

Regulation von  
*Adipocyte fatty acid binding protein*  
in Abhängigkeit der Nierenfunktion

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Lisa-Marie Hopf

geboren am 06.12.1988 in Barsinghausen

angefertigt an der:

Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie  
Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. habil. Mathias Faßhauer

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 26. Januar 2016

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1. Bibliographische Zusammenfassung.....	3
2. Einführung in die Thematik .....	4
2.1 Adipositas .....	4
2.2 Adipokine.....	5
2.3 Adipocyte fatty acid binding protein.....	6
2.4 Adipokine: Verbindungsglied zwischen Adipositas und Niereninsuffizienz?.....	8
2.5 AFABP und Nierenfunktion – Rationale der Publikation.....	11
3. Untersuchungen im Rahmen der Dissertation.....	12
3.1 Studienpopulation 1 (CKD) .....	12
3.2 Studienpopulation 2 (AKD).....	14
3.3 AFABP bei Nephrektomie im Rattenmodell .....	16
4. Publikation .....	17
4.1 Circulating adipocyte fatty acid binding protein is increased in chronic and acute renal dysfunction.....	12
4.2 Anhang der Publikation – <i>Supplementary data</i> .....	26
4.2.1 <i>Animal studies</i> .....	26
4.2.2 <i>Supplementary Table 1</i> .....	28
4.2.3 <i>Supplementary Figure 1</i> .....	29
5. Zusammenfassung.....	30
6. Literaturverzeichnis.....	33
A. Abkürzungsverzeichnis .....	38
B. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	39
C. Erklärung über die Vorbehaltlichkeit der Verfahrenseröffnung zur Verleihung des Titels Dr. med.....	40
D. Darstellung des wissenschaftlichen Werdeganges .....	41
E. Danksagung .....	43

# 1. Bibliographische Zusammenfassung

Lisa-Marie Hopf

Regulation von *Adipocyte fatty acid binding protein* in Abhängigkeit der Nierenfunktion

Universität Leipzig, Dissertation

43 Seiten, 77 Literaturstellen, 5 Anlagen

## Referat:

Adipositas und die damit verbundenen Folgeerkrankungen sind eine der zentralen Gesundheitsherausforderungen unserer Zeit. Dauerhafte Adipositas führt zu einer Dysregulation fettgewebseigener Peptidhormone. Diese sogenannten Adipokine stellen ein Verbindungsglied zwischen Fettgewebsakkumulation und den vielfältigen Adipositaskomplikationen des gesamten Organismus dar.

*Adipocyte fatty acid binding protein* (AFABP) wurde in den letzten Jahren als zirkulierendes Adipokin mit diabetogenen, proinflammatorischen und proarteriosklerotischen Effekten etabliert. Zu Beginn der Dissertation lagen unzureichende Erkenntnisse über die Elimination von AFABP sowie die Regulation des Adipokins bei eingeschränkter Nierenfunktion vor.

Aus diesem Grund untersucht die vorliegende Arbeit die AFABP-Regulation in Abhängigkeit von der Nierenfunktion in 532 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Studienpopulation 1) und 32 Patienten mit akuter Nierenfunktionsverminderung nach Nephrektomie (Studienpopulation 2). In beiden Kohorten stiegen die medianen AFABP-Serumkonzentrationen mit abfallender Nierenfunktion an. Zudem waren Marker der Nierenfunktion in beiden Studienpopulationen die stärksten unabhängigen Prädiktoren für zirkulierendes AFABP. Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe zur AFABP-Regulation in einem Rattenmodell der akuten Niereninsuffizienz unterstützen die klinischen Studienergebnisse.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal signifikant steigende AFABP-Serumspiegel bei chronischer und akuter Nierenfunktionsstörung, sowie bei akutem Abfall der Nierenfunktion. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass AFABP renal eliminiert wird. Inwiefern AFABP darüber hinaus in die Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz eingreift, muss in weiterführenden Studien beleuchtet werden.

## 2. Einführung in die Thematik

### 2.1 Adipositas

Im Jahr 2010 waren in Deutschland 18% der Erwachsenen adipös (*body mass index* (BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>) [1]. Zudem bildeten Übergewicht und Adipositas im Jahr 2004 weltweit den fünfthäufigsten Mortalitätsrisikofaktor [2]. Adipositas geht nicht nur mit einer erhöhten Mortalität einher, sondern bedeutet auch eine immense Lebensbeeinträchtigung der Betroffenen. Um diese zu betrachten, eignet sich das Maß der *disability-adjusted life years* (DALY). Ein DALY entspricht dabei dem Verlust eines gesunden Lebensjahres durch Krankheit, Behinderung oder vorzeitigen Tod. Übergewicht und Adipositas verursachten allein im Jahr 2004 weltweit 36 Millionen DALYs, also einen Verlust von 36 Millionen gesunden Lebensjahren [2]. Diese globalen Dimensionen machen Adipositas und die damit verbundenen Folgeerkrankungen zu einer der zentralen Gesundheitsherausforderungen unserer Zeit.

Konkret steigert Adipositas maßgeblich das Risiko an Diabetes mellitus Typ II (T2DM), Bluthochdruck, arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen [3] und chronischer Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD) [4] zu erkranken. Außerdem erhöht Adipositas deutlich das Risiko, an malignen Neubildungen wie an einem Kolon-, Nieren- oder Endometriumkarzinom zu erkranken und zu versterben [5,6]. Adipositas ist somit ein komplexes Gesundheitsproblem des gesamten Organismus.

Mit der steigenden Prävalenz von Adipositas und ihrer Begleiterkrankungen rückte auch das Fettgewebe zunehmend in das Blickfeld internationalen Forschungsinteresses. Wurde Fettgewebe früher als bloßer Energiespeicher angesehen, so unterstrich die Entdeckung des appetitzügelnden, aus Adipozyten sezernierten Peptidhormons Leptins die zusätzliche Rolle des Fettgewebes als endokrin aktives Organ [7].

Heute ist bekannt, dass das Fettgewebe neben Leptin eine Vielzahl von bioaktiven Mediatoren, sogenannte Adipokine oder Adipozytokine, sezerniert. Diese greifen in Zucker- und Lipidstoffwechsel, das Immunsystem, Entzündungsprozesse und die Blutdruckregulation ein [8]. Damit bilden Adipokine eine Verbindung zwischen der Hyperplasie und Hypertrophie des Fettgewebes im Rahmen der Adipositas einerseits und den Folgeerkrankungen der verschiedenen Organsysteme andererseits. Insbesondere das abdominale Fettgewebe ist im Vergleich zum sub-

kutanen Fettgewebe metabolisch hochaktiv [9]. Dauerhafte Adipositas führt zu einer chronischen, lokalen Inflammation des Fettgewebes. Über die Sekretion von Entzündungsmediatoren ist diese lokale Reaktion auch mit einem Anstieg systemischer Entzündungsfaktoren verbunden [10]. So entsteht eine Dysbalance im empfindlichen Gleichgewicht zwischen inflammatorischen und protektiv wirkenden Adipokinen und Adipozytokinen. Die langfristigen Folgen – insbesondere die Induktion von Insulinresistenz und arteriosklerotischen Gefäßveränderungen – tragen zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) bei Adipositas bei [11].

## 2.2 Adipokine

Der Entdeckung von Leptin, als erstem Adipokin, folgten zahlreiche weitere Substanzen mit parakriner und endokriner Wirkung. Im Folgenden werden Adiponectin, als Vertreter der protektiv auf den Metabolismus wirkenden Adipokine, sowie Chemerin, *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  und Interleukin (IL)-6 als proinflammatorische Adipokine vorgestellt.

**Adiponectin** wurde Mitte der 1990er Jahre als zweites, hauptsächlich von Adipozyten sezerniertes Adipokin identifiziert [12–15]. Im Vergleich zu vielen anderen Adipokinen zeigt Adiponectin eine gegenläufige Regulation bei Adipositas. Adipöse Patienten<sup>1</sup> weisen niedrige, normalgewichtige Patienten dagegen hohe Adiponectin-Serumwerte auf [12,16]. Niedrige Serumspiegel von Adiponectin sind außerdem ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines T2DM [17].

Adiponectin wirkt antiinflammatorisch. Diese Wirkung entsteht einerseits durch die Suppression entzündungsfördernder Mediatoren, andererseits aber auch durch die Stimulation weiterer antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 [18]. Über die Modulation TNF- $\alpha$ -vermittelter Entzündungsreaktionen des Endothels hemmt Adiponectin zudem die Invasion von Immunzellen in das Gewebe [19,20]. In Übereinstimmung damit zeigen klinische Studienergebnisse signifikant verminderte Adiponectinkonzentrationen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) [19,21]. Hohe Serumspiegel zirkulierenden Adiponectins gehen wiederum mit einem niedrigen Herzinfarkttrisiko einher [22]. In Zusammenschau dieser Befunde hat Adiponectin entzündungshemmende und antiarteriosklerotische Effekte und wirkt sich protektiv auf den Energiestoffwechsel aus.

---

<sup>1</sup> Im Folgenden schließt die Verwendung der maskulinen Form die Feminine mit ein.

Nach aktuellem Forschungsstand trägt die chronische Inflammation im Rahmen der Adipositas bedeutend zur Entstehung der metabolischen und kardiovaskulären Folgeerkrankungen bei. Proinflammatorische Botenstoffe wie **TNF- $\alpha$**  und **IL-6** stellen in diesem Prozess bedeutende Verbindungsglieder zwischen Fettgewebshyperplasie und systemischen Effekten dar. Während TNF- $\alpha$  eher parakrine und somit lokal beschränkte Effekte zugeschrieben werden, zirkuliert IL-6 in hohem Maße im systemischen Blutkreislauf [23]. Sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-6, werden vom Fettgewebe exprimiert und sezerniert und sind positiv mit Adipositas und Insulinresistenz assoziiert [23,24]. In Übereinstimmung damit, wurde in einer Studie mit 19 adipösen und 18 normalgewichtigen Kontrollpatienten eine sinkende TNF- $\alpha$ -Genexpression bei Gewichtsverlust und daraus resultierender erhöhter Insulinsensitivität gezeigt [24].

**Chemerin** gilt als Adipokin mit wichtiger Bedeutung für die Adipozytendifferenzierung [25]. Als Lockstoff von Makrophagen und dendritischen Zellen greift Chemerin entscheidend in Entzündungsprozesse ein [26]. In klinischen Studien war zirkulierendes Chemerin positiv mit Fettsäuren des metabolischen Syndroms und Entzündungsmarkern assoziiert [27,28]. Somit erscheint Chemerin als wichtiger proinflammatorischer Mediator in der Entstehung Adipositas-assoziiertes metabolischer Erkrankungen.

### 2.3 Adipocyte fatty acid binding protein (AFABP)

AFABP ist die adipozytäre Isoform der Familie der *fatty acid binding proteins*. Diese bilden eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine, die Fettsäuren und andere lipophile Substanzen binden, sie zu Effektorstrukturen transportieren und in daran anschließende Signalketten eingreifen [29]. In der Literatur ist AFABP auch unter den Bezeichnungen *fatty acid binding protein 4* sowie *adipocyte protein 2* zu finden. AFABP wurde nach Leptin und Adiponectin als drittes „echtes“ – also hauptsächlich von Adipozyten produziertes – Adipokin eingeführt. AFABP wird aber zusätzlich auch in Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert [30]. Xu *et al.* zeigten, dass AFABP nicht nur zytoplasmatisch vorkommt, sondern auch im Blutkreislauf zirkuliert [31].

