithmic CSF/serum ratios for adipsin were not different (Table 4d).

Discussion

To our knowledge, this is the first study systematically investigating the concentrations of adipsin in paired serum and CSF samples in a larger cohort of patients. The present study provides data on the distribution of adipsin concentrations in relation to the respective serum concentrations in a large and neurologically well-characterized study population. These data might serve as a basis for the future development and establishment of normal ranges and give a valuable insight into how the correlation between serum and CSF adipsin levels is regulated by the BBB. Our data clearly argue against an autochthonous production of adipsin in the central nervous system. First, adipsin

Table 3. Correlation analysis of serum (a) and CSF (b) adipsin concentrations with numerical parameters in serum and CSF. Mean values \pm SD are shown for serum and CSF adipsin concentrations, age, serum creatinine, CRP and BMI in patients with/without diabetes mellitus and hypertension (c)

(a) Correlation analysis of serum adipsin concentrations			Adjusted for age		Adjusted for BMI		Adjusted for age + BMI	
Parameter	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>
S-creatinine	<0.001	+0.28	<0.001	+0.28	<0.001	+0.32	<0.001	+0.28
S-urea	<0.001	+0.23	0.04	+0.13	n.s.		n.s.	
S-uric acid	0.04	+0.18	n.s.		0.007	+0.26	0.04	+0.2
S-albumin	0.04	-0.13	n.s.		0.03	-0.15	n.s.	
S-haemoglobin	0.03	-0.14	0.005	-0.17	0.005	-0.2	0.004	-0.2
S-CRP	<0.001	+0.22	n.s.		n.s.		n.s.	
S-IgG	0.002	+0.19	0.02	+0.14	n.s.		n.s.	
S-triglycerides	0.04	+0.18	n.s.		n.s.		n.s.	
S-glucose	0.02	+0.2	n.s.		0.02	+0.24	0.04	+0.2
S-HbA1c	0.006	+0.27	n.s.		0.006	+0.31	0.04	+0.24
CSF-protein	0.002	+0.19	n.s.		n.s.		n.s.	
CSF-albumin	0.001	+0.2	n.s.		n.s.		n.s.	
CSF-IgG	<0.001	+0.23	0.049	+0.12	0.006	+0.19	0.013	+0.17
CSF-IgA	0.002	+0.34	n.s.		n.s.		n.s.	
CSF/serum adipsin ratio	<0.001	-0.26	<0.001	-0.27	0.001	-0.23	0.001	-0.27
BMI	0.002	+0.21	0.024	+0.16	-	-	-	-

(b) Correlation analysis of CSF adipsin concentrations			Adjusted for age		Adjusted for BMI		Adjusted for age + BMI	
Parameter	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>
CSF-protein	<0.001	+0.38	<0.001	+0.33	<0.001	+0.37	<0.001	+0.33
CSF-ferritin	0.012	+0.45	n.s.		n.s.		n.s.	
CSF-lactate	<0.001	+0.28	0.01	+0.16	<0.001	+0.28	0.002	+0.21
CSF-albumin	<0.001	+0.38	<0.001	+0.31	<0.001	+0.36	<0.001	+0.31
CSF-IgG	<0.001	+0.36	0.003	+0.18	<0.001	+0.26	<0.001	+0.25
CSF-IgA	<0.001	+0.56	<0.001	+0.48	<0.001	+0.45	0.005	+0.36
CSF-IgM	0.034	+0.24	0.03	+0.26	0.004	+0.37	0.009	+0.34
S-albumin	0.007	-0.16	0.03	-0.14	0.012	-0.17	n.s.	
S-IgM	0.01	-0.3	0.04	-0.24	0.02	-0.3	n.s.	
S-creatinine	0.03	+0.14	n.s.		0.044	+0.14	n.s.	
S-urea	0.03	+0.14	n.s.		n.s.		n.s.	
S-triglycerides	0.002	+0.27	0.041	+0.18	n.s.		n.s.	
S-HDL	0.007	-0.34	n.s.		n.s.		n.s.	
S-glucose	0.012	+0.21	n.s.		n.s.		n.s.	
S-HbA1c	0.012	+0.25	n.s.		n.s.		n.s.	
CSF/serum adipsin ratio	<0.001	+0.79	<0.001	+0.8	<0.001	+0.76	<0.001	+0.77
BMI	n.s.		n.s.		-	-	-	-

(c) Serum and CSF adipsin levels in patient subgroups						
	Serum adipsin (ng/ml)	CSF adipsin (ng/ml)	Age	Crea	CRP	BMI
Diabetes mellitus: yes	1690 \pm 835* <i>P</i> = 0.01	39.6 \pm 24.8* <i>P</i> = 0.04	62.5 \pm 11.4* <i>P</i> < 0.001	1.09 \pm 0.39	11.2 \pm 25.4	30.9 \pm 6.0* <i>P</i> < 0.001
Diabetes mellitus: no	1343 \pm 597	33.9 \pm 25.3	49.2 \pm 17.5	0.96 \pm 0.18	5.9 \pm 15.0	26.0 \pm 4.6
Hypertension: yes	1613 \pm 706** <i>P</i> < 0.001	41.5 \pm 28.2** <i>P</i> < 0.001	61.8 \pm 13.0** <i>P</i> < 0.001	1.04 \pm 0.28** <i>P</i> < 0.001	6.8 \pm 15.5	28.6 \pm 4.9** <i>P</i> < 0.001
Hypertension: no	1213 \pm 521	29.4 \pm 21.5	42.5 \pm 15.6	0.93 \pm 0.15	6.3 \pm 17.4	25.1 \pm 4.7

CRP, C-reactive protein; CSF, cerebrospinal fluid; HDL, high-density lipoprotein; Ig, immunoglobulin; n.s. = not significant; *r*, regression coefficient for numerical parameters (Spearman rho test; partial correlation analysis); S, serum; mean values in Panel C were compared by the Mann-Whitney *U*-test; *vs subgroup without diabetes mellitus; **vs subgroup without hypertension.

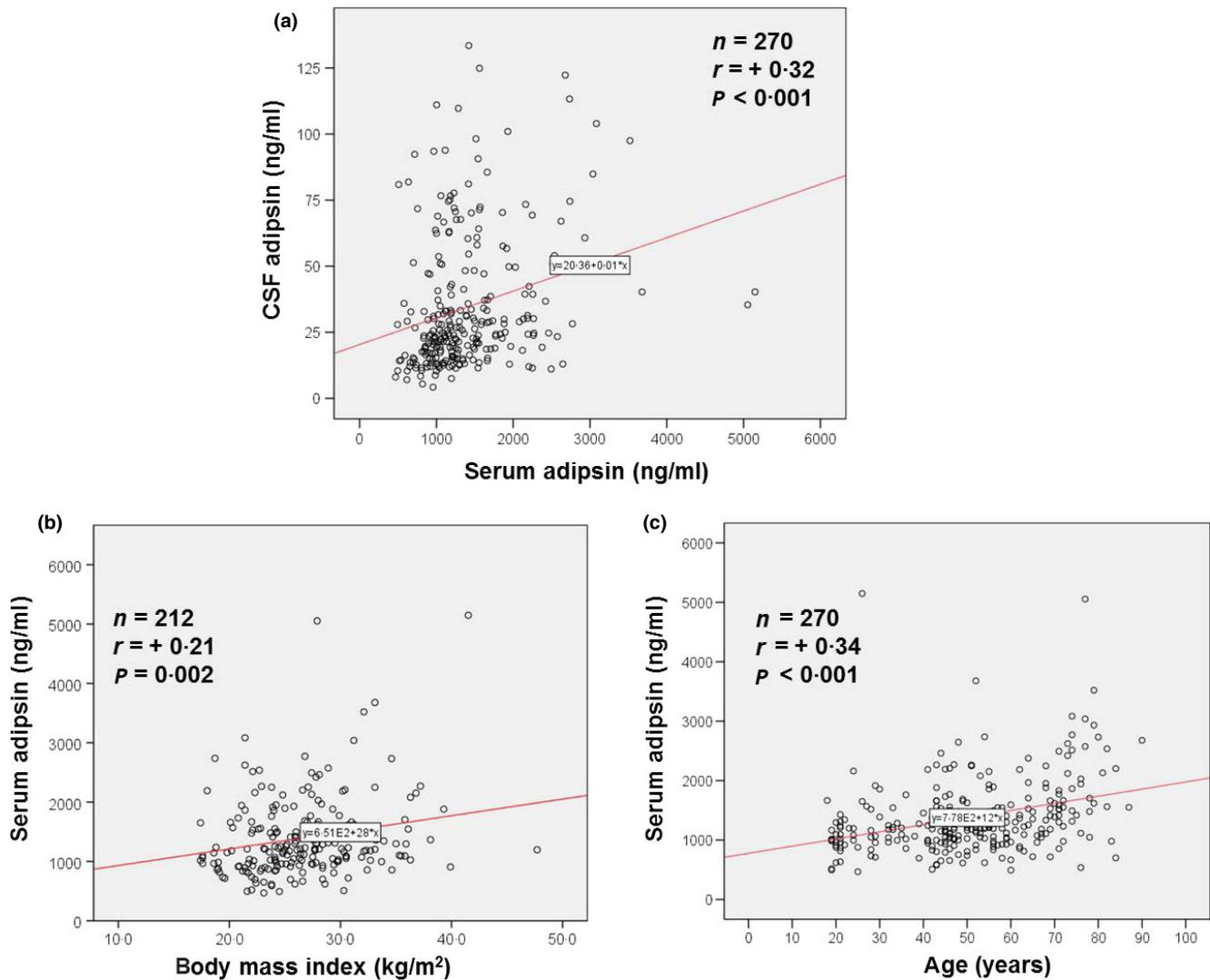


Fig. 1 Regression analysis of serum adipsin concentrations with CSF adipsin concentrations (a), BMI (b) and age (c). Scattered plots of $n = 270$ (a, c) or $n = 212$ (b) probands, respectively, are shown and regression coefficients were calculated. BMI, body mass index.

levels were not elevated in subgroups of patients with elevated CSF total cell count. Second, CSF adipsin levels are significantly and positively correlated with the respective serum concentrations. Third, CSF adipsin levels stepwisely increased with increasing grade of BBB dysfunction, measured by CSF/serum albumin or total protein ratio. Fourth, the CSF/serum adipsin ratio correlates positively with the CSF/serum protein ratio.