Die Effekte von AFABP auf den Energiestoffwechsel wurden in zahlreichen Tier- und Humanstudien untersucht. Im Tiermodell entwickelten AFABP-*knockout*-Mäuse unter fettreicher Ernährung weder Diabetes noch Insulinresistenz, trotz einer stärkeren Gewichtszunahme im Vergleich zu Wildtypen [32]. Interessanterweise zeigen diese AFABP-*knockout*-Mäuse gleichzei-

tig eine verringerte TNF- $\alpha$ -Produktion des Fettgewebes [32]. Der synthetische AFABP-Inhibitor BMS309403 erhöht in Mäusen mit genetisch determinierter Adipositas die Insulinsensitivität [32,33]. Dieser Effekt kann allerdings nicht in Mäusen mit diätinduzierter Adipositas beobachtet werden [34]. Sowohl in Mäusen mit genetisch programmierter als auch in Tieren mit diätinduzierter Adipositas verbessert die Gabe von BMS309403 aber das Lipidprofil [33,34]. In Zusammenschau dieser Befunde hat die AFABP-Inhibition im Tiermodell insulinsensitivierende und protektive Effekte auf den Energiestoffwechsel.

Umfangreiche Untersuchungen bei Apolipoprotein E (ApoE)-*knockout*-Mäusen charakterisieren den Einfluss von AFABP auf arteriosklerotische Gefäßerkrankungen. AFABP-ApoE-*double-knockout*-Mäuse entwickeln im Vergleich zu ApoE-*knockout*-Mäusen um 66% reduzierte arteriosklerotische Läsionen in der Aorta und sind, trotz ähnlicher Lipidprofile und Insulinsensitivität, vor arteriosklerotischen Veränderungen geschützt [35]. Einen gleichsinnigen Effekt erzielt auch die Inhibition von AFABP mittels BMS309403 in ApoE-*knockout*-Mäusen [33]. Makowski *et al.* zeigten, dass auch ein auf Makrophagen beschränkter AFABP-Mangel gleichwertige antiarteriosklerotische Wirkung hat [35]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die proarteriosklerotische Wirkung von AFABP über eine gesteigerte Entzündungsreaktion vermittelt wird. Reduzierte Konzentrationen proinflammatorischer Adipokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, in AFABP-defizienten Makrophagen stützen diese These [36].

Ergebnisse zahlreicher humaner Querschnittsstudien zeigen eine positive Korrelation zirkulierender AFABP-Serumkonzentrationen mit Adipositas [31], dem metabolischen Syndrom [37,38] und KHK [39,40]. In multivariaten Analysen ist die AFABP-Serumkonzentration unabhängig und positiv mit Parametern des metabolischen Syndroms wie Blutdruck, Dyslipidämie, Taillenumfang, Nüchtern-Insulin und dem *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*, als Maß für Insulinresistenz, assoziiert [31,41]. Frauen weisen im Durchschnitt höhere AFABP-Serumwerte auf als Männer [31]. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass Frauen im Geschlechtervergleich einen höheren Körperfettanteil besitzen, welcher positiv mit zirkulierendem AFABP korreliert [31]. Über diese Erkenntnisse hinausgehend zeigen prospektive Studien, dass erhöhte AFABP-Serumspiegel mit einem erhöhten Risiko für metabolische [42,43] und kardiovaskuläre Erkrankungen [44] assoziiert sind.

Zusammenfassend weisen diese Studienergebnisse darauf hin, dass AFABP ein bedeutender, vom Fettgewebe in den Blutkreislauf sezernierter Mediator zwischen Adipositas und ihren systemischen metabolischen und vaskulären Folgeerkrankungen sein könnte [30,31].

## 2.4 Adipokine: Verbindungsglied zwischen Adipositas und chronischer Niereninsuffizienz?

Parallel zur Zunahme der Adipositaserkrankten in den letzten Jahrzehnten, stieg auch die Prävalenz der chronischer Niereninsuffizienz und daraus folgendem terminalen Nierenversagen (*end stage renal disease*, ESRD). Lag CKD in der globalen Todesursachenstatistik aus dem Jahr 1990 noch auf Rang 27, so war sie 20 Jahre später schon die 18. häufigste Todesursache [45]. CKD ist definiert als über mehr als drei Monate bestehende Struktur- oder Funktionsstörung der Nieren mit negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand [46].

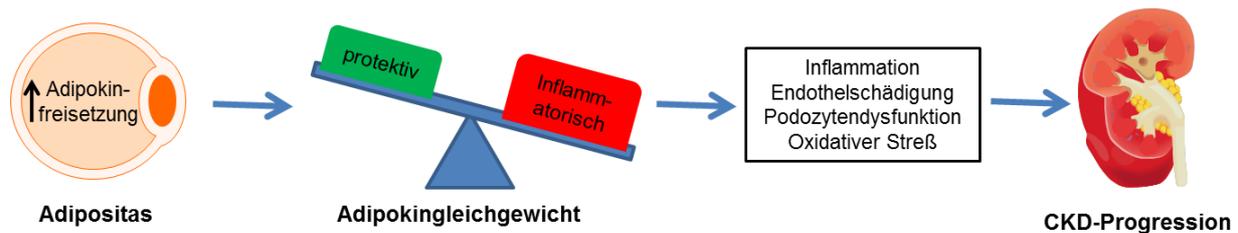
Lebenszeitlimitierender Faktor ist bei CKD nicht die eingeschränkte Nierenfunktion als solche, sondern das signifikant erhöhte Risiko an CVD zu erkranken und zu versterben [47]. Dieser Zusammenhang zeigt sich sehr deutlich in einer amerikanischen Längsschnittstudie mit 5808 Probanden. Hier war die kardiovaskuläre Mortalität für Probanden mit CKD im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden deutlich auf 32 Todesfälle/1000 Probanden/Jahr vs. 16 Todesfälle/1000 Probanden/Jahr erhöht [48]. Dieselbe Studie untersuchte auch den Einfluss verschiedener Risikofaktoren auf die kardiovaskuläre Mortalität bei CKD-Patienten. Neben traditionellen Risikofaktoren wie zum Beispiel Diabetes mellitus, systolischem Bluthochdruck und Rauchen, waren in multivariaten Analysen auch die Entzündungsmarker CRP und IL-6 signifikant mit kardiovaskulärer Mortalität assoziiert [48]. Diese Beobachtungen konnten in weiteren klinischen Studien wiederholt werden, sodass angenommen wird, dass eine chronische, subklinische Inflammationsreaktion bei CKD eine bedeutende Rolle in der Entstehung CKD-assoziiertes CVD spielt [49].

Auch dauerhafte Adipositas ist mit einem chronischen Inflammationszustand verbunden, der über die Sekretion von Adipokinen und Adipozytokinen systemische Auswirkungen hat [10]. Diese Parallele hat das Forschungsinteresse auf die Frage gerichtet, inwiefern die Dysregulation von Adipokinen eine Rolle in der Pathogenese der CKD spielt und damit auf den möglicherweise kausalen Zusammenhang von Adipositas und CKD.

Adipositas bewirkt einerseits durch ihre Begleiterkrankungen, insbesondere Bluthochdruck und T2DM, eine Nierenschädigung, andererseits wird auch ein direkter Zusammenhang zwischen Adipositas und CKD angenommen [4]. So wurde der BMI als unabhängiger Risikofaktor für ESRD identifiziert [50]. Auch in der prospektiven *Framingham Heart Study* war bei 2585 untersuchten Personen, neben T2DM und arterieller Hypertension, auch Übergewicht *per se* Risikofaktor für die Entwicklung von CKD [51]. In einer prospektiven Studie mit 3107 Probanden

war der Taillenumfang (*waist circumference*, WC) ein deutlicherer Risikofaktor für die Entwicklung von CKD als BMI und das Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang (*waist-to-hip ratio*, WHR) [52]. WC ist ein Parameter für abdominale Adipositas, das heißt die Akkumulation des metabolisch hochaktiven abdominellen Fettgewebes.

Der hypothetische Zusammenhang zwischen Adipositas, dysregulierter Adipokinsekretion und CKD wird in Abbildung 1 grafisch verdeutlicht.



**Abbildung 1:** Modell des Zusammenhangs zwischen Adipositas und chronischer Niereninsuffizienz

Zahlreiche Studien haben die Regulation von Adipokinen im Verhältnis zur Nierenfunktion betrachtet. Im Folgenden werden exemplarisch Untersuchungsergebnisse zu Leptin, Adiponec-tin, Chemerin, TNF- $\alpha$  und IL-6 vorgestellt.

Schon wenige Jahre nach der Entdeckung und Charakterisierung von Leptin, wurde begonnen, das Zusammenspiel von Adipokinen mit der renalen Funktion zu untersuchen. Sharma *et al.* zeigten 1997 in Untersuchungen der prä- und postrenalen Leptinserumwerte, dass die Nieren von gesunden Probanden 12% des zirkulierenden Leptins aus dem Blutkreislauf entfernen. Im Gegensatz dazu bleibt die Leptinserumkonzentration bei CKD-Patienten prä- und postrenal unverändert [53]. In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen sind Leptinserumspiegel in Patienten mit CKD erhöht [53,54]. In CKD-Patienten ist hohes Leptin bei sinkender glomerulärer Filtrationsrate (GFR) mit einer Inhibition der Leptinexpression assoziiert. Diese resultiert jedoch nicht in absinkenden Leptinserumspiegeln, da die chronische Inflammation bei CKD die Genexpression stimuliert. So wird der *Feedback*-Mechanismus des Leptins von der Wirkung inflammatorischer Marker überrollt und es resultiert eine Hyperleptinämie [55]. Diese entzündungsassoziierte Hyperleptinämie hat bedeutende Auswirkungen auf die Appetitregulierung und Energieverwertung und wird in diesem Rahmen auch als wichtiger Faktor für die Ausbildung kachektischer Ernährungszustände im Laufe der CKD betrachtet [56]. Weitergehende Untersuchungen erlauben darüber hinaus die Hypothese, dass Leptin Einfluss auf die Entstehung

von glomerulären Veränderungen hat, die gehäuft bei Patienten mit massiver Adipositas auftreten [57]. In Zellkulturexperimenten mit glomerulären Rattenendothelzellen steigerte Leptin das Wachstum der glomerulären Endothelzellen und die Expression des profibrogenen Wachstumsfaktors *transformic growth factor-β1* [58]. Diese Ergebnisse konnten mit *in vivo*-Rattenexperimenten der gleichen Arbeitsgruppe untermauert werden. Hier löste eine 72-stündige, intraperitoneale Leptininfusion bei männlichen Ratten gleichsinnige proliferative und profibrogene Effekte aus [58].

Auch die Regulation von Adiponectin bei renaler Dysfunktion wurde umfassend beleuchtet. In Mäusen steigt Adiponectin bei akut abfallender Nierenfunktion nach Nephrektomie an [59]. Hohe Adiponectinserumspiegel gelten als Prädiktor für eine CKD-Progression [60]. Die Untersuchungen zu Adiponectin im Zusammenhang von CVD und eingeschränkter Nierenfunktion zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Becker *et al.* beobachten eine höhere Rate vergangener und zukünftiger kardiovaskulärer Vorfälle bei niedrigen Adipokinkonzentrationen [61]. Analog berichten Zoccali *et al.* erhöhtes Serumadiponectin bei Hämodialyse und niedrige Werte bei Patienten mit neuauftretenden kardiovaskulären Ereignissen [62]. Andere Studien zeigen dahingegen eine Assoziation von hohen Adiponectinserumkonzentrationen mit dem Auftreten von CVD [63]. Ein mögliches Erklärungsmodell für diese Beobachtung ist die vermehrte Expression des protektiven Adiponectin als Schutz vor den negativen Auswirkungen von CKD auf den Organismus [63]. Über diese Erkenntnisse hinausgehend, deuten Studienergebnisse in Adiponectin-*knockout*-Mäusen auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Adiponectin und der Entstehung von Albuminurie, als früher Marker einer Nierenschädigung, hin. Sharma *et al.* zeigten, dass Adiponectin-*knockout*-Mäuse eine verstärkte Albuminurie und Schäden an den Podozytenfortsätzen entwickeln. Adiponectingabe führte zu einer rückläufigen Albuminurie und Wiederausbildung der Podozytenfortsätze in den Versuchstieren [64].

Pfau *et al.* wiesen in einer Studie mit 120 Patienten zum ersten Mal nach, dass zirkulierendes Chemerin unabhängig mit Nierenfunktionsparametern assoziiert ist [65]. In dieser Studie war Chemerin in Dialysepatienten im Vergleich zu Kontrollpatienten mehr als zweifach erhöht [65]. In Patienten mit diabetischer Nephropathie waren steigende Chemerinwerte stark mit sinkender Nierenfunktion assoziiert und nahmen mit steigender Makroalbuminurie zu [66].

Im Einklang mit den Ergebnissen für Leptin, Adiponectin und Chemerin sind auch die proinflammatorischen Adipozytokine TNF- $\alpha$  [67,68] und IL-6 [68,69] bei beeinträchtigter Nierenfunktion im Serum erhöht. Sinkende Nierenfunktion beeinträchtigt die TNF- $\alpha$ -clearance in nephrektomierten Mäusen [70]. Dabei bleibt unklar, ob proinflammatorische Adipozytokine

aufgrund sinkender Elimination bei CKD erhöht sind oder durch andere assoziierte Faktoren wie Adipositas, Volumenüberlastung oder Insulinresistenz induziert werden.

## 2.5 AFABP und Nierenfunktion – Rationale der Publikation

Wie oben dargestellt ist die Datenlage zu AFABP im Kontext metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen und die Charakterisierung anderer Adipokine wie Leptin und Adiponectin im Zusammenhang mit der Nierenfunktion umfassend. Im Gegensatz dazu gab es zu Beginn der vorliegenden Dissertation kaum Erkenntnisse über die Elimination von AFABP aus dem Organismus und die Regulation des Adipokins in Relation zur Nierenfunktion. Es wurden lediglich erhöhte AFABP Serumkonzentrationen in Patienten mit milder chronischer Niereninsuffizienz [71], bei Dialysepatienten [72,73] und in Patienten mit diabetischer Albuminurie [74] beschrieben.

Jedoch gab es zu Beginn dieser Dissertation:

- 1) Keine Studie, die das gesamte Spektrum der chronischen Nierenschädigung abdeckte,
- 2) Keine Studie mit mehr als 250 Patienten,
- 3) Keine Untersuchungen zur AFABP Regulation bei akuter Nierenfunktionsverminderung.

Aus diesem Grund untersuchte die vorliegende Arbeit die Abhängigkeit der AFABP-Serumspiegel von der Nierenfunktion in zwei Studienpopulationen:

- 1) In Studienpopulation 1 (CKD) wurde zirkulierendes AFABP in 532 Probanden mit CKD Stadium 1-5 quantifiziert.
- 2) In Studienpopulation 2 (*Acute kidney dysfunction*, AKD) wurden AFABP Serumwerte in Patienten vor und nach totaler oder partieller Nephrektomie gemessen.

Darüber hinaus wurde die Rolle der Nierenfunktion für die AFABP-Serumkonzentrationen in einem Rattenmodell untersucht. Hierzu wurden AFABP-Spiegel bei Ratten vor und nach Nephrektomie mit scheinoperierten Kontrolltieren verglichen.

Ausgehend von der Annahme, dass AFABP renal eliminiert wird, wurden folgende Hypothesen formuliert:

- 1) AFABP-Serumspiegel steigen mit progredienter chronischer Niereninsuffizienz an.
- 2) Akute Nierenfunktionsverminderung nach Nephrektomie führt zu erhöhten AFABP-Serumkonzentrationen.

### 3. Untersuchungen im Rahmen der Dissertation

In beiden humanen Studienpopulationen erfolgte die Korrelation von AFABP-Serumkonzentrationen mit klinischen und biochemischen Markern für Nierenfunktion, Glukose- und Lipidstoffwechsel, sowie Inflammation. Serumkonzentrationen von AFABP, Leptin und Adiponec-tin wurden in allen Blutproben mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) nach Herstellervorgaben quantifiziert. Für alle statistischen Analysen wurde SPSS Software 20.0 (IBM, Armonk, USA) verwendet.

#### 3.1 Studienpopulation 1 (CKD)

In Studienpopulation 1 wurde zirkulierendes AFABP bei chronischer Niereninsuffizienz unter-sucht.

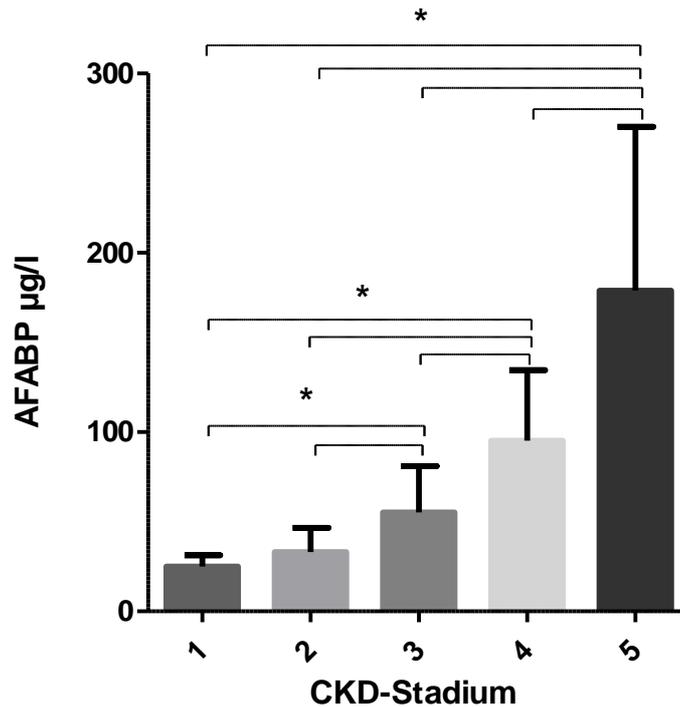
Dazu wurden 532 Patienten, 305 Männer und 227 Frauen, in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden entsprechend ihrer GFR, nach der den *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*-Leitlinien in fünf Gruppen der chronischen Niereninsuffizienz (G1-G5) eingeteilt [75].

Gruppe	Beschreibung der GFR	GFR in ml/min/1,73m <sup>2</sup>
G1	<i>Normal or high</i>	≥90
G2	<i>Mildly decreased</i>	60-89
G3	<i>Mildly to moderately decreased</i>	45-59
	<i>Moderately to severly decreased</i>	30-44
G4	<i>Severly decreased</i>	15-29
G5	<i>Kidney failure</i>	<15

**Tabelle 1:** Gruppeneinteilung nach GFR gemäß der KDIGO 2012-Leitlinie

Bei allen Probanden erfolgten eine standardisierte klinische Untersuchung, sowie eine Blutabnahme nach mindestens achtstündiger Nüchternphase. Bei Hämodialyse-Patienten fand die Blutentnahme direkt vor Beginn der Dialyse statt. Die geschätzte GFR (*estimated GFR*; eGFR) wurde bei allen Patienten mit Hilfe der *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*-Formel berechnet [76].

In Studienpopulation 1 (CKD) fanden wir signifikante Unterschiede in AFABP-Serumkonzentrationen zwischen den untersuchten Gruppen. Diese Unterschiede blieben auch nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI bestehen. Mediane AFABP-Serumspiegel stiegen mit Abnahme der renalen Funktion kontinuierlich an mit Höchstwerten in Gruppe 5 (G1: 22,0; G2: 34,6; G3: 56,7; G4: 95,2µg/l; G5: 173,9 µg/l). Zirkulierendes AFABP war bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern und bei  $\beta$ -Blocker-Therapie erhöht. Dagegen hatten Geschlecht, lipidsenkende Therapie und die Einnahme von *angiotensin converting enzyme*-Hemmern oder Angiotensinrezeptorblockern keinen Einfluss auf die AFABP-Serumspiegel. In der univariaten Korrelationsanalyse waren AFABP-Serumwerte positiv und signifikant mit Alter, WHR, BMI, *waist-to-height-ratio*, Serumkreatinin, Triglyzeriden (TG), *high sensitive* (hs) C-reaktives Protein (CRP), Leptin und Adiponectin assoziiert. Außerdem zeigte sich eine signifikante negative Korrelation von AFABP-Serumspiegeln mit dem diastolischen Blutdruck (DBP), eGFR, Nüchtern-Glukosewerten, Gesamtcholesterin, *high density lipoprotein* (HDL)- und *low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterin. In der multiplen Regressionsanalyse manifestierte sich die eGFR als stärkster unabhängiger Prädiktor für zirkulierendes AFABP nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, DBP, TG, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, hsCRP, Leptin und Adiponectin. Als weitere unabhängige und positive Prädiktoren für AFABP-Serumwerte blieben TG, hsCRP, Leptin und Adiponectin bestehen. Im Gegensatz dazu, war LDL-Cholesterin unabhängig und signifikant negativ mit AFABP-Serumspiegeln assoziiert. Alle unabhängigen Assoziationen blieben ebenfalls bestehen, wenn eGFR durch Serumkreatinin oder die eGFR-Gruppe als Parameter für die Nierenfunktion ersetzt wurde.



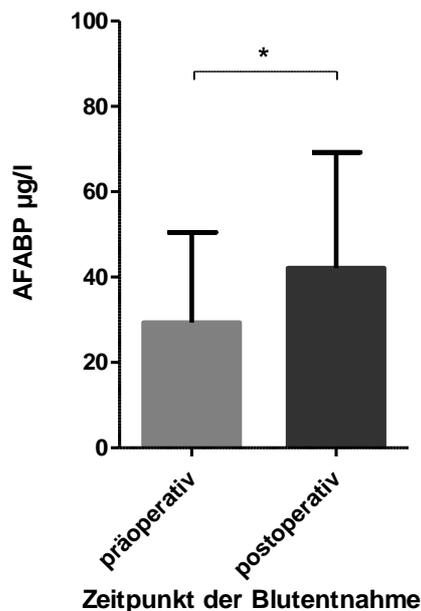
**Abbildung 2:** AFABP-Serumspiegel nach CKD-Stadium 1-5. \* bedeutet statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) nach Kruskal-Wallis-Varianzanalyse

In der Zusammenschau zeigen diese Ergebnisse steigende AFABP-Serumspiegel mit abnehmender Nierenfunktion über das gesamte Spektrum der chronischen Niereninsuffizienz. Dabei stellt die Nierenfunktion den stärksten Prädiktor für zirkulierendes AFABP dar. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Hypothese, dass AFABP renal eliminiert wird. Inwiefern AFABP-Serumspiegel bei CKD durch bloße Reduktion der renalen Eliminationsleistung steigen oder ob AFABP nicht vielmehr einen bedeutenden Einfluss auf die Progression von vaskulären, metabolischen und inflammatorischen Dysregulationen im Rahmen der CKD hat, muss in weiterführenden Studien beleuchtet werden.

### 3.2 Studienpopulation 2 (AKD)

Um zirkulierendes AFABP bei akuter Niereninsuffizienz zu untersuchen, wurden 32 Patienten, davon sechs Frauen und 26 Männer, vor elektiver totaler Nephrektomie oder Nierenteilresektion rekrutiert. Nephrektomie ist mit einem GFR-Abfall verbunden und kann damit als valides Modell für akute Nierenfunktionsschädigung angesehen werden [77]. Von allen Patienten wurden präoperativ und innerhalb von 30 Stunden postoperativ Blutproben gewonnen.