As adipsin is also expressed and secreted by monocytes, CSF total cell count might affect CSF adipsin levels. Therefore, CSF adipsin concentrations might be interpreted with caution and we cannot definitively rule out a monocytic and local release of adipsin from CSF cells. However, as mentioned above, the adipsin concentrations were not different in the large two subgroups of patients with or without significant numbers of total CSF cells.

As we could clearly demonstrate BBB permeability to adipsin, we postulated that CSF adipsin might function as predictor of neurologic diseases. Interestingly, CSF adipsin concentrations

were significantly higher in patients with infectious diseases when compared to patients suffering from multiple sclerosis. In a small study on four twins discordant for multiple sclerosis,⁴ CSF adipsin levels were elevated in multiple sclerosis. Among the pathophysiological subgroups investigated in the present study, the group of multiple sclerosis patients had the lowest levels of CSF adipsin concentrations. Furthermore, subgroups of patients with or without the presence of oligoclonal bands had identical CSF adipsin levels. As CSF cannot be easily obtained from completely healthy individuals from an ethical point of view, the comparison between neurologically affected and healthy individuals remains difficult and represents a clear limitation of the present study. Due to the high number of subgroups ($n = 7$), differences between neurological disease subgroups concerning serum adipsin levels and adipsin CSF/serum ratios did not remain significant after Bonferroni correction. However, due to the lack of data on precise adipsin concentrations in these neurological disease subgroups, presentation

Table 4. Serum and CSF adipsin concentrations in relation to disease subgroups and dysregulation of BBB

(a)	Adipsin		P	P
	Serum ng/ml	CSF ng/ml		
Disease groups				
Infectious disease	1602 ± 565	51.8 ± 32.0		
Versus				
Multiple sclerosis	1188 ± 721	19.2 ± 20.4	n.s.	0.006*
Vascular disease	1351 ± 483	48.2 ± 32.3	n.s.	0.002**
Epilepsy	1172 ± 297	33.2 ± 27.6	n.s.	n.s.
Headache/facial pain	1241 ± 375	25.1 ± 17.6	n.s.	0.002*
Neuropathy/cranial nerve palsy	1596 ± 814	38.0 ± 23.0	n.s.	n.s.
Others	1441 ± 633	32.0 ± 24.6	n.s.	n.s.
<hr/>				
(b)	Adipsin CSF/serum ratio × 10 ⁻³	Age years	P	P
Disease groups				
Infectious disease	36 ± 28	52.4 ± 17.6		
versus				
Multiple Sclerosis	30 ± 30	40.9 ± 13.2	n.s.	n.s.
Vascular disease	38 ± 26	55.2 ± 15.2	n.s.	0.001**
Epilepsy	29 ± 22	48.0 ± 17.1	n.s.	n.s.
Headache/facial pain	21 ± 14	36.9 ± 13.3	n.s.	0.002*
Neuropathy/cranial nerve palsy	27 ± 20	59.7 ± 16.0	n.s.	n.s.
Others	24 ± 18	53.5 ± 17.5	n.s.	n.s.
<hr/>				
(c)	CSF Adipsin ng/ml			
BBB dysfunction				
Grade 0 (n = 214)	30.5 ± 22.4			
versus				P
Grade 1 (n = 22)	44.0 ± 31.7			n.s.
Grade 2 (n = 32)	51.3 ± 29.1			<0.001*
Grade 3 (n = 2)	71.2 ± 1.2			n.s.
CSF cell count/μl				
0–5 cells (n = 233)	33.7 ± 25.0			
versus				P
> 5 cells (n = 37)	38.8 ± 26.5			n.s.
<hr/>				
(d)	CSF adipsin pg/ml	CSF/serum adipsin ratio × 10 ⁻³	P	P
Presence of oligoclonal bands				
negative (n = 214)	34.3 ± 25.4	27 ± 21		
versus				P
positive (n = 43)	35.4 ± 25.1	30 ± 25	n.s.	n.s.
not available (n = 13)	–	–		

(a) Mean values ± SD of serum adipsin and CSF adipsin concentrations are summarized for disease subgroups. CSF adipsin concentrations are highest in patients with infectious CNS diseases and lowest in patients with multiple sclerosis. Due to Bonferroni correction, *P*-values below 0.007 (for *n* = 7 subgroups) were considered as statistically significant. BBB, blood–brain barrier; CSF, cerebrospinal fluid; * vs infectious disease group; ** vs multiple sclerosis group; n.s., not significant.

(b) Adipsin CSF/serum ratios (b) are shown for disease subgroups. The adipsin CSF/serum ratio was calculated and is shown for disease subgroups. Due to Bonferroni correction, *P*-values below 0.007 were considered as statistically significant. n.s., not significant.

(c) Mean values ± SD for CSF adipsin concentrations are shown according to the degree of BBB dysfunction. Mean CSF adipsin concentrations are stepwisely increasing with severity of blood–CSF dysfunction. The grade of blood–CSF dysfunction/patency is defined by the CSF/serum albumin ratio: grade 0: ratio <6.5 × 10⁻³ for age < 40 years and <8.0 × 10⁻³ for age <60 years; grade 1: <10.0 × 10⁻³; grade 2: <10.0 × 10⁻³; and grade 3: >20.0 × 10⁻³. Total cell count was measured in CSF and patients were divided into two subgroups (0–5 cells/μl and >5 cells/μl). Due to Bonferroni correction, *P*-values below 0.012 for differences between BBB dysfunction subgroups and below 0.025 for subgroups defined by CSF cell count were considered as statistically significant. BBB, blood–brain barrier; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; SD, standard deviation. * vs grade 0; n.s., not significant.

(d) Mean values ± SD for CSF adipsin concentrations and CSF/serum adipsin ratio in subgroups with (positive) and without (negative) the presence of oligoclonal bands. Due to Bonferroni correction, *P*-values below 0.025 were considered as statistically significant. CSF, cerebrospinal fluid; n.s., not significant.

of the data might be useful for future studies and comparisons as well as future improvement of ELISA-based interpretations.

Adipsin seems to be correlated to local and systemic infection or inflammation. Both serum and CSF adipsin concentrations showed significant and positive correlations with inflammation-related parameters such as immunoglobulins, CRP, ferritin or lactate. Some of these correlations were dependent on age and BMI. The physiologic relevance of this phenomenon is currently unclear. Most interestingly, a recent study by Cresci *et al.*²³ reported an essential role of adipsin in the ability of the liver to recover from toxic injury. Together with the accepted role of complement factors in immune protection against invading pathogens and in cell survival and regeneration, adipsin might exert a protective and physiological role in brain and neuron tissue recovery after injury and infection.

Future studies have to investigate by receiver operator characteristics (ROC analysis) whether adipsin has the potential to predict specific neurological diseases or clinical outcome. The present study opens a new window for a physiologic role of BBB crossing adipokines in human disease.

Serum adipsin concentrations were dependent on BMI, age, presence of hypertension or diabetes, serum glucose and HbA1c concentrations. Amato *et al.*²⁴ measured a variety of adipokines in sera of 91 patients with type 2 diabetes and found no correlation of adipsin levels with visceral adiposity index, BMI, waist-hip ratio or with adipose tissue dysfunction in general. Using a different assay, the cited work found mean serum concentrations of 670 ± 330 ng/ml, similar in both genders (mean levels were generally lower as in the present study). Differences in study design and patient selection as well as a different ELISA used might account for this discrepancy. In the present large and well-characterized study cohort of 270 patients, a significant and positive correlation with anthropometric parameters was demonstrated. The subgroups of patients with diabetes mellitus or hypertension had significantly higher serum and CSF adipsin levels, and concentrations were even related to diabetes-specific parameters such as HbA1c and serum glucose. Increased serum adipsin levels in diabetes and hypertension patients were associated with higher age and BMI in the present study. Due to their positive correlations with serum adipsin mentioned above, elevation of these parameters might therefore account for part of the higher adipsin levels observed in diabetes and hypertension subgroups. Our anthropometric data on BMI and diabetes are in accordance with a recent study²⁵ reporting a positive correlation of serum adipsin levels with BMI and a higher HOMA index (homeostasis model assessment, indicating insulin resistance).

Of note, both serum and CSF adipsin concentrations were positively and significantly correlated with serum creatinine levels in the present study, as has been described for serum adipsin earlier.²⁶ As adipsin is known to be filtered through the glomerular membrane and its circulating concentrations are strongly increased in renal dysfunction,^{27, 28} there might be a relationship between regulation of serum and, consecutively, CSF adipsin levels and renal insufficiency. However, given the small number of individuals with elevated serum creatinine

levels (>1.2 mg/dl; $n = 22$) being enrolled in the study, we can only speculate about a possible causal relation.

Conclusions

Adipsin is present in human CSF under pathophysiological conditions. The positive correlation between serum and CSF concentrations, the positive correlation between the CSF/serum ratios for adipsin and total protein and the lack of association with CSF cell count argue against an autochthonous production in the central nervous system. In contrast, the present data argue for a significant BBB permeability to adipsin. The present study opens a new window for a physiologic role of BBB crossing adipokines in human disease.

Acknowledgements

The work of Kathrin Hardes is highly appreciated.

Disclosure

The authors have nothing to disclose.

References

- 1 Kershaw, E.E. & Flier, J.S. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 2548–2556.
- 2 Banks, W.A. (2008) The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Current Pharmaceutical Design*, **14**, 1606–1614.
- 3 Unger, R.H. (2000) Leptin physiology: a second look. *Regulatory peptides*, **92**, 87–95.
- 4 Hietaharju, A., Kuusisto, H., Nieminen, R. *et al.* (2010) Elevated cerebrospinal fluid adiponectin and adipsin levels in patients with multiple sclerosis: a Finnish co-twin study. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **17**, 332–334.
- 5 Park, S., Hong, S.M., Sung, S.R. *et al.* (2008) Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology*, **149**, 445–454.
- 6 Havel, P.J. (2001) Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental biology and medicine*, **226**, 963–977.
- 7 Yuzuriha, H., Inui, A., Goto, K. *et al.* (2003) Intracerebroventricular administration of NPY stimulates resistin gene expression in mice. *International journal of molecular medicine*, **11**, 675–676.
- 8 Fantuzzi, G. (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **115**, 911–919.
- 9 Trayhurn, P. & Wood, I.S. (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British journal of nutrition*, **92**, 347–355.
- 10 Trayhurn, P. (2005) Adipose tissue in obesity—an inflammatory issue. *Endocrinology*, **146**, 1003–1005.
- 11 Schaffler, A., Scholmerich, J. & Salzberger, B. (2007) Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFRs and CTRPs. *Trends in Immunology*, **28**, 393–399.

- 12 Schaffler, A. & Scholmerich, J. (2010) Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in Immunology* **31**, 228–235.
- 13 Fruhbeck, G. (2004) The adipose tissue as a source of vasoactive factors. Current medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry. Cardiovascular and hematological agents*, **2**, 197–208.
- 14 White, R.T., Damm, D., Hancock, N. *et al.* (1992) Human adipisin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 9210–9213.
- 15 Rosen, B.S., Cook, K.S., Yaglom, J. *et al.* (1989) Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science*, **244**, 1483–1487.
- 16 Kitagawa, K., Rosen, B.S., Spiegelman, B.M. *et al.* (1989) Insulin stimulates the acute release of adipsin from 3T3-L1 adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1014**, 83–89.
- 17 Cianflone, K., Maslowska, M. & Sniderman, A. (1995) The acylation stimulating protein-adipsin system. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, **19**(Suppl 1), S34–S38.
- 18 Cianflone, K., Xia, Z. & Chen, L.Y. (2003) Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1609**, 127–143.
- 19 Xu, Y., Ma, M., Ippolito, G.C. *et al.* (2001) Complement activation in factor D-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 14577–14582.
- 20 Sprong, T., Roos, D., Weemaes, C. *et al.* (2006) Deficient alternative complement pathway activation due to factor D deficiency by 2 novel mutations in the complement factor D gene in a family with meningococcal infections. *Blood*, **107**, 4865–4870.
- 21 Esterbauer, H., Krempler, F., Oberkofler, H. *et al.* (1999) The complement system: a pathway linking host defence and adipocyte biology. *European Journal of Clinical Investigation*, **29**, 653–656.
- 22 Berghoff, M., Hochberg, A., Schmid, A. *et al.* (2015) Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid (CSF). submitted and under review
- 23 Cresci, G.A., Allende, D., McMullen, M.R. *et al.* (2015) Alternative complement pathway component Factor D contributes to efficient clearance of tissue debris following acute CCl(4)-induced injury. *Molecular immunology*, **64**, 9–17.
- 24 Amato, M.C., Pizzolanti, G., Torregrossa, V. *et al.* (2014) Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*, **9**, e91969.
- 25 Derosa, G., Fogari, E., D'Angelo, A. *et al.* (2013) Adipocytokine levels in obese and non-obese subjects: an observational study. *Inflammation*, **36**, 914–920.
- 26 Nassberger, L., Sturfelt, G. & Thysell, H. (1992) Serum levels of the soluble interleukin-2 receptor are dependent on the kidney function. *American journal of nephrology*, **12**, 401–405.
- 27 Volanakis, J.E., Barnum, S.R., Giddens, M. *et al.* (1985) Renal filtration and catabolism of complement protein D. *The New England journal of medicine*, **312**, 395–399.
- 28 Inagi, R., Miyata, T., Hong, K. *et al.* (1993) Decreased activity of complement-mediated immune complex clearance in hemodialysis patients. *Clinical immunology and immunopathology*, **68**, 333–339.

CTRP-3 is permeable to the blood–brain barrier and is not regulated by glucose or lipids *in vivo*

Andreas Schmid^{*}, Martin Berghoff[†], Alexandra Hochberg^{*}, Andreas Schäffler^{*} and Thomas Karrasch^{*}

^{*}Department of Internal Medicine III, [†]Department of Neurology, University Hospital Giessen, Giessen, Germany

ABSTRACT

Background C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) represents a novel anti-inflammatory and antidiabetic adipokine secreted by adipose tissue. The physiological and postprandial regulation of CTRP-3 remains obscure and it is not known whether CTRP-3 is permeable to the brain. The postprandial regulation of CTRP-3 during an oral glucose tolerance test ($n = 100$) and an oral lipid tolerance test ($n = 100$) in humans was investigated. Moreover, CTRP-3 concentrations were measured in paired serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples of patients ($n = 270$) undergoing neurological evaluation. The expression of CTRP-3 mRNA was investigated in adipocytes upon stimulation with glucose, sex hormones and a broad panel of fatty acids.

Materials and methods Serum and CSF CTRP-3 concentrations were measured by ELISA. 3T3-L1 adipocytes were used for stimulation experiments. CTRP-3 mRNA expression was quantified by using real-time PCR analysis.

Results CTRP-3 is present in human cerebrospinal fluid with a mean CSF/serum ratio of $110 \pm 64 \times 10^{-3}$. CTRP-3 is not regulated postprandially by carbohydrates or lipids in the healthy state. Females have slightly higher levels of CTRP-3 when compared to males. A significant and positive correlation of CTRP-3 to LDL cholesterol serum levels is reproducible in several cohorts and deserves further mechanistic investigation. Whereas glucose concentrations do not influence CTRP-3 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes *in vitro*, fatty acids differentially modulate CTRP-3 expression.

Conclusions The novel adipokine CTRP-3 is detectable in human cerebrospinal fluid (proof of principle). Due to its blood–brain barrier permeability, CTRP-3 represents a novel putative candidate for a physiological regulator molecule affecting central nervous functions.

Keywords Adipocyte, adipokine, blood–brain barrier, cerebrospinal fluid, CTRP-3, lipid tolerance test.

Eur J Clin Invest 2017; 47 (3): 203–212

Introduction

CTRP-3 belongs to the expanding C1q/TNF-related protein (CTRP) superfamily with 15 family members up to now [1,2]. CTRPs are pleiotropic and secreted mediators involved in whole body energy metabolism, interorgan signalling, inflammation, immune regulation and many other endocrine, paracrine and autocrine functions. Each of these proteins shows a distinct expression profile but specific receptors remain to be discovered. Several CTRPs such as CTRP-3 [3–7] and CTRP-5 [7,8] are involved in metabolism, immune regulation, inflammation and adipocyte biology. CTRP-3 (C1q/TNF-related protein-3) is secreted by mature adipocytes and therefore represents a novel adipokine.

CTRP-3 improves adipocyte insulin sensitivity by decreasing inflammation and by increasing insulin signalling [9]. CTRP-3 regulates adipocytic adipokine expression and secretion [10]. Importantly, CTRP-3 lowers glucose levels in rodents by decreasing gluconeogenesis and hepatic glucose output [5]. These glucose-lowering effects are mediated by increased hepatic Akt signalling and by reduced gluconeogenic enzyme expression. *In vitro* experiments and *in vivo* studies in wild-type mice showed that recombinant CTRP-3 acts anti-inflammatorily in adipocytes and monocytes by antagonizing the pro-inflammatory effects of lipopolysaccharide (LPS), fatty acids and toll-like receptor ligands [6,11–13]. In contrast, experimental animals with overexpression or lack of CTRP-3 expression respond to LPS in a similar way [14].