In Studienpopulation 2 (AKD) stiegen die medianen AFABP-Serumkonzentrationen von 29,3 µl/l präoperativ auf 46,3 µl/l postoperativ. Im gleichen Intervall stieg Serumkreatinin von 86 µmol/l auf 96 µmol/l und die eGFR fiel signifikant von 80,1 ml/min/1,73m<sup>2</sup> auf 63,4 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.



**Abbildung 3:** AFABP-Serumspiegel vor und nach Nephrektomie. \* bedeutet statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) nach *Wilcoxon signed-rank test*

Die relativen Veränderungen der AFABP-Serumspiegel im untersuchten Intervall, sowie relative Veränderungen der untersuchten Parameter für Nierenfunktion, Inflammation, Lipid- und Glukosestoffwechsel wurden folgendermaßen bestimmt:

$$\text{Parameter (ratio)} = \text{Parameter}_{\text{postoperativ}} / \text{Parameter}_{\text{präoperativ}}$$

Diese Veränderungen werden im Folgenden mit (*ratio*) gekennzeichnet und für die univariate Korrelationsanalyse verwendet. Univariate Korrelationsanalysen zeigten, dass AFABP (*ratio*) signifikant und positiv mit Serumkreatinin (*ratio*) assoziiert war. Im Einklang mit diesem Ergebnis korrelierte AFABP (*ratio*) signifikant und negativ mit eGFR (*ratio*). In der multivariaten Regressionsanalyse blieb allein Serumkreatinin (*ratio*) als unabhängiger Prädiktor für AFABP (*ratio*) bestehen. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht unverändert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass zirkulierendes AFABP bei akutem Abfall der Nierenfunktion nach Nephrektomie oder Nierenteilresektion signifikant ansteigt. Interessanterweise ist in dieser Studienpopulation die abfallende Nierenfunktion einziger unabhängiger Prädiktor für ansteigende AFABP-Serumspiegel postoperativ. Diese Ergebnisse untermauern die Erkenntnisse bei chronischer Niereninsuffizienz und stärken die Hypothese, dass AFABP renal eliminiert wird.

### **3.3 AFABP bei Nephrektomie im Rattenmodell**

Alle beschriebenen Tierexperimente wurden hauptverantwortlich vom Erstautor der Publikation, Dr. Thomas Ebert, geleitet, durchgeführt und ausgewertet.

Die Versuchstiere wurden in eine Kontrollgruppe (n=7) und eine Nephrektomiegruppe (n=10) randomisiert. Bei allen Ratten erfolgte 14 Tage vor der Operation eine initiale Blutentnahme. Die Kontrolltiere wurden scheinoperiert, bei allen anderen Tieren wurde eine bilaterale Nephrektomie durchgeführt. Vier, acht und 24 Stunden postoperativ fanden weitere Blutentnahmen statt. In allen Blutproben wurde AFABP, Cystatin C und Harnstoff bestimmt.

Wie erwartet waren Cystatin C und Harnstoff, als Marker des Nierenfunktionsverlustes, zu allen untersuchten Zeitpunkten in Ratten nach Nephrektomie signifikant höher als bei scheinoperierten Tieren. Im Einklang dazu waren auch AFABP-Serumspiegel in nephrektomierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant erhöht.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den oben zusammengefassten Befunden in AKD-Patienten (siehe 3.2) und untermauern die Hypothese, dass AFABP renal eliminiert wird.

## 4. Publikation

### 4.1 *Circulating adipocyte fatty acid binding protein is increased in chronic and acute renal dysfunction*

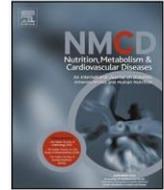
Titel: Circulating adipocyte fatty acid binding protein is increased in chronic and acute renal dysfunction

Autoren: T Ebert, **L-M Hopf** (*equally contributing*), U Wurst, A Bachmann, S Kralisch, U Lössner, M Platz, J Kratzsch, JU Stolzenburg, A Dietel, O Grisk, J Beige, M Anders, I Bast, N Klötting, M Blüher, M Stumvoll, M Fasshauer

Einreichung: 27. Oktober 2013

Annahme: 17. März 2014

Veröffentlichung: Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases  
Band 24  
Nummer 9  
September 2014  
Seiten 1027 – 1034



## Circulating adipocyte fatty acid binding protein is increased in chronic and acute renal dysfunction



T. Ebert <sup>a,b,\*</sup>, L.M. Hopf <sup>a,b,1</sup>, U. Wurst <sup>a,b</sup>, A. Bachmann <sup>a</sup>, S. Kralisch <sup>a,b</sup>, U. Lössner <sup>a,b</sup>, M. Platz <sup>a,b</sup>, J. Kratzsch <sup>c</sup>, J.U. Stolzenburg <sup>d</sup>, A. Dietel <sup>d</sup>, O. Grisk <sup>e</sup>, J. Beige <sup>f</sup>, M. Anders <sup>g</sup>, I. Bast <sup>g</sup>, N. Klötting <sup>b</sup>, M. Blüher <sup>a</sup>, M. Stumvoll <sup>a</sup>, M. Fasshauer <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> University of Leipzig, Department of Endocrinology and Nephrology, 04103 Leipzig, Germany

<sup>b</sup> Leipzig University Medical Center, IFB AdiposityDiseases, 04103 Leipzig, Germany

<sup>c</sup> University of Leipzig, Institute of Laboratory Medicine, 04103 Leipzig, Germany

<sup>d</sup> University of Leipzig, Department of Urology, 04103 Leipzig, Germany

<sup>e</sup> University of Greifswald, Department of Physiology, 17495 Greifswald, Karlsburg, Germany

<sup>f</sup> Hospital St. Georg, Division of Nephrology and KfH Renal Unit, 04129 Leipzig, Germany

<sup>g</sup> Outpatient Nephrology Care Unit, 04107 and 04178 Leipzig, Germany

Received 27 October 2013; received in revised form 14 March 2014; accepted 17 March 2014

Available online 2 April 2014

### KEYWORDS

Adipokines;  
AFABP;  
AKI;  
CKD;  
Elimination

**Abstract** *Background and aims:* The adipokine adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) is positively associated with the development of the metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. We hypothesized that AFABP also increases with deteriorating renal function.

*Methods and results:* Serum AFABP levels were quantified by enzyme linked immunosorbent assay in 532 patients with chronic kidney disease (CKD) covering the whole spectrum of estimated glomerular filtration rate (eGFR) categories from G1 to G5 (study population 1). Furthermore, AFABP was measured in 32 patients before and within 30 h after elective unilateral nephrectomy, a model of acute kidney dysfunction (AKD) (study population 2). Moreover, circulating AFABP was investigated in rats undergoing bilateral nephrectomy (BNE) as compared to sham-operated animals.

Median serum AFABP levels adjusted for age, gender, and body mass index significantly increased with increasing eGFR category (G1: 22.0 µg/l; G2: 34.6 µg/l; G3: 56.7 µg/l; G4: 95.2 µg/l; and G5: 173.9 µg/l). Furthermore, renal dysfunction remained positively associated with AFABP in multivariate analysis in this cohort. In patients undergoing unilateral nephrectomy, AFABP increased significantly after surgery (42.1 µg/l) as compared to pre-surgical values (29.3 µg/l). Furthermore, relative changes of post-to-pre-surgical AFABP levels were independently associated with relative changes of post-to-pre-surgical creatinine concentrations. After BNE in rats, AFABP increased significantly as compared to sham-operated animals.

*Conclusions:* We show that AFABP is significantly elevated in CKD and AKD patients. Furthermore, measures of renal function are associated with circulating AFABP. Moreover, animal experiments indicate that AFABP levels strongly depend on renal function.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Liebigstr. 20, 04103 Leipzig, Germany. Tel.: +49 341 9713380; fax: +49 341 9713389.

E-mail address: [thomas.ebert@medizin.uni-leipzig.de](mailto:thomas.ebert@medizin.uni-leipzig.de) (T. Ebert).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

## Introduction

Accumulating evidence suggests that altered adipokine secretion contributes to obesity-related complications, e.g. type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia, and hypertension, indicating the major role of adipose tissue as an endocrine organ. Among these adipokines, adiponectin has anti-diabetic and anti-atherogenic properties [1]. In contrast, the appetite-suppressive adipokine leptin is associated with an increased risk for cardiovascular disease [2].

Recently, adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) has been introduced as a circulating adipokine which might induce metabolic and vascular disease [3]. Thus, Furuhashi and co-workers convincingly demonstrated that pharmacological inhibition of AFABP improves insulin sensitivity and decreases atherosclerotic lesion formation in susceptible animal models [4]. In agreement with these findings, AFABP knockout mice are more insulin-sensitive [5] and less atherosclerosis-prone as compared to wild-type littermates [6]. Furthermore, two recent back-to-back studies demonstrated that AFABP is in fact secreted via unconventional mechanisms and by adipocyte-derived microvesicles despite the lack of a secretion-directed signal [7,8]. Circulating AFABP is positively associated with facets of the metabolic syndrome and risk factors of cardiovascular disease in human subjects [9]. Even more interestingly, elegant prospective studies convincingly demonstrated that elevated AFABP serum levels are associated with an increased risk to develop metabolic disease [10,11], as well as cardiovascular complications [12–14]. Most recently, Cao and co-workers convincingly demonstrated that mice receiving recombinant AFABP have increased basal and clamp hepatic glucose production and a mild glucose intolerance [15]. These studies indicate that AFABP might be a major adipocyte-secreted protein linking obesity with metabolic, as well as cardiovascular, disease states [3].

In contrast to these extensive results on AFABP in metabolic and cardiovascular disease, data on AFABP elimination are limited so far. Some studies suggest that AFABP might be eliminated by the kidney. Thus, increased AFABP serum levels have been described in patients with hemodialysis [16,17], mild chronic kidney disease (CKD) [18], and diabetic albuminuria [19]. However, several limitations concerning these previous studies need to be emphasized: No study so far 1) covered the whole spectrum of renal dysfunction ranging from estimated glomerular filtration rate (eGFR) categories G1 to G5, 2) included >250 patients, and 3) elucidated the effect of acute renal dysfunction on circulating AFABP.

To address these issues and to elucidate AFABP regulation by kidney function more comprehensively, two renal disease populations were investigated in the current study: 1) In study population 1 (CKD), circulating AFABP concentrations were quantified in 532 patients with eGFR categories G1 to G5. 2) In study population 2 (acute kidney dysfunction, AKD), AFABP levels were assessed in patients before and after partial or total nephrectomy. Furthermore, we correlated AFABP concentrations to clinical and

biochemical markers of renal function, glucose and lipid metabolism, as well as inflammation in both studies. Moreover, the impact of renal function on AFABP levels was determined in rats undergoing bilateral nephrectomy (BNE) as compared to sham-operated animals. If AFABP was – in fact – eliminated by the kidneys, we hypothesized that circulating AFABP should increase 1) with increasing eGFR category; 2) after nephrectomy; and 3) after BNE in rats as compared to sham-operated animals.