In the human system, data on the regulation of CTRP-3 are contradictory and scarce. CTRP-3 serum concentrations were reported to decline with weight loss [15] and to show a negative correlation with glucose levels [16]. However, higher CTRP-3 levels were found in patients suffering from type 2 diabetes mellitus [17]. In contrast, Deng *et al.* [18] reported a negative correlation between CTRP-3 levels and insulin resistance and a Chinese study described lower levels of CTRP-3 in obesity and type 2 diabetes [19]. A cross-sectional study by Wolf *et al.* [20] reported lower CTRP-3 concentrations in obese individuals. As glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists increase the expression of CTRP-3 in adipocytes [21,22] *in vitro*, a possible effect of orally administered glucose or lipids on serum CTRP-3 levels would be of interest. Data on the physiological and postprandial regulation of serum CTRP-3 in healthy individuals are not available, and it is not known whether CTRP-3 is able to penetrate the blood-brain barrier and can be measured in cerebrospinal fluid (CSF). The latter would be a prerequisite for a putative role of CTRP-3 as an adipocyte-derived mediator of central nervous processes such as the hypothalamic control of appetite and satiety.

Thus, the aim of this study was

- to investigate the physiological and postprandial regulation of CTRP-3 in two cohorts (each with $n = 100$ healthy individuals) after an oral lipid tolerance test (OLTT) and after an oral glucose tolerance test (OGTT)
- to prove and to quantify the presence of CTRP-3 in human cerebrospinal fluid in an additional cohort of $n = 270$ patients undergoing neurological evaluation
- to investigate the impact of sex hormones, glucose and fatty acids on the expression of CTRP-3 mRNA in adipocytes *in vitro*.

Material and methods

Study cohorts

Study cohort 1: Oral glucose tolerance test. This study cohort consisted of $n = 100$ participants, 64 females and 36 males. Fifty-one of them were normal weight and 49 overweight individuals [all of them were insulin-sensitive as assessed by a normal homeostatic model assessment (HOMA) index]. Participants underwent an oral standard glucose tolerance test using 75 g glucose after an overnight fast of 12 h. Venous blood samples were drawn at 0 h (fasting), 1 h and 2 h. This study cohort was characterized and published earlier in detail for common anthropometric and laboratory parameters [23–25] as well as for the regulation of several adipokines. The study was approved by the local ethical committee and was conducted at the University of Regensburg, Germany. Detailed and further

information concerning the study procedure can be referred from the literature [23–25].

Study cohort 2: Oral lipid tolerance test. This study cohort was characterized and published earlier for common anthropometric and laboratory parameters as well as for lipid-induced postprandial regulation of several adipokines [24–27] and bile acids [28]. Hundred healthy volunteers (58 females and 42 males, 66 with normal weight and 34 overweight/obese) gave their informed consent to the study, and participants were examined at the University Hospital of Regensburg. The study was approved by the local ethical committee. Detailed information concerning the study procedure can be referred from the literature [24–27]. Briefly, age, BMI, hip circumference, waist circumference, waist/hip ratio, triceps skinfold thickness and blood pressure were recorded. Patients' history regarding type 2 diabetes and cardiovascular diseases as well as smoking habits or hormonal contraception was documented. Exclusion criteria were a positive history of chronic illness, acute or chronic infection within 10 days prior to the OLTT, age < 18 years or > 55 years and any kind of medication (except oral contraceptives). Pregnant and menstruating women were not admitted to the study. OLTT was conducted after an overnight fast of 12 h. During OLTT, the participants had to rest and not to eat or smoke. Venous blood samples were drawn at 0 h (fasting), 2 h, 4 h and 6 h. The OLTT solution was free of proteins and carbohydrates (160 mL; 758.1 kcal; 75 g vegetable fat as triglycerides, 9.2 g fatty acids as pure vegetable oils).

Study cohort 3: Cerebrospinal fluid samples. Paired serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples of $n = 270$ consecutive patients (110 males, 160 females; mean age 50.6 ± 17.5 years) undergoing neurological evaluation at the Department of Neurology, University Hospital Giessen, Germany, were collected without prior selection. General patient characteristics have been published earlier by our group in two studies on the role of progranulin, resistin and adiponin in CSF [29,30]. All participants were informed about the aim of the study and gave informed consent. The study was approved by the local ethical committee. The exclusion criteria were pregnancy and age < 18 years. Anthropometric and patient-related data as well as underlying diseases and medication were recorded. The occurrence of type 1 or type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, coronary artery disease, thyroid disease and smoking habits was documented. Patients were divided into seven subgroups for evaluation: 1 infectious diseases of the central nervous system (CNS; $n = 13$), 2 multiple sclerosis ($n = 42$), 3 vascular diseases (brain and spinal infarction; $n = 22$), 4 epilepsy ($n = 26$), 5 headache/facial pain ($n = 26$), 6 neuropathy/cranial nerve palsy ($n = 49$) and 7 others (consisting of dementia,

psychiatric disorders, normal pressure hydrocephalus and patients undergoing spinal puncture for exclusion of other diseases; $n = 92$). Detailed and further information concerning the study procedure can be referred from the literature [29,30].

Reporting of this study conforms to STROBE statement along with references to STROBE statement and the broader EQUATOR guidelines (Simera *et al.* January 2010 issue of EJCI).

Quantification of CTRP-3 protein levels in serum and in cerebrospinal fluid

CTR-3 concentrations in serum and in CSF samples were measured in duplicates by ELISA techniques (DuoSet ELISA development systems; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) and are expressed as means \pm doubled standard error of the mean ($2 \times$ SEM). The detection range of the applied ELISA kit was 78.1–5000 pg/mL.

Quantification of CTRP-3 mRNA expression in murine 3T3-L1 adipocytes *in vitro*

3T3-L1 preadipocytes [31] were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 10% newborn calf serum (NCS; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (PAN, Aidenbach, Germany). Cells were differentiated into adipocytes at confluence by DMEM/F12/glutamate medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 20 μ M 3-isobutyl-methyl-xanthine (Serva, Heidelberg, Germany), 1 μ M corticosterone, 100 nM insulin, 200 μ M ascorbate, 2 μ g/mL transferrin, 5% NCS, 1 μ M biotin, 17 μ M pantothenate, 1% penicillin/streptomycin (all from Sigma-Aldrich) and 300 μ g/mL Pedersen fetuin (MP Biomedicals, Illkirch, France) [32,33] for 9 days using a slightly modified protocol as reported in the literature [31,34–37]. Phenotype was controlled by light microscopy (appearance of extensive accumulation of lipid droplets). Mature adipocytes at day 9 of differentiation were used for stimulation experiments. Cells were washed with PBS and incubated under serum-free culture conditions. Fatty acids were purchased from Sigma-Aldrich and dissolved (200 mM) in ethanol at 70 °C and then complexed 1 : 10 with 10% bovine serum albumin at 55 °C (20 mM) for 10 min. The formation of albumin complexes is important for reducing possible cell toxicity of fatty acids. The C11 saturated fatty acid **undecanoic acid** (100 μ M), the C12 saturated fatty acid **lauric acid** (100 μ M), the C14 saturated fatty acid **myristic acid** (100 μ M), the C16, C17 and C18 saturated fatty acids **palmitic acid** [C16] (100 μ M), **margaric acid** [C17] (100 μ M) and **stearic acid** [C18] (100 μ M), the C16 and C18 mono-unsaturated fatty acids **palmitoleic acid** [C16:1, cis-9] (10 μ M) and **oleic acid** [C18:1, cis-9] (10 μ M), the C18 poly-unsaturated fatty acid **linoleic acid** [18:2, n-6] (10 μ M), the C20:4-(n-6) fatty acid **arachidonic acid** (10 μ M), the C20:5-(n-3) fatty acid **eicosapentaenoic acid**

(10 μ M) and the C22:6-(n-3) fatty acid **docosahexaenoic acid** (10 μ M) were used for stimulation experiments ($n = 4$ –6 wells each; 18 h of incubation). These fatty acid concentrations were shown to be nontoxic to 3T3-L1 cells or monocytes *in vitro* [38,39]. However, to exclude any unexpected cytotoxic effects, LDH (lactate dehydrogenase) concentration was measured in the supernatants (Cytotoxicity Detection Kit; Roche, Mannheim, Germany). In further stimulation experiments, mature 3T3-L1 adipocytes were treated with estradiol and testosterone (Sigma-Aldrich) for 18 h (0.5 and 2 μ M, $n = 6$ wells each) or were incubated overnight in serum-free DMEM/F12 (containing 17.5 mM glucose; Lonza) vs. DMEM (25.0 mM glucose; Biochrom AG). Expression of CTRP-3 mRNA was quantified by reverse transcription followed by real-time PCR (RT-PCR) of the corresponding cDNA. Oligonucleotides 5'-GGGGTTCTTTATGGAGCATT-3' and 5'-AAATGCATCCTTTGAGGT-3' were used as PCR primers for CTRP-3 cDNA amplification. CTRP-3 transcription levels were normalized to gene expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); primers: 5'-TGTCCGTCGTGGATCTGAC-3' and 5'-AGGGAGATGCTCAGTAGTGTGG-3'; all oligonucleotides were purchased from Metabion, Martinsried, Germany). In the figures, normalized mRNA levels of CTRP-3 are displayed as arbitrary units (AU) in reference to the control group.

Statistical analysis

For calculating mean values \pm standard deviation (\pm SD) or \pm standard error of the mean (\pm SEM), a statistical software package (SPSS 22.0, IBM, Armonk, NY, USA) was used. Means were compared by the nonparametric Mann–Whitney *U*-test for two independent samples and the Kruskal–Wallis *H*-test for k independent samples. Correlation analysis was performed by using the Spearman's rho test for linear variables. For correction of other parameters, partial correlation analysis was calculated. A *P*-value below 0.05 (two tailed) was considered as statistically significant. In Figs 1 and 2, the box plots show the median (thick line), the upper and lower quartiles (box), the range (whiskers) and extreme values (circles). In Fig. 4, the bars represent the mean values and the whiskers give the doubled standard error of the mean ($2 \times$ SEM). For multiple subgroup analysis, the Bonferroni correction was applied.

Results

Regulation of CTRP-3 during OGTT

CTR-3 levels were measurable in 99 of 100 study subjects. At baseline (0 h, fasting), mean \pm SEM serum CTRP-3 concentrations were 81.5 \pm 2.2 ng/mL, ranging between 47.6 and 152.1 ng/mL. During OGTT, mean serum CTRP-3 concentrations did not change significantly (Fig. 1a). There was a significant ($P = 0.016$) and positive correlation ($r = +0.24$) between

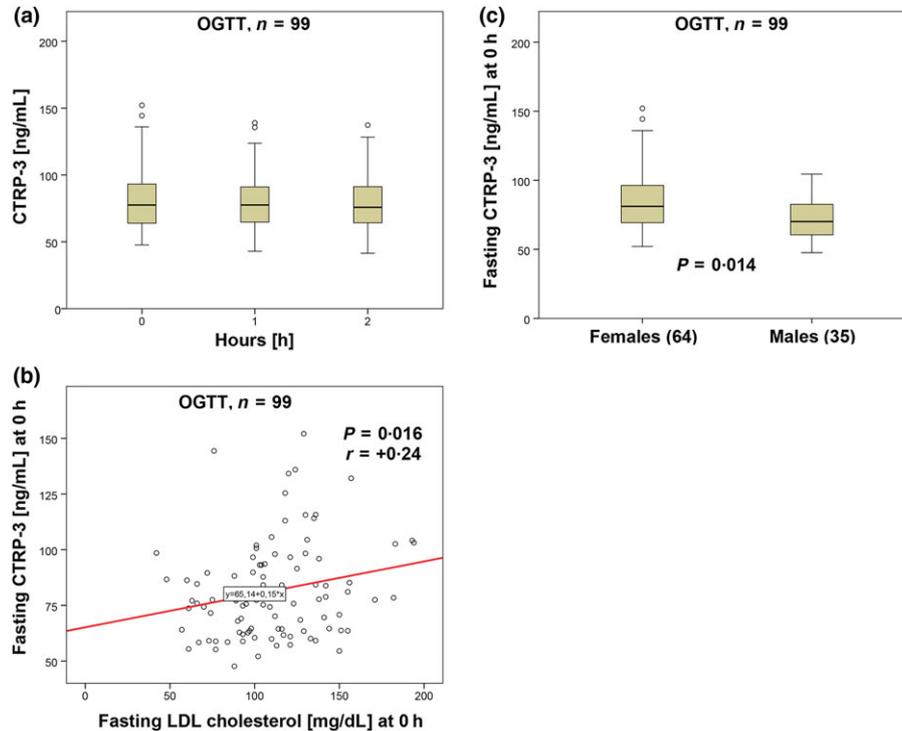


Figure 1 Regulation of serum CTRP-3 concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay during oral glucose tolerance test (OGTT). (a) CTRP-3 serum concentrations (ng/mL) before (fasting) and during (1 h; 2 h) OGTT by using 75 g of glucose. (b) Significant and positive correlation between fasting LDL cholesterol (mg/dL) and fasting CTRP-3 concentrations (ng/mL) depicted by scatterplot. (c) Females display significantly higher fasting CTRP-3 levels (ng/mL) when compared to males. The box plots show the median (thick line), the upper and lower quartiles (box), the range (whiskers) and extreme values (circles).

fasting LDL concentrations and fasting CTRP-3 concentrations (Fig. 1b), as demonstrated by bivariate correlation analysis. In contrast, no significant correlations were found between CTRP-3 and age, BMI, systolic/diastolic blood pressure, skinfold thickness, waist circumference, hip circumference, CRP, insulin, HDL cholesterol, triglycerides, total cholesterol and HOMA index. Females had significantly higher CTRP-3 serum concentrations at baseline (85.5 ± 2.9 ng/mL vs. 74.1 ± 2.7 ng/mL; $P = 0.014$; Fig. 1c) and at 2 h during OGTT (83.1 ± 2.4 ng/mL vs. 72.6 ± 2.7 ng/mL; $P = 0.014$). The positive correlation between LDL cholesterol and CTRP-3 remained significant ($P = 0.019$) even after correction for gender by using partial correlation analysis.

Regulation of CTRP-3 during OLTT

Fasting mean \pm SEM CTRP-3 concentrations at baseline were 83.3 ± 2.4 ng/mL and ranged between 35.9 and 212.5 ng/mL at 0 h. During 6 h of OLTT, the CTRP-3 concentrations remained unchanged (Fig. 2a). We detected a significant ($P = 0.004$) and positive ($r = +0.29$) correlation between LDL cholesterol concentrations and CTRP-3 concentrations at 6 h

during OLTT (Fig. 2b). This correlation remained significant after correction for gender ($P = 0.005$) by using partial correlation analysis. In contrast, no significant correlations were found between CTRP-3 and age, BMI, systolic/diastolic blood pressure, BMI, waist circumference, hip circumference, CRP, insulin, HDL cholesterol and triglycerides. CTRP-3 levels were not associated with a positive family history of diabetes mellitus, coronary artery disease or with a personal history of oral contraceptive use or smoking. Females had significantly higher CTRP-3 serum concentrations at baseline (87.9 ± 3.5 ng/mL vs. 76.8 ± 2.5 ng/mL; $P = 0.027$; Fig. 2c), and this gender-specific difference was even more significant after 6 h during OLTT (89.8 ± 3.4 ng/mL vs. 75.1 ± 2.4 ng/mL; $P = 0.001$).

Presence and quantification of CTRP-3 in human cerebrospinal fluid

CTRP-3 was successfully measured by ELISA in all of the 270 paired serum–CSF samples. CTRP-3 was measurable in serum within a broad range of 33.2–287.3 ng/mL. Importantly, CTRP-3 is detectable in human CSF (Table 1B) over a broad range of 1.9–41.6 ng/mL with no significant differences between gender

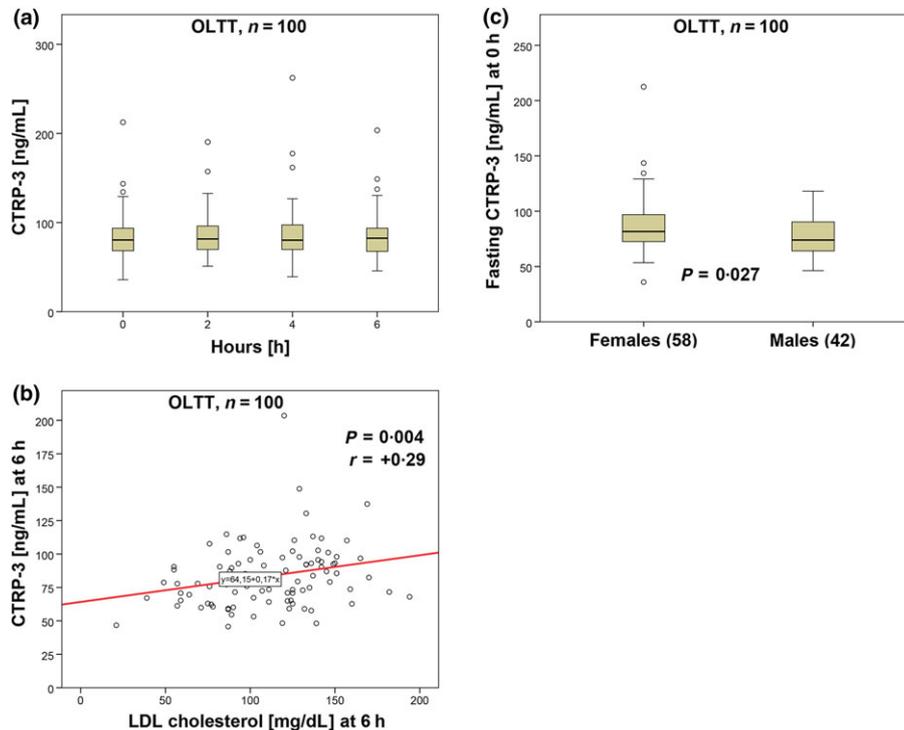


Figure 2 Regulation of serum CTRP-3 concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay during oral lipid tolerance test (OLTT). (a) CTRP-3 serum concentrations (ng/mL) before (0 h, fasting) and during (2 h; 4 h; 6 h) OLTT. (b) Significant and positive correlation between LDL cholesterol (mg/dL) and CTRP-3 concentrations (ng/mL) at 6 h depicted by scatterplot. (c) Females display significantly higher fasting CTRP-3 levels (ng/mL) when compared to males. The box plots show the median (thick line), the upper and lower quartiles (box), the range (whiskers) and extreme values (circles).

or BMI subgroups. In contrast, serum CTRP-3 (Table 1A) concentrations were significantly higher in females when compared to males ($P = 0.001$). These findings in CSF and serum were consistent even after correction for age, BMI, nicotine consumption and use of hormonal contraceptives. This is the very first study demonstrating the presence of CTRP-3 in human CSF. CSF concentrations account for $\sim 10\%$ of the respective serum concentrations indicating a mean CSF/serum ratio of $110 \pm 64 \times 10^{-3}$ (range: $22\text{--}545 \times 10^{-3}$). As depicted in Fig. 3 by scatterplot, there is a significant ($P = 0.015$) and positive ($r = +0.15$) correlation between serum and CSF CTRP-3 levels. These observations strongly argue for a blood–brain barrier (BBB) permeability of CTRP-3 and against an autochthonous production of CTRP-3 within the cerebrospinal fluid compartment.