## Methods

### Human studies

#### Study population 1 (CKD)

The design of this cross-sectional study has recently been described [20]. In brief, 532 patients (men:  $n = 305$ ; women:  $n = 227$ ) were recruited by the Department of Endocrinology and Nephrology, University of Leipzig, as well as from three outpatient Nephrology Care Units (Hospital St. Georg, Division of Nephrology, KfH Renal Unit, 04129 Leipzig; outpatient Nephrology Care Units, 04107 and 04178 Leipzig). The following inclusion and exclusion criteria were applied: inclusion criteria, age >18 years, nonpregnant, and provided written informed consent; exclusion criteria, end-stage malignant diseases, acute generalized inflammation, acute infectious disease, and history of drug abuse. In all patients, eGFR was calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation as described elsewhere [21]. Patients were classified into eGFR categories G1 to G5 according to the Kidney Disease Improving Global Outcomes guidelines [22]. Of the 181 patients in eGFR category G5 in our study, 162 were on chronic hemodialysis. Body mass index (BMI) was determined as weight divided by squared height. Waist-to-hip ratio (WHR) and waist-to-height ratio (WHtR) were calculated after waist and hip circumferences, as well as height were assessed. Age of the study population ranged from 19 to 92 years and BMI from 14.3 to 49.0 kg/m<sup>2</sup>. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as previously described [23]. All blood samples were taken after an overnight fast. In all hemodialysis patients, blood was obtained just before hemodialysis started.

#### Study population 2 (AKD)

The study design has recently been described [24]. Briefly, 32 patients (men:  $n = 26$ ; women:  $n = 6$ ) were consecutively recruited before elective partial or total unilateral nephrectomy by the Department of Urology, University of Leipzig. Indications for surgery included renal carcinoma, renal shrinkage, and renal cysts. The following inclusion and exclusion criteria were applied: inclusion criteria, age between 18 and 80 years and provided written informed consent; exclusion criteria, hemodialysis, hereditary renal cysts, glomerulonephritis, and generalized inflammation. In all patients, eGFR was calculated using the CKD-EPI equation as described in Ref. [21]. Age of the study population ranged from 22 to 78 years and BMI from 18.2 to 37.0 kg/m<sup>2</sup>.

In all patients of study population 2, fasting blood samples were drawn before, as well as within 30 h after renal surgery.

Both studies were approved by the local Ethics Committee.

### Assays

Serum concentrations of AFABP (Biovendor, Brno, Czech Republic), leptin (Mediagnost, Reutlingen, Germany), adiponectin (Mediagnost, Reutlingen, Germany), and high sensitivity interleukin-6 (hsIL-6) (R&D Systems, Minneapolis, MN) were quantified in all blood samples with enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) according to the manufacturers' instructions. Serum creatinine was measured by an enzymatic method based on chinonimine dye generation as end point (Roche-Diagnostics, Mannheim, Germany). The accuracy of the creatinine results was verified by 3 monthly quality control surveys with gas chromatography/isotope dilution mass spectrometry as reference method (Reference Institute for Bioanalytics, Bonn, Germany). Fasting glucose (FG), fasting insulin (FI), triglycerides (TG), total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, and high sensitivity C reactive protein (hsCRP) were measured in a certified laboratory by standard methods.

### Statistical methods

SPSS software version 20.0 (IBM, Armonk, USA) was used for all statistical analyses in human subjects. For study population 1 (CKD), overall group differences for continuous parameters were calculated by non-parametric Kruskal–Wallis-test followed by post-hoc analysis with prior adjustment for age, gender, and BMI. Univariate correlations were assessed by non-parametric Spearman's rank correlation method. To adjust the effects of covariates and identify independent relationships, multivariate linear regression analysis was performed. Before multivariate analysis, distribution of continuous variables was tested for normality using Shapiro–Wilk-test and non-normally distributed parameters were logarithmically transformed.

For study population 2 (AKD), analysis of paired samples was performed using the Wilcoxon signed-rank test. Furthermore, relative changes (postsurgical-to-presurgical-ratios) were calculated for all laboratory parameters as follows and according to [25]:  $\text{parameter (ratio)} = \frac{\text{parameter}_{\text{postsurgery}}}{\text{parameter}_{\text{presurgery}}}$ . Univariate correlation analysis was performed by Spearman's rank correlation method using these relative changes (ratios). To identify independent associations of relative changes (ratios) in circulating AFABP, multivariate linear regression analysis was performed.

A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered as statistically significant in all analyses.

### Animal studies

The protocols used for rat experiments are summarized in the [Supplementary material](#).

## Results

### Study population 1 (CKD)

#### AFABP serum levels increase with deteriorating renal function

[Table 1](#) summarizes clinical characteristics of study population 1 (CKD) divided into the five eGFR categories G1 to G5. Median [interquartile range] serum AFABP levels were 75.5 [116.3]  $\mu\text{g/l}$  in the total sample. Circulating AFABP was significantly different between the five subgroups even after adjustment for age, gender, and BMI ( $p < 0.001$ ) ([Table 1](#)). Furthermore, AFABP serum levels increased with deteriorating renal function with highest levels seen in eGFR category G5 (173.9 [112.8]  $\mu\text{g/l}$ ) ([Table 1](#)). Circulating AFABP was higher in patients with diabetes mellitus as compared to non-diabetic subjects ( $p = 0.005$ ), as well as in subjects on antihypertensive treatment ( $p < 0.001$ ) and on  $\beta$  blocker treatment ( $p < 0.001$ ) ([Supplementary Table 1](#)) as compared to non-treated patients. Furthermore, levels of the adipokine in patients in eGFR category G5 depend on hemodialysis therapy ( $p < 0.001$ ) ([Supplementary Table 1](#)). In contrast, AFABP concentrations did not significantly depend on gender, angiotensin converting enzyme-inhibitor/angiotensin receptor blocker (ACE-I/ARB) treatment, and lipid-lowering treatment ([Supplementary Table 1](#)).

#### Univariate correlations

Serum AFABP concentrations in all patients positively and significantly correlated with age, BMI, WHR, WHtR, serum creatinine, TG, hsCRP, leptin, and adiponectin ([Table 2](#)). In contrast, AFABP was negatively and significantly associated with DBP, eGFR, FG, cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol ([Table 2](#)).

#### Multivariate regression analysis

Multiple linear regression analysis revealed that eGFR is strongly and independently associated with circulating AFABP after adjustment for age and gender, as well as DBP, TG, HDL cholesterol, LDL cholesterol, hsCRP, leptin, and adiponectin ([Table 2](#)). Furthermore, an independent and positive correlation between TG, hsCRP, leptin, and adiponectin on the one hand and AFABP serum levels on the other hand persisted after multivariate adjustment, respectively ([Table 2](#)). In contrast, LDL cholesterol remained independently and negatively associated with AFABP concentrations ([Table 2](#)). The independent associations summarized above remained virtually unchanged when creatinine or eGFR category were included in the multivariate model instead of eGFR and if antihypertensive treatment, ACE-I/ARB treatment, or  $\beta$  blocker treatment were included in the model instead of DBP (data not shown).

### Study population 2 (AKD)

#### AFABP levels increase with acute decline in renal function

Baseline characteristics of study population 2 (AKD) and laboratory parameters before and after renal surgery are

**Table 1** Baseline characteristics of the study population 1, divided into five eGFR categories. AFABP, Adipocyte fatty acid binding protein; ACE-I/ARB, Angiotensin converting enzyme-inhibitor/angiotensin receptor blocker; BMI, Body mass index; DBP, Diastolic blood pressure; eGFR, Estimated glomerular filtration rate; FG, Fasting glucose; FI, Fasting insulin; HDL, High-density lipoprotein; HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; hsCRP, High sensitivity C reactive protein; LDL, Low-density lipoprotein; SBP, Systolic blood pressure; TG, Triglycerides; Treat., Treatment; WHR, Waist-to-hip ratio; WHtR, Waist-to-height ratio; Values for median (interquartile range) or total number (percentage) are shown. Continuous parameters were adjusted for age, gender, and BMI and analyzed by Kruskal–Wallis test followed by post-hoc analysis. Numbers in superscript indicate  $p < 0.05$  as compared to eGFR category G1, G2, G3, or G4.

eGFR category	G1	G2	G3	G4	G5
<i>n</i>	57	87	133	74	181
AFABP (μg/l)	22.0 (13.8)	34.6 (20.7)	56.7 (37.5) <sup>1,2</sup>	95.2 (71.7) <sup>1,2,3</sup>	173.9 (112.8) <sup>1,2,3,4</sup>
Age (years)	54.3 (18.7)	64.8 (14.6) <sup>1</sup>	72.3 (13.7) <sup>1,2</sup>	73.0 (14.7) <sup>1,2</sup>	66.5 (21.9) <sup>1,4</sup>
Gender (m/f)	27/30	41/46	89/44	40/34	108/73
Diabetes (%)	20 (35)	35 (40)	56 (42)	25 (34)	69 (38)
Antihypertensive treat. (%)	38 (68)	72 (83)	128 (97)	72 (97)	178 (98)
ACE-I/ARB treat. (%)	33 (59)	56 (64)	112 (85)	57 (77)	129 (71)
β blocker treat. (%)	24 (43)	40 (46)	88 (67)	51 (69)	135 (75)
Lipid-lowering treat. (%)	17 (30)	40 (46)	66 (50)	37 (50)	74 (41)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.4 (5.9)	28.7 (5.8)	28.3 (5.4)	26.5 (5.4) <sup>2</sup>	26.6 (7.0) <sup>2</sup>
WHR	0.91 (0.10)	0.92 (0.12)	0.96 (0.09)	0.96 (0.10)	0.97 (0.10) <sup>1,2,3</sup>
WHtR	0.56 (0.11)	0.60 (0.13)	0.60 (0.10)	0.60 (0.10)	0.61 (0.12) <sup>1,2,3</sup>
SBP (mmHg)	129 (20)	130 (30)	135 (25)	140 (22)	130 (24) <sup>3,4</sup>
DBP (mmHg)	80 (15)	80 (20)	80 (17)	80 (19)	75 (15) <sup>2,3,4</sup>
Creatinine (μmol/l)	63 (18)	82 (24)	138 (44) <sup>1,2</sup>	214 (62) <sup>1,2,3</sup>	708 (381) <sup>1,2,3,4</sup>
eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	98.8 (11.8)	74.1 (12.8)	41.7 (14.2) <sup>1,2</sup>	23.8 (6.0) <sup>1,2,3</sup>	5.9 (4.1) <sup>1,2,3,4</sup>
FG (mmol/l)	5.3 (1.7)	5.8 (2.0)	5.8 (2.0)	5.7 (1.7)	4.9 (1.8) <sup>1,2,3</sup>
FI (pmol/l)	55.6 (52.2)	71.5 (71.8)	76.6 (95.8)	74.0 (56.8)	46.1 (71.1) <sup>3,4</sup>
HOMA-IR	2.0 (2.2)	2.5 (3.0)	2.6 (3.8)	2.7 (2.6)	1.4 (2.4) <sup>3,4</sup>
TG (mmol/l)	1.17 (0.79)	1.52 (0.92) <sup>1</sup>	1.59 (1.07) <sup>1</sup>	1.64 (1.35) <sup>1</sup>	1.63 (0.98) <sup>1</sup>
Cholesterol (mmol/l)	5.3 (1.5)	5.5 (1.4)	5.3 (1.7)	6.2 (2.4)	4.6 (1.7) <sup>1,2,3,4</sup>
HDL cholesterol (mmol/l)	1.4 (0.6)	1.3 (0.4)	1.3 (0.5)	1.4 (0.7)	1.1 (0.5) <sup>1,2,3,4</sup>
LDL cholesterol (mmol/l)	3.3 (1.4)	3.2 (1.4)	3.0 (1.4)	3.2 (1.8)	2.6 (1.4) <sup>1,2,3,4</sup>
hsCRP (mg/l)	1.8 (4.6)	2.4 (3.8)	2.8 (3.2)	3.2 (4.8)	4.5 (10.3) <sup>1,2,3,4</sup>
Leptin (μg/l)	11.4 (15.6)	17.6 (25.0)	20.6 (40.5) <sup>1,2</sup>	21.9 (40.1) <sup>1,2</sup>	21.0 (48.6) <sup>1,2,3</sup>
Adiponectin (mg/l)	6.4 (6.4)	6.7 (7.0)	9.1 (9.0) <sup>1,2</sup>	10.9 (12.6) <sup>1,2</sup>	15.5 (13.9) <sup>1,2,3</sup>

**Table 2** Univariate correlations with serum AFABP in study population 1 and multivariate regression analysis between AFABP (dependent variable) adjusted for age and gender, as well as DBP, eGFR, TG, HDL cholesterol, LDL cholesterol, hsCRP, leptin, and adiponectin. Non-normally distributed variables were logarithmically transformed prior to multivariate testing. *r*- and *p*-values, as well as standardized β-coefficients, and *p*-values are given.

	Univariate correlations		Multivariate regression analysis	
	<i>r</i>	<i>p</i>	β	<i>p</i>
Age (years)	0.099	0.022 <sup>a</sup>	0.002	0.924
Gender	–	–	–0.006	0.797
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.087	0.046 <sup>a</sup>	–	–
WHR	0.194	<0.001 <sup>a</sup>	–	–
WHtR	0.266	<0.001 <sup>a</sup>	–	–
SBP (mmHg)	–0.014	0.751	–	–
DBP (mmHg)	–0.157	<0.001 <sup>a</sup>	0.012	0.590
Creatinine (μmol/l)	0.828	<0.001 <sup>a</sup>	–	–
eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	–0.854	<0.001 <sup>a</sup>	–0.664	<0.001 <sup>b</sup>
FG (mmol/l)	–0.150	0.001 <sup>a</sup>	–	–
FI (pmol/l)	–0.005	0.915	–	–
HOMA-IR	–0.048	0.266	–	–
TG (mmol/l)	0.243	<0.001 <sup>a</sup>	0.127	<0.001 <sup>b</sup>
Cholesterol (mmol/l)	–0.213	<0.001 <sup>a</sup>	–	–
HDL cholesterol (mmol/l)	–0.310	<0.001 <sup>a</sup>	–0.015	0.609
LDL cholesterol (mmol/l)	–0.242	<0.001 <sup>a</sup>	–0.074	0.001 <sup>b</sup>
hsCRP (mg/l)	0.351	<0.001 <sup>a</sup>	0.125	<0.001 <sup>b</sup>
Leptin (μg/l)	0.341	<0.001 <sup>a</sup>	0.236	<0.001 <sup>b</sup>
Adiponectin (mg/l)	0.376	<0.001 <sup>a</sup>	0.183	<0.001 <sup>b</sup>

Abbreviations are indicated in Table 1.

<sup>a</sup> Indicates significant correlation as assessed by Spearman's correlation method.

<sup>b</sup> Indicates significant correlation in multivariate analysis.

summarized in [Table 3](#). Here, median circulating AFABP levels significantly increased from 29.3 [28.5]  $\mu\text{g/l}$  to 42.1 [48.1]  $\mu\text{g/l}$  ( $p = 0.004$ ) ([Table 3](#)). Furthermore, serum creatinine increased from 86 [33]  $\mu\text{mol/l}$  to 96 [44]  $\mu\text{mol/l}$  ( $p = 0.001$ ) and eGFR significantly dropped from 80.1 [20.4]  $\text{ml/min}/1.73 \text{ m}^2$  to 63.4 [31.9]  $\text{ml/min}/1.73 \text{ m}^2$  ( $p = 0.001$ ) ([Table 3](#)). Moreover, TG, cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, hsCRP, hsIL-6, and adiponectin were significantly altered by renal surgery ([Table 3](#)).

### Univariate correlations

Univariate correlations revealed that AFABP (ratio [postsurgical-to-presurgical]) was positively and significantly associated with creatinine (ratio) ( $p < 0.001$ ) ([Table 4](#)). Furthermore, AFABP (ratio) was negatively correlated with eGFR (ratio) ( $p < 0.001$ ) ([Table 4](#)). In contrast, AFABP (ratio) was not significantly associated with anthropometric data, as well as relative changes of other laboratory parameters ([Table 4](#)).

### Multivariate regression analysis

In multivariate regression analysis, AFABP (ratio) remained independently and negatively associated with creatinine (ratio) even after adjustment for age and gender ([Table 4](#)).

### Animal experiments

#### AFABP plasma levels increase after BNE in rats

[Figure 1](#) summarizes animal data on the adipokine AFABP, as well as the renal markers cystatin C and urea, in rats

divided into the two treatment groups 1) Sham-operated ( $n = 7$ ) and 2) BNE ( $n = 10$ ). As expected, cystatin C ([Fig. 1A](#)) and urea ([Fig. 1B](#)) were significantly higher at all postsurgical time points, i.e. 4 h, 8 h, and 24 h, in BNE rats as compared to sham-operated controls. Similarly, postsurgical AFABP concentrations at 4 h, 8 h, and 24 h were significantly higher in BNE as compared to sham-operated animals ([Fig. 1C](#)).

### Discussion

In the current study, we show for the first time that the insulin resistance-inducing and proatherogenic adipokine AFABP is significantly upregulated over increasing eGFR categories covering the whole spectrum of chronic renal dysfunction. Furthermore, we demonstrate for the first time that AFABP serum levels significantly increase in patients undergoing partial or total nephrectomy, an established model of AKD [26]. Interestingly, relative changes (postsurgical-to-presurgical-ratios) of markers for AKD including creatinine and eGFR but not inflammatory parameters, i.e. hsCRP and hsIL-6, are significantly associated with AFABP (ratio) in uni- and multivariate analysis. These data suggest that decreased renal function rather than unspecific rise in inflammatory parameters causes increased AFABP serum levels postsurgery. Moreover, increased AFABP levels in rats after BNE as compared to sham-operated animals strongly support our results obtained in patients with CKD and AKD. To the best of our knowledge, our results in CKD and AKD in humans, as well

**Table 3** Baseline characteristics of study population 2 and serum parameters before and after renal surgery. hsIL-6, High sensitivity interleukin-6. All other abbreviations are indicated in [Table 1](#). Values for median (interquartile range) or total number (percentage) are shown.

	Baseline characteristics		
<i>n</i>	32		
Age (years)	63.0 (12.8)		
Gender (m/f)	26/6		
Diabetes (%)	6 (19)		
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	26.2 (4.9)		
WHR	0.97 (0.12)		
WHtR	0.56 (0.07)		
SBP (mmHg)	130 (13)		
DBP (mmHg)	85 (10)		
Time interval between blood samplings (h)	20.8 (4.0)		
Weight of resected kidney tissue (g)	65.0 (555.8)		
	Presurgery	Postsurgery	<i>p</i>
AFABP ( $\mu\text{g/l}$ )	29.3 (28.5)	42.1 (48.1)	0.004*
Creatinine ( $\mu\text{mol/l}$ )	86 (33)	96 (44)	0.001*
eGFR ( $\text{ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$ )	80.1 (20.4)	63.4 (31.9)	0.001*
FG (mmol/l)	5.5 (1.2)	4.8 (3.6)	0.160
FI (pmol/l)	27.1 (40.6)	34.3 (42.0)	0.062
HOMA-IR	0.9 (1.4)	1.1 (2.4)	0.190
TG (mmol/l)	1.59 (0.74)	1.16 (0.51)	<0.001*
Cholesterol (mmol/l)	5.1 (1.4)	4.2 (1.0)	<0.001*
HDL cholesterol (mmol/l)	1.1 (0.5)	1.0 (0.4)	0.037*
LDL cholesterol (mmol/l)	3.4 (1.4)	2.6 (1.0)	<0.001*
hsCRP (mg/l)	2.0 (8.4)	34.9 (44.8)	<0.001*
hsIL-6 (ng/l)	1.4 (2.4)	12.0 (6.7)	<0.001*
Leptin ( $\mu\text{g/l}$ )	3.4 (5.8)	3.0 (5.8)	0.903
Adiponectin (mg/l)	5.8 (5.4)	5.0 (3.0)	<0.001*

\*indicates  $p < 0.05$  as compared to presurgical values as assessed by Wilcoxon signed-rank test.

**Table 4** Univariate correlations of relative changes in AFABP (postsurgical-to-presurgical ratio) with anthropometric data and relative changes in laboratory parameters (postsurgical-to-presurgical ratio) before and after renal surgery and multivariate regression analysis of AFABP (ratio, dependent variable) and age, gender, as well as creatinine (ratio) in all patients of study population 2. Non-normally distributed variables were logarithmically transformed prior to multivariate testing. *r*- and *p*-values, as well as standardized  $\beta$ -coefficients, and *p*-values are given.

	Univariate correlations		Multivariate regression analysis	
	<i>r</i>	<i>p</i>	$\beta$	<i>p</i>
Age (years)	0.255	0.158	0.089	0.602
Gender	–	–	–0.098	0.558
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	–0.119	0.517	–	–
WHR	0.183	0.333	–	–
WHtR	–0.029	0.881	–	–
SBP (mmHg)	0.128	0.507	–	–
DBP (mmHg)	–0.140	0.469	–	–
Time interval between blood samplings (h)	0.004	0.984	–	–
Weight of resected kidney tissue (g)	0.371	0.068	–	–
Creatinine (ratio)	0.626	<0.001 <sup>a</sup>	0.500	0.005 <sup>b</sup>
eGFR (ratio)	–0.596	<0.001 <sup>a</sup>	–	–
FG (ratio)	0.057	0.756	–	–
FI (ratio)	0.086	0.641	–	–
TG (ratio)	–0.259	0.152	–	–
Cholesterol (ratio)	0.040	0.827	–	–
HDL cholesterol (ratio)	0.200	0.272	–	–
LDL cholesterol (ratio)	0.089	0.629	–	–
hsCRP (ratio)	–0.161	0.378	–	–
hsIL-6 (ratio)	–0.302	0.093	–	–
Leptin (ratio)	0.190	0.297	–	–
Adiponectin (ratio)	0.267	0.140	–	–

Abbreviations are indicated in [Tables 1 and 3](#)

<sup>a</sup> Indicates significant correlation as assessed by Spearman's correlation method.

<sup>b</sup> Indicates significant correlation in multivariate analysis.

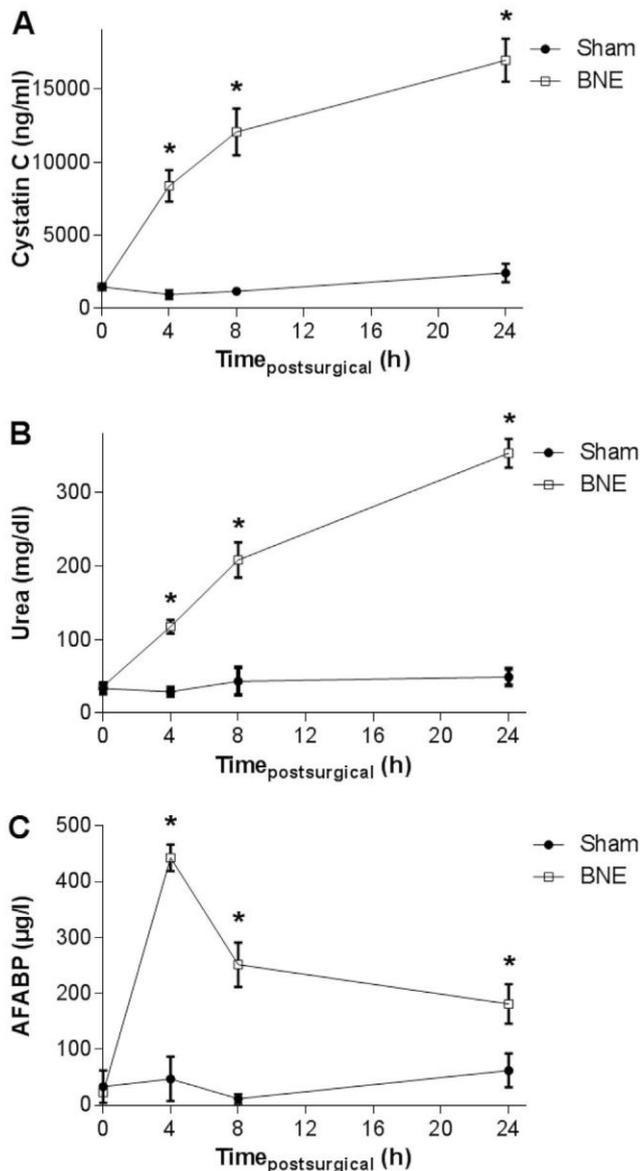
as our BNE experiments in rats, are the most comprehensive data available supporting the hypothesis that AFABP is eliminated by the kidneys.