CTR-3 serum and CSF concentrations among disease subgroups

Mean serum CTRP-3 concentrations (Table 2A) and mean CSF/serum ratios for CTRP-3 (Table 2B) were not different between disease subgroups. In contrast, patients suffering

from infectious diseases had significantly lower ($P = 0.016$) CTRP-3 levels in CSF when compared to the headache/facial pain subgroup (Table 2A). Accordingly, significant and negative correlations of serum CTRP-3 concentrations with CRP levels ($r = -0.20$, $P = 0.001$) and leucocyte concentrations ($r = -0.21$, $P = 0.001$) were observed in the study cohort 3. Similarly, CTRP-3 levels in CSF were significantly lower in the epilepsy subgroup and in the neuropathy/cranial nerve palsy group when compared to the headache/facial pain group (Table 2A). However, as subgroup analysis was performed with up to seven subgroups, the Bonferroni correction must be applied, and after this, the differences cited above remained no longer significant or only marginally significant.

CTR-3 CSF concentrations and CSF/serum ratios in relation to dysfunction of the blood–brain barrier

As depicted in Table 2C, mean CSF CTRP-3 concentrations were not different in patients with varying degrees of BBB dysfunction, as measured by CSF/serum albumin ratio or CSF cell count. Neither CTRP-3 concentrations in CSF nor CTRP-3

Table 1 Distribution of (A) serum and (B) cerebrospinal fluid CTRP-3 concentrations (ng/mL) are summarized and related to gender and body mass index (BMI)

	Minimum	Maximum	Mean	SD
(A)				
Total population (<i>n</i> = 270)	33.2	287.3	105.8	36.4
Gender				
m (<i>n</i> = 110)	48.6	248.8	97.1*	29.6
f (<i>n</i> = 160)	33.2	287.3	111.9*	39.3
BMI [†]				
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	39.9	287.3	105.9	39.1
≥ 25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	33.2	248.8	105.3	33.2
(B)				
Total population (<i>n</i> = 270)	1.9	41.6	10.6	5.1
Gender				
m (<i>n</i> = 110)	2.4	41.6	10.4	5.0
f (<i>n</i> = 160)	1.9	39.4	10.8	5.1
BMI [†]				
< 25 kg/m ² (<i>n</i> = 130)	2.9	39.4	10.9	4.9
≥ 25 kg/m ² (<i>n</i> = 133)	2.4	41.6	10.4	5.2

CTRP-3, C1q/TNF-related protein-3.

**P* = 0.001 (males vs. females).

[†]BMI was not available in 2.6% of patients.

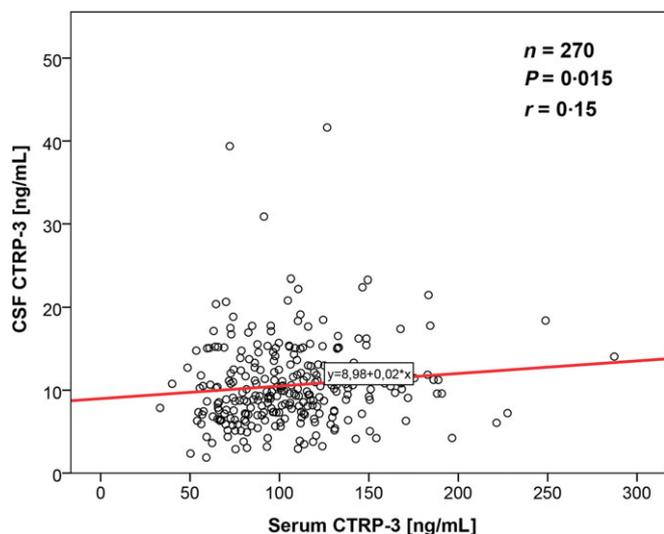


Figure 3 Correlation of serum and cerebrospinal fluid CTRP-3 levels by scatterplot. CTRP-3 concentrations were measured by ELISA (ng/mL) in paired serum and CSF samples.

CSF/serum ratios were different between subgroups with or without the presence of oligoclonal bands (Table 2D).

Concentrations of CTRP-3 in serum and CSF according to concomitant diseases

Serum CTRP-3 concentrations were not different between patients with/without diabetes mellitus, hypertension or coronary artery disease (Table 3). In contrast, CTRP-3 concentrations in CSF were significantly lower in patients suffering from diabetes mellitus (*P* = 0.011) or from hypertension (*P* = 0.005). These significant discrepancies in CSF CTRP-3 were depending on age in diabetes and hypertension patients and further on BMI in diabetes patients.

Effect of glucose on adipocyte CTRP-3 mRNA expression

The effects of high to supra-physiological glucose concentrations on adipocyte CTRP-3 mRNA expression are shown in Fig. 4a. Relative CTRP-3 mRNA expression was not different in adipocytes grown under high (17.5 mM) and supra-physiological (25.0 mM) glucose concentrations.

Effect of fatty acids on adipocyte CTRP-3 mRNA expression

Among the nutritional fatty acids tested (Fig. 4b), oleic acid (*P* = 0.038) and linoleic acid (*P* = 0.002) upregulated CTRP-3 expression, whereas palmitic acid and stearic acid had no effect. Interestingly, the saturated fatty acid lauric acid, the main lipid moiety of lipopolysaccharide, significantly upregulated (*P* = 0.002) CTRP-3 expression (Fig. 4b).

Among the other fatty acids tested (Fig. 4c), undecanoic acid, myristic acid (*P* = 0.041 each) and margaric acid (*P* = 0.004) were able to reduce CTRP-3 mRNA expression.

As shown in Fig. 4d, arachidonic acid (*P* = 0.041) and eicosapentaenoic acid (*P* = 0.015) significantly reduced CTRP-3 expression, whereas palmitoleic acid and docosahexaenoic acid had no effect.

Effect of sex hormones on adipocyte CTRP-3 mRNA expression

In vitro stimulation of 3T3-L1 adipocytes with the sex hormones estradiol and testosterone (0.5 and 2 μM each) did not significantly affect CTRP-3 mRNA levels (*P* = 0.82 for estradiol and *P* = 0.94 for testosterone; each *n* = 6; data not shown).

Discussion

CTRP-3 serum concentrations are significantly higher in females when compared to males in all of the three cohorts investigated in the present study. Moreover, CTRP-3 concentrations were found to correlate positively with LDL cholesterol levels in the

Table 2 Serum and cerebrospinal fluid (CSF) CTRP-3 concentrations (ng/mL) in relation to disease subgroups and dysregulation of BBB

A				
	CTRP-3		P	
	Serum (ng/mL)		CSF (ng/mL)	
Disease groups				
Infectious disease	94.6 ± 36.6	n.s.	8.5 ± 5.1*	
versus				
Multiple sclerosis	105.4 ± 33.9	n.s.	10.7 ± 4.1	
Vascular disease	106.2 ± 30.2	n.s.	10.7 ± 3.5	
Epilepsy	99.2 ± 29.2	n.s.	10.8 ± 6.7 [†]	
Headache/facial pain	113.2 ± 43.1	n.s.	13.9 ± 7.4 ^{*,†,‡}	
Neuropathy/cranial nerve palsy	110.0 ± 43.2	n.s.	9.7 ± 3.9 [‡]	
Others	105.1 ± 34.9	n.s.	10.3 ± 4.8	
B				
Parameter	CTRP-3 CSF/serum ratio × 10 ³		P	
Disease groups				
Infectious disease	93 ± 59	n.s.		
versus				
Multiple sclerosis	109 ± 49	n.s.		
Vascular disease	106 ± 42	n.s.		
Epilepsy	119 ± 94	n.s.		
Headache/facial pain	129 ± 66	n.s.		
Neuropathy/cranial nerve palsy	98 ± 51	n.s.		
Others	111 ± 68	n.s.		
C				
	CSF CTRP-3 (ng/mL)		P	
BBB dysfunction				
Grade 0	10.8 ± 5.1	n.s.		
versus				
Grade 1	9.4 ± 4.2	n.s.		
Grade 2	9.6 ± 5.4	n.s.		
Grade 3	12.5 ± 8.2	n.s.		
CSF cell count/μL				
0–5 cells	10.6 ± 4.7	n.s.		
> 5 cells	10.4 ± 7.1	n.s.		

Table 2 Continued

D				
	CSF CTRP-3 (ng/mL)		CSF/serum CTRP-3 ratio × 10 ⁻³	P
Presence of oligoclonal bands				
Negative (n = 214)	10.7 ± 5.3	n.s.	112 ± 67	n.s.
Positive (n = 43)	10.0 ± 4.0	n.s.	103 ± 52	n.s.
Not available (n = 13)				

n.s., not significant; BBB, blood–brain barrier; CSF, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; SD, standard deviation.

CTRP-3 levels were measured by ELISA. (A) Mean values ± SD of serum CTRP-3 and CSF CTRP-3 concentrations are summarized for disease subgroups. (B) CTRP-3 CSF/serum ratios are shown for disease subgroups. The CTRP-3 CSF/serum ratio was calculated and is shown for disease subgroups. (C) Mean values ± SD for CTRP-3 concentrations in CSF are shown according to the degree of BBB dysfunction. The grade of blood–CSF dysfunction/patency is defined by the CSF/serum albumin ratio: grade 0: ratio < 6.5 × 10–3 for age < 40 years and < 8.0 × 10–3 for age < 60 years; grade 1: < 10.0 × 10–3; grade 2: < 10.0 × 10–3; grade 3: > 20.0 × 10–3. Total cell count was measured in CSF, and patients were divided into two subgroups (0–5 cells/μL and > 5 cells/μL). (D) Mean values ± SD for CTRP-3 concentrations in CSF and for CSF/serum CTRP-3 ratios in subgroups with (positive) and without (negative) the presence of oligoclonal bands.

*P = 0.016; †P = 0.027; ‡P = 0.006

Table 3 CTRP-3 concentrations measured in serum and CSF according to patient subgroups

	Serum CTRP-3 (ng/mL)	CSF CTRP-3 (ng/mL)
Diabetes mellitus: yes	97.0 ± 35.0	8.4 ± 3.3*
Diabetes mellitus: no	106.8 ± 36.0	10.9 ± 5.2*
Hypertension: yes	106.3 ± 37.4	9.5 ± 4.1 [†]
Hypertension: no	105.1 ± 35.0	11.3 ± 5.6 [†]
CAD: yes	97.5 ± 24.7	9.6 ± 4.0
CAD: no	105.9 ± 36.3	10.6 ± 5.1

Mean values ± SD are shown for serum and CSF CTRP-3 concentrations in patients with/without diabetes mellitus, hypertension and coronary artery disease (CAD).

*P = 0.011; †P = 0.005.

present cohorts. Both observations support data from a study conducted in 453 nondiabetic Korean subjects [15]. The reproducibility of the significant positive correlation between CTRP-3 and LDL cholesterol deserves further mechanistic investigation. In contrast, our study did not find a positive correlation between CTRP-3 and HDL cholesterol described by studies in patients suffering from coronary artery disease [16], obesity or type 2 diabetes mellitus [17,19]. These differences might be caused by

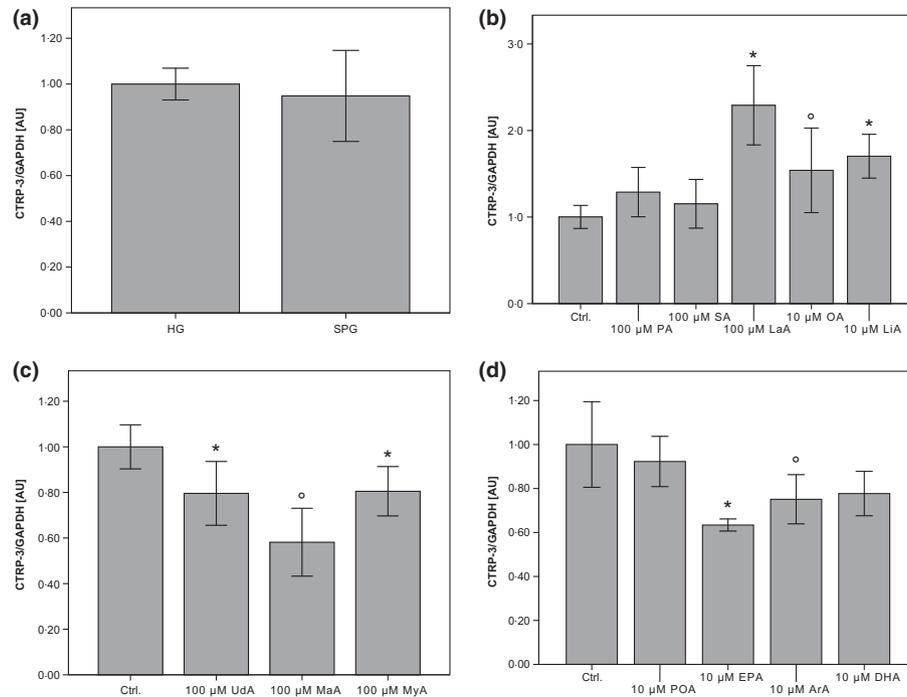


Figure 4 Regulation of CTRP-3 mRNA expression in murine 3T3-L1 adipocytes *in vitro*. (a) Effect of glucose on adipocyte CTRP-3 mRNA expression. 3T3-L1 adipocytes were incubated with high (HG: 17.5 mM; line 1) or with supra-physiological glucose concentrations (SPG: 25.0 mM; line 2) concentrations for 18 h. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. (b) Effect of nutritional and saturated fatty acids on adipocyte CTRP-3 mRNA expression. 3T3-L1 adipocytes were stimulated with 100 μM palmitic acid (PA, line 2), 100 μM stearic acid (SA, line 3), 100 μM lauric acid (LaA, line 4), 10 μM oleic acid (OA, line 5) and 10 μM linoleic acid (LiA, line 6) for 18 h; control/vehicle = line 1. * $P = 0.002$ vs. control; ° $P = 0.038$ vs. control. (c) Effect of other saturated fatty acids on adipocyte CTRP-3 mRNA expression. 3T3-L1 adipocytes were stimulated with 100 μM undecanoic acid (UdA, line 2), 100 μM margaric acid (MaA, line 3) and 100 μM myristic acid (MyA, line 4) for 18 h; control/vehicle = line 1. * $P = 0.041$ vs. control; ° $P = 0.004$ vs. control. (d) Effect of unsaturated fatty acids on adipocyte CTRP-3 mRNA expression. 3T3-L1 adipocytes were stimulated with 10 μM palmitoleic acid (POA, line 2), 10 μM eicosapentaenoic acid (EPA, line 3), 10 μM arachidonic acid (ArA, line 4) and 10 μM docosahexaenoic acid (DHA, line 5) for 18 h; control/vehicle = line 1. * $P = 0.015$ vs. control; ° $P = 0.041$ vs. control.

ethnic differences or by patient preselection. The absence of a correlation between CTRP-3 and HDL cholesterol in the present study was also independent of BMI, glucose concentrations and HbA1c levels. Thus, our findings indicate that there is no correlation between CTRP-3 and HDL cholesterol in the healthy and nondiabetic state.

In contrast to studies in obese or type 2 diabetic patients, our study in healthy individuals found that oral glucose uptake during OGTT did not impact on serum CTRP-3 concentrations: In the healthy and nondiabetic state, oral glucose uptake seems not to influence serum CTRP-3 concentrations under physiological conditions. Similarly, oral uptake of large quantities of triglycerides and fatty acids does not regulate postprandial serum CTRP-3 concentrations in healthy and younger adults. The expected and observed increase in serum triglycerides during OLTT (data not shown) is not correlated to serum CTRP-3 levels. Taken together, the carbohydrate and lipid

contents of a meal are not main regulators of postprandial serum CTRP-3 levels under physiological conditions because these remain stable and completely unaffected during OLTT and OGTT. In contrast, other adipokines such as visfatin are clearly regulated by an oral uptake of glucose or lipids [23,26].

As oral uptake of glucose was without any effect on CTRP-3 concentrations, it was interesting to study the effect of glucose on adipocyte CTRP-3 mRNA expression *in vitro*. In accordance with our *in vivo* data in humans, elevated glucose concentrations did not affect CTRP-3 mRNA expression *in vitro*. Among the fatty acids tested, the most abundant nutritional and saturated fatty acids such as palmitic and stearic acid had no effect on CTRP-3 mRNA expression, whereas the nutritional mono-unsaturated fatty acids such as oleic acid and linoleic acid upregulated CTRP-3 expression. Most interestingly, lauric acid was shown to increase CTRP-3 expression even though lauric acid represents the main lipid moiety in lipopolysaccharide

(LPS) and LPS inhibits CTRP-3 expression in adipocytes [4]. Taken together, fatty acids differentially modulate CTRP-3 mRNA expression in adipocytes with stimulatory, inhibitory and neutral effects.

The main result of the present study is the detection of stable and reproducible concentrations of CTRP-3 in CSF. To our knowledge, this is the first study providing the proof of principle that CTRP-3 is present in CSF. These results represent a basis for the future establishment of normal values for CSF CTRP-3 concentrations. Similar to serum CTRP-3 concentrations, CSF CTRP-3 concentrations are detectable over a broad range and account to ~10% of the respective serum concentrations as shown by calculating the respective CSF/serum ratios. Due to the significant and positive correlation between serum CTRP-3 levels and CSF concentrations on the one hand and due to the lack of higher CSF CTRP-3 concentrations in patients with an increased CSF cell count on the other hand, our study strongly argues for a BBB permeability of CTRP-3 and against an autochthonous production of CTRP-3 within the cerebrospinal fluid compartment.

There is no clear association of CTRP-3 levels in CSF with disease subgroups, BBB dysfunction or presence of oligoclonal bands. The pathophysiological role of higher CSF CTRP-3 concentrations in patients suffering from diabetes or hypertension remains unclear and the reproducibility of these observations needs to be verified in further studies. Possibly, an increased permeability of the BBB to CTRP-3 in patients suffering from these diseases might be the underlying cause.