Interestingly, circulating AFABP does not appear to be dialyzable since it is not significantly different after as compared to before hemodialysis in a subset of our patients ( $n = 31$ , data not shown). Furthermore, urinary AFABP is significantly correlated with serum AFABP ( $r = 0.774$ ;  $p < 0.001$ ), as well as with urinary albumin ( $r = 0.647$ ;  $p < 0.001$ ), in a subgroup ( $n = 125$ ) of our study population. In addition, urinary AFABP increases with deteriorating renal function as assessed by eGFR categories ([Supplementary Fig. 1](#)). These findings are in agreement with the hypothesis that urinary AFABP is a marker for chronic renal damage and increases in parallel with circulating AFABP levels. Clearly, further studies are needed to elucidate whether urinary AFABP can be used as an early marker of renal impairment as suggested for other fatty acid binding proteins [27].

The physiological significance of increased AFABP levels in CKD remains to be elucidated. It is well established that cardiovascular mortality increases with increasing CKD stage [28]. It is interesting to note in this context that AFABP has pro-atherogenic properties. Thus, *Afabp*–*ApoE* double-knockout (*Afabp*<sup>–/–</sup>–*ApoE*<sup>–/–</sup>) mice develop less atherosclerotic lesions as compared with control *ApoE*<sup>–/–</sup> animals without significant differences in the metabolic status [6]. In accordance with these findings, Furuhashi and co-workers observe a reduction of the atherosclerotic

lesion area in the en face aorta by more than 50% after AFABP inhibition with BMS309403 in *ApoE*<sup>–/–</sup> mice [4]. Taking these findings and our results into consideration, it is tempting to speculate that increased circulating AFABP in CKD might directly contribute to vascular complications of the disease. Interestingly, AFABP serum levels are independently associated with cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease in an elegant study by Furuhashi and co-workers [17]. Furthermore, AFABP correlates with long-term prognosis in patients with coronary heart disease in a well-performed study by von Eynatten and co-workers [29]. Future studies need to elucidate the pathophysiological role of circulating AFABP in renal disease.

Besides renal function, AFABP levels are independently and positively associated with facets of the metabolic syndrome including TG, hsCRP, and leptin. These results are in accordance with recent findings from various groups in which similar associations were observed for TG [9], hsCRP [30], and markers of fat mass including WHR [9,13]. However and in contrast to prior findings [9], AFABP is paradoxically independently and positively correlated with adiponectin and independently and negatively associated with LDL cholesterol in our CKD cohort. It is interesting to note in this context that recombinant AFABP does not regulate leptin and adiponectin mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes in vitro and in subcutaneous, visceral, and brown adipose tissue from mice in vivo (data not shown). Taking these results into consideration, we do not



**Figure 1** AFABP regulation after bilateral nephrectomy [BNE,  $n = 10$ ] in rats as compared to sham-operated ( $n = 7$ ) animals. Plasma levels of (A) cystatin C, (B) urea, and (C) AFABP at the different time points are depicted. \*indicates  $p < 0.05$  as compared to sham-operated animals as assessed by unpaired Student's  $t$ -test.

find support for the hypothesis that the positive independent association between AFABP on one hand and leptin and adiponectin on the other hand is due to direct AFABP-mediated upregulation of leptin and adiponectin. Concerning LDL cholesterol, our results support the hypothesis that cholesterol metabolism is significantly different in renal dysfunction and especially end-stage renal disease. Clearly, more work is needed to elucidate regulation of AFABP in renal disease patients in vivo.

Taken together, we show for the first time that AFABP is significantly elevated in CKD and AKD patients. Furthermore, measures of renal function are major determinants of AFABP serum levels. Moreover, animal experiments indicate that AFABP levels strongly depend on renal function. These results are in agreement with the

hypothesis that AFABP is eliminated by the kidneys. More work is needed to better elucidate the pathophysiological significance of increased circulating AFABP in kidney disease.

#### Declaration of interests

No conflict of interest is declared.

#### Contributor statements

T.E., L.M.H., and M.F. wrote the manuscript and researched data. U.W., A.B., M. P., J.K., J.U.S., A.D., J.B., M.A., and I.B. researched data and reviewed/edited the manuscript. U.L. researched data. S.K. reviewed/edited the manuscript. O.G. and N.K. reviewed/edited the manuscript and helped designing the animal experiments. M.B. and M.S. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript.

**Guarantor:** Dr. Thomas Ebert is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants to M.F. from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1052/1, C06 and B04), the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, + the respective projects, e.g. K7-3, K7-31, K7-58, K50B, MetaRot program), and the Deutsche Hochdruckliga e.V.. Furthermore, T.E. was supported by a junior research grant by the Medical Faculty, University of Leipzig; by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, MetaRot program), as well as by a MSD grant (MSD Stipendium 2013 Diabetologie). Moreover, N.K. was supported from the Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1052/1, C06 and B04) and the BMBF, Germany, FKZ: 01EO1001 (IFB AdiposityDiseases, project K50B).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2014.03.006>.

#### References

- [1] Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie* 2004;86:779–84.
- [2] Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, et al. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation* 2001;104:3052–6.
- [3] Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* 2013;56:10–21.
- [4] Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by

- inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007;447:959–65.
- [5] Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996;274:1377–9.
- [6] Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699–705.
- [7] Schlottmann I, Ehrhart-Bornstein M, Wabitsch M, Bornstein SR, Lamounier-Zepter V. Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes [Internet] *Int J Obes* [cited 2014 Jan 24]; Available from: <http://www.nature.com/ijo/journal/vaop/ncurrent/full/ijo2013241a.html>; 2014.
- [8] Kralisch S, Ebert T, Lossner U, Jessnitzer B, Stumvoll M, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism [Internet] *Int J Obes* [cited 2014 Jan 24]; Available from: <http://www.nature.com/ijo/journal/vaop/ncurrent/abs/ijo2013232a.html>; 2014.
- [9] Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52:405–13.
- [10] Xu A, Tso AWK, Cheung BMY, Wang Y, Wat NMS, Fong CHY, et al. Circulating adipocyte–fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome a 5-year prospective study. *Circulation* 2007;115:1537–43.
- [11] Park SE, Rhee E-J, Lee W-Y, Kim W-J, Yoo S-H, Bae J-C, et al. The role of serum adipocyte fatty acid-binding protein on the development of metabolic syndrome is independent of pro-inflammatory cytokines. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:525–32.
- [12] Yeung DCY, Xu A, Cheung CWS, Wat NMS, Yau MH, Fong CHY, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796–802.
- [13] Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Nakamura K, Usui S, Takeda K, et al. Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:44.
- [14] Bao Y, Lu Z, Zhou M, Li H, Wang Y, Gao M, et al. Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein are associated with the severity of coronary artery disease in Chinese women. *PLoS One* 2011;6:e19115.
- [15] Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, Burak MF, Mayers JR, White A, et al. Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab* 2013;17:768–78.
- [16] Sommer G, Ziegelmeier M, Bachmann A, Kralisch S, Lossner U, Kratzsch J, et al. Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) are increased in chronic haemodialysis (CD). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:901–5.
- [17] Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, Hayashi M, Nishitani T, Tanaka M, et al. Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *PLoS One* 2011;6:e27356.
- [18] Iwamoto M, Miyoshi T, Doi M, Takeda K, Kajiya M, Nosaka K, et al. Elevated serum adipocyte fatty acid-binding protein concentrations are independently associated with renal dysfunction in patients with stable angina pectoris. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:26.
- [19] Yeung DCY, Xu A, Tso AWK, Chow WS, Wat NMS, Fong CHY, et al. Circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins in relation to nephropathy staging and macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2009;32:132–4.
- [20] Richter J, Focke D, Ebert T, Kovacs P, Bachmann A, Lössner U, et al. Serum levels of the adipokine progranulin depend on renal function. *Diabetes Care* 2013;36:410–4.
- [21] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
- [22] KDIGO. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1.
- [23] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [24] Richter J, Ebert T, Stolzenburg J-U, Dietel A, Hopf L, Hindricks J, et al. Response to Comment on: Richter et al. Serum Levels of the Adipokine Progranulin Depend on Renal Function. *Diabetes Care* 2013;36:410–4. *Diabetes Care* 2013; 36: e84–e84.
- [25] Almagor M, Mintz A, Sibirsky O, Durst A. Preoperative and postoperative levels of interleukin-6 in patients with acute appendicitis: comparison between open and laparoscopic appendectomy. *Surg Endosc* 2005;19:331–3.
- [26] Argiles A, Mourad G, Basset N, Axelrud-Cavadore C, Haiech J, Mion C, et al. Acute adaptive changes to unilateral nephrectomy in humans. *Kidney Int* 1987;32:714–20.
- [27] Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts progression to nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2010;33:1320–4.
- [28] Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010;375:2073–81.
- [29] von Eynatten M, Breitling LP, Roos M, et al. Circulating adipocyte fatty acid-binding protein levels and cardiovascular morbidity and mortality in patients with coronary heart disease a 10-year prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2327–35.
- [30] Tönjes A, Kralisch S, Lössner U, et al. Metabolic and genetic predictors of circulating adipocyte fatty acid-binding protein. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:766–73.

## 4.2 Anhang der Publikation – *Supplementary data*

### 4.2.1 *Animal studies*

#### **Animals:**

For the rat studies, male Sprague Dawley rats at 2 to 3 months of age (median age: 83 d, median weight: 419 g) were used. All operations of the animals, as well as tissue harvesting after sacrifice, were performed by the same surgeon (T.E.). All rats were bred and kept at the local animal facilities in Leipzig and were maintained in a room with  $21 \pm 1$  °C on a 12:12 h light/dark cycle (6 AM/6 PM). All animals had free access to water and a normal pellet diet (V1534 from Sniff, Soest, Germany). Experiments were performed in accordance with the rules for animal care of the local government authorities and were approved by the animal care and use committee of University of Leipzig, as well as by the animal care committee of the Bezirksregierung Leipzig, Germany (Approval ID: TVV 09/13).

#### **Treatment groups/ presurgical procedures:**

Rats were randomized into one of the two treatment groups, i.e. 1) Sham-operated (n=7) and 2) Bilateral nephrectomy (BNE) (n=10). Surgical procedures were performed in accordance with a prior study by Cumin and co-workers [1]. Fourteen days before rats were operated, an initial blood sampling was performed in all animals by retroorbital puncture with prior short term anesthesia with diethyl ether (Otto Fischar, Saarbrücken, Germany). On the day of surgery, rats were weighed and anesthetized with isoflurane (Isoflurane Baxter, Unterschleißheim, Germany) and received analgetic treatment (Metamizole, Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Germany) by subcutaneous injection (110 mg/kg body weight) before surgery has started. Animals were placed in supine position on a heated surgical table maintained at 35°C. The abdomen was disinfected and shaved.