Conclusions

CTR-3 is a novel adipokine that is present in human cerebrospinal fluid with a mean CSF/serum ratio of $110 \pm 64 \times 10^{-3}$. Due to its BBB permeability, its low but stable CSF concentrations and its linear correlation to the respective serum levels, CTRP-3 represents in principle a novel and putative candidate for a physiological regulator molecule affecting central nervous functions. However, at this stage, an association of CTRP-3 and BMI was not detected. Further studies will be needed to address this issue. However, CTRP-3 is not regulated postprandially by the carbohydrate or lipid fractions of orally administered test meals in the healthy state. Females have slightly higher levels of CTRP-3 when compared to males. The significant and positive correlation of CTRP-3 to LDL cholesterol levels is reproducible in several cohorts and deserves further mechanistic investigation. Whereas glucose concentrations do not influence CTRP-3 expression in adipocytes *in vitro*, fatty acids differentially modulate CTRP-3 expression. In contrast to the effectless saturated fatty acids, the mono-unsaturated fatty acids upregulate CTRP-3 mRNA expression, whereas lauric acid downregulates CTRP-3.

Acknowledgements

The previous work of I. Ober, M. Bala and S. Leszczak is highly appreciated. The work was supported in part by grants of the German Research Foundation (DFG).

Disclosure

The authors have nothing to disclose, and there is no conflict of interest.

Address

Department of Internal Medicine III, University Hospital Giessen, Klinikstrasse 33, 35392 Giessen, Germany (A. Schmid, A. Hochberg, A. Schäffler, T. Karrasch); Department of Neurology, University Hospital Giessen, Klinikstrasse 33, 35392 Giessen, Germany (M. Berghoff).

Correspondence to: Andreas Schmid, Department of Internal Medicine III, Giessen University Hospital, Klinikstraße 33, 35392 Giessen, Germany. Tel.: 0049-641-985-46012; fax: 0049-641-985-46032; e-mail: andreas.schmid@innere.med.uni-giessen.de

Received 3 August 2016; accepted 30 November 2016

References

- 1 Seldin MM, Tan SY, Wong GW. Metabolic function of the CTRP family of hormones. *Rev Endocr Metab Disord* 2014;**15**:111–23.
- 2 Schaffler A, Buechler C. CTRP family: linking immunity to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012;**23**:194–204.
- 3 Schmid A, Kopp A, Hanses F, Karrasch T, Schaffler A. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation and adipose tissue Erk-1/-2 phosphorylation in mice *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;**452**:8–13.
- 4 Schmid A, Kopp A, Hanses F, Bala M, Muller M, Schaffler A. The novel adipokine C1q/TNF-related protein-3 is expressed in human adipocytes and regulated by metabolic and infection-related parameters. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012;**120**:611–7.
- 5 Peterson JM, Wei Z, Wong GW. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output. *J Biol Chem* 2010;**285**:39691–701.
- 6 Compton SA, Cheatham B. CTRP-3: blocking a toll booth to obesity-related inflammation. *Endocrinology* 2010;**151**:5095–7.
- 7 Schmid A, Kopp A, Aslanidis C, Wabitsch M, Muller M, Schaffler A. Regulation and function of C1Q/TNF-related protein-5 (CTRP-5) in the context of adipocyte biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013;**121**:310–7.
- 8 Li D, Wu Y, Tian P, Zhang X, Wang H, Wang T *et al*. Adipokine CTRP-5 as a potential novel inflammatory biomarker in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicine* 2015;**94**:e1503.
- 9 Li X, Jiang L, Yang M, Wu YW, Sun JZ, Sun SX. CTRP3 improves the insulin sensitivity of 3T3-L1 adipocytes by inhibiting inflammation and ameliorating insulin signalling transduction. *Endokrynol Pol* 2014;**65**:252–8.

- 10 Li X, Jiang L, Yang M, Wu YW, Sun SX, Sun JZ. CTRP3 modulates the expression and secretion of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J* 2014;**61**:1153–62.
- 11 Kopp A, Bala M, Buechler C, Falk W, Gross P, Neumeier M *et al*. C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. *Endocrinology* 2010;**151**:5267–78.
- 12 Hofmann C, Chen N, Obermeier F, Paul G, Buchler C, Kopp A *et al*. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) is secreted by visceral adipose tissue and exerts antiinflammatory and antifibrotic effects in primary human colonic fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:2462–71.
- 13 Kopp A, Bala M, Weigert J, Buchler C, Neumeier M, Aslanidis C *et al*. Effects of the new adiponectin paralogous protein CTRP-3 and of LPS on cytokine release from monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. *Cytokine* 2010;**49**:51–7.
- 14 Petersen PS, Wolf RM, Lei X, Peterson JM, Wong GW. Immunomodulatory roles of CTRP3 in endotoxemia and metabolic stress. *Physiol Rep* 2016;**4**:e12735.
- 15 Choi HY, Park JW, Lee N, Hwang SY, Cho GJ, Hong HC *et al*. Effects of a combined aerobic and resistance exercise program on C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and CTRP-5 levels. *Diabetes Care* 2013;**36**:3321–7.
- 16 Choi KM, Hwang SY, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Youn BS *et al*. Implications of C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and progranulin in patients with acute coronary syndrome and stable angina pectoris. *Cardiovasc Diabetol* 2014;**13**:14.
- 17 Choi KM, Hwang SY, Hong HC, Yang SJ, Choi HY, Yoo HJ *et al*. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) concentrations in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Diabetes* 2012;**61**:2932–6.
- 18 Deng W, Li C, Zhang Y, Zhao J, Yang M, Tian M *et al*. Serum C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) levels are decreased in obesity and hypertension and are negatively correlated with parameters of insulin resistance. *Diabetol Metab Syndr* 2015;**7**:33.
- 19 Qu H, Deng M, Wang H, Wei H, Liu F, Wu J *et al*. Plasma CTRP-3 concentrations in Chinese patients with obesity and type II diabetes negatively correlate with insulin resistance. *J Clin Lipidol* 2015;**9**:289–94.
- 20 Wolf RM, Steele KE, Peterson LA, Magnuson TH, Schweitzer MA, Wong GW. Lower circulating C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) levels are associated with obesity: a cross-sectional study. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0133955.
- 21 Li X, Jiang L, Yang M, Wu Y, Sun S, Sun J. GLP-1 receptor agonist increases the expression of CTRP3, a novel adipokine, in 3T3-L1 adipocytes through PKA signal pathway. *J Endocrinol Invest* 2015;**38**:73–9.
- 22 Li X, Jiang L, Yang M, Wu YW, Sun SX, Sun JZ. Expression of CTRP3, a novel adipokine, in rats at different pathogenic stages of type 2 diabetes mellitus and the impacts of GLP-1 receptor agonist on it. *J Diabetes Res* 2014;**2014**:398518.
- 23 Bala M, Martin J, Kopp A, Hanses F, Buechler C, Schaffler A. In vivo suppression of visfatin by oral glucose uptake: evidence for a novel incretin-like effect by glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:2493–501.
- 24 Schmid A, Leszczak S, Ober I, Karrasch T, Schaffler A. Short-term and divergent regulation of FGF-19 and FGF-21 during oral lipid tolerance test but not oral glucose tolerance test. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015;**123**:88–94.
- 25 Schmid A, Leszczak S, Ober I, Schaffler A, Karrasch T. Short-term regulation of lipocalin-2 but not RBP-4 during oral lipid tolerance test and oral glucose tolerance test. *Horm Metab Res* 2016;**48**:99–105.
- 26 Karrasch T, Leszczak S, Bala M, Ober I, Martin J, Schmid A *et al*. Short-term regulation of Visfatin release in vivo by oral lipid ingestion and in vitro by fatty acid stimulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;**122**:126–34.
- 27 Schmid A, Leszczak S, Ober I, Karrasch T, Schaffler A. Short-term regulation of resistin in vivo by oral lipid ingestion and in vitro by fatty acid stimulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015;**123**:553–60.
- 28 Schmid A, Neumann H, Karrasch T, Liebisch G, Schaffler A. Bile acid metabolome after an oral lipid tolerance test by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *PLoS ONE* 2016;**11**:e0148869.
- 29 Berghoff M, Hochberg A, Schmid A, Schlegel J, Karrasch T, Kaps M *et al*. Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Invest* 2016;**46**:15–26.
- 30 Schmid A, Hochberg A, Berghoff M, Schlegel J, Karrasch T, Kaps M *et al*. Quantification and regulation of adipisin in human cerebrospinal fluid (CSF). *Clin Endocrinol* 2015;(in press).
- 31 Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975;**5**:19–27.
- 32 Zaitso H, Serrero G. Pedersen fetuin contains three adipogenic factors with distinct biochemical characteristics. *J Cell Physiol* 1990;**144**:485–91.
- 33 Bachmeier M, Loffler G. Adipogenic activities in commercial preparations of fetuin. *Horm Metab Res* 1994;**26**:92–6.
- 34 Green H, Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol* 1979;**101**:169–71.
- 35 Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974;**3**:127–33.
- 36 Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 1994;**14**:99–129.
- 37 MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995;**64**:345–73.
- 38 Kopp A, Gross P, Falk W, Bala M, Weigert J, Buechler C *et al*. Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity. *Eur J Clin Invest* 2009;**39**:924–33.
- 39 Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M *et al*. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* 2009;**126**:233–45.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. Demographic and clinical statistics of study populations.