### **Surgical procedures:**

In all rats, a midline abdominal incision was made to expose the viscera. The intestine was gently moved out of the abdomen and covered with gauze soaked with isotonic saline. In sham-operated animals, both renal pedicles were exposed. In BNE rats, four Dafilon 3/0 sutures (B. Braun, Melsungen, Germany) were tied tightly around both renal pedicles and kidneys were removed by cutting the vessels distal to the ties. After surgery, i.e. sham or BNE, the intestines were restored to their normal position and the abdominal incision was closed by sutures (B. Braun, Melsungen, Germany).

### **Postoperative protocols:**

After completing the surgical procedures, animals received additional analgetic treatment (Metamizole) every 4 to 6 h by subcutaneous injection (110 mg/kg body weight). Furthermore, metamizole and glucose 20% were also added to the water bowl at the bottom of the cage. Four and 8 h after surgery, an additional blood sampling was performed by retroorbital puncture with prior short term anesthesia with isoflurane. After 24 h, rats were sacrificed by introducing 100% carbon dioxide in an euthanasia chamber. A final blood sampling was performed by cardiac puncture.

### **Measurement of AFABP, cystatin C, and urea:**

All blood samples were taken into tubes containing EDTA, immediately centrifuged, and plasma was aliquoted and stored at -80°C prior to analyses. Circulating levels of the respective markers were determined with commercial kits (AFABP: MBL International, Woburn, MA; cystatin C: R&D Systems, Minneapolis, MN; urea: Abnova, Taipei City, Taiwan).

### **Statistical analysis:**

For statistical analyses of the rat studies, Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used. Concentrations of the different markers (i.e. AFABP, cystatin C, and urea) at the

respective time points were compared between the 2 groups, i.e. sham-operated and BNE, with unpaired Student's t-test. Differences between initial (0 h) and final (24 h postsurgically) blood sampling were determined with non-parametric Wilcoxon signed-rank test.

## References

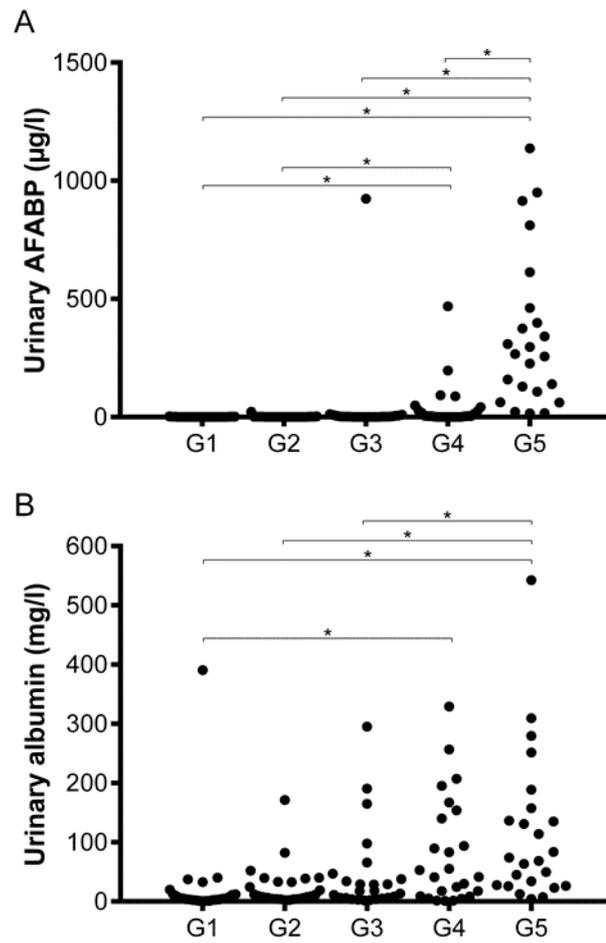
- 1 Cumin F, Baum HP, Levens N. Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J. Endocrinol.* 1997; 155: 577–585.

### 4.2.2 Supplementary Table 1

		AFABP (µg/l)		p
		Yes	No	
Clinical variables	Female gender	75.5 (116.2)	75.6 (115.3)	0.560
	Diabetes mellitus	85.4 (123.7)	65.0 (116.4)	0.005*
Treatment modalities	Hemodialysis treatment in eGFR category G5	183.3 (123.3)	113.4 (63.1)	<0.001*
	Antihypertensive treatment	83.2 (114.6)	26.4 (24.1)	<0.001*
	ACE-I/ARB treatment	75.6 (112.6)	77.7 (129.9)	0.256
	β blocker treatment	96.2 (116.7)	47.0 (83.0)	<0.001*
	Lipid-lowering treatment	76.5 (102.3)	70.5 (126.0)	0.322

**Supplementary Table 1.** Influence of clinical variables and treatment modalities on circulating AFABP in study population 1. Abbreviations are indicated in Table 1. Median (interquartile range) values for AFABP are shown. \*indicates  $p < 0.05$  between groups as analysed by Mann Whitney U test.

## 4.2.3. Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: Urinary AFABP assessed by GFR categories

## 5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Regulation von *Adipocyte fatty acid binding protein* in Abhängigkeit der Nierenfunktion

Eingereicht von: Lisa-Marie Hopf, geb. 06.12.1988

Angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie,  
Universitätsklinikum Leipzig,  
Universität Leipzig

Betreut von: Prof. Dr. med. habil. Mathias Faßhauer

Eingereicht im: Oktober 2014

In den vergangenen Jahrzehnten sind die steigende Prävalenz von Adipositas und die damit verbundenen Folgeerkrankungen zu einer der zentralen Gesundheits Herausforderungen unserer Zeit geworden. Adipositas ist mit zahlreichen metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen unterschiedlicher Organsysteme verbunden. Angesichts der komplexen und weitreichenden Folgen von Fettgewebsakkumulation auf den Organismus ist das Fettgewebe in das Interesse weltweiter Forschung gerückt. In der Folge wurde die endokrine Funktion des Fettgewebes entdeckt, insbesondere die Sekretion der Adipokine als bioaktive Mediatoren. Adipokine greifen in den Zucker- und Lipidstoffwechsel, das Immunsystem, Entzündungsprozesse und die Blutdruckregulation ein. Dauerhafte Adipositas ist über eine chronische Inflammation des Fettgewebes mit einer Dysbalance im empfindlichen Gleichgewicht der Adipokine verbunden. Langfristig trägt dieses zur Entstehung der vielfältigen Adipositaskomplikationen bei.

In diesem Kontext stellt auch die chronische Niereninsuffizienz (CKD) eine bedeutende Erkrankung dar, die eine deutliche Assoziation zu Adipositas aufweist. Der Zusammenhang von Adipositas und CKD ist Gegenstand aktueller Forschung und bei Weitem noch nicht vollständig verstanden. Adipositas bewirkt einerseits durch ihre Begleiterkrankungen eine Nierenschädigung, andererseits wird auch ein direkter Zusammenhang zwischen Adipositas und CKD angenommen.

Als entscheidendes Verbindungsglied zwischen Adipositas und CKD werden derzeit Adipokine angesehen. Die Regulation zahlreicher Adipokine, wie Leptin, Adiponectin und Chemerin, im Verhältnis zur Nierenfunktion wurde daher bereits umfassend beleuchtet. Im Gegensatz dazu gab es zu Beginn der Dissertation kaum Erkenntnisse über die Elimination von *adipocyte fatty acid binding protein* (AFABP) aus dem Organismus und die Regulation des Adipokins bei eingeschränkter Nierenfunktion.

AFABP wurde als zirkulierendes Adipokin etabliert, das über die Induktion von Insulinresistenz und arteriosklerotischen Gefäßschädigungen mit der hohen Prävalenz des metabolischen Syndroms und koronarer Herzkrankheit bei Adipositas assoziiert ist. AFABP wird vor allem von Adipozyten, darüber hinaus aber auch von Makrophagen und Endothelzellen, synthetisiert. Über die Produktion in Makrophagen greift AFABP auch in Entzündungsprozesse ein. Bisherige preliminäre Ergebnisse weisen darauf hin, dass zirkulierendes AFABP bei Nierendysfunktion erhöht ist. Jedoch gab es zu Beginn der Dissertation keine Studien mit großer statistischer Aussagekraft, keine Studien über das gesamte Spektrum chronischer Nierenschädigung und keine Daten zur Regulation von AFABP bei akuter Nierenfunktionsminderung.

Aus diesem Grund untersucht die vorliegende Arbeit die AFABP-Regulation in Abhängigkeit von der Nierenfunktion in zwei Studienpopulationen: In Studienpopulation 1 (CKD) wurde zirkulierendes AFABP in 532 Probanden mit CKD Stadium 1-5 quantifiziert. In Studienpopulation 2 (*Acute kidney dysfunction*, AKD) wurden AFABP-Serumwerte in 32 Patienten vor und nach totaler Nephrektomie oder Nierenteilresektion gemessen.

Ausgehend von der Annahme, dass AFABP renal eliminiert wird, wurden folgende Hypothesen formuliert:

- 1) AFABP-Serumspiegel steigen mit progredienter Niereninsuffizienz an.
- 2) Akute Nierenfunktionsminderung nach Nephrektomie führt zu erhöhten AFABP-Serumkonzentrationen.

In Studienpopulation 1 (CKD) fanden wir signifikante Unterschiede in AFABP-Serumkonzentrationen zwischen den untersuchten Gruppen. Diese Unterschiede blieben auch nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI bestehen. Mediane AFABP-Serumspiegel stiegen mit Abnahme der renalen Funktion kontinuierlich an mit Höchstwerten in Gruppe 5 (G1: 22,0; G2: 34,6; G3: 56,7; G4: 95,2; G5: 173,9 µg/l). In der multiplen Regressionsanalyse manifestierte sich die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) als Nierenfunktionsmarker als stärkster

unabhängiger Prädiktor für zirkulierendes AFABP nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, Entzündungsmarker und Parameter des Lipid- und Glukosestoffwechsels.

In Studienpopulation 2 (AKD) stiegen die medianen AFABP-Serumkonzentrationen von 29,3 µl/l präoperativ auf 46,3 µl/l postoperativ. Im gleichen Intervall stieg Serumkreatinin von 86 µmol/l auf 96 µmol/l und die eGFR fiel signifikant von 80,1 ml/min/1,73m<sup>2</sup> auf 63,4 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. In der multivariaten Regressionsanalyse blieb allein der Anstieg des Serumkreatinins als unabhängiger Prädiktor für den AFABP-Anstieg bestehen. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht unverändert.

Untersuchungen zur AFABP-Regulation in nephrektomierten Ratten, die durch Dr. Thomas Ebert durchgeführt wurden, unterstützen die klinischen Studienergebnisse.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal signifikant steigende AFABP-Serumspiegel bei abnehmender Nierenfunktion über das gesamte Spektrum der chronischen Niereninsuffizienz, sowie bei akutem Abfall der Nierenfunktion nach Nephrektomie oder Nierenteilresektion. Interessanterweise ist bei akuter renaler Dysfunktion die abfallende Nierenfunktion einziger unabhängiger Prädiktor für die Höhe postoperativer AFABP-Serumspiegel. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass AFABP renal eliminiert wird. Inwiefern AFABP-Serumspiegel bei CKD durch bloße Reduktion der renalen Eliminationsleistung steigen oder ob AFABP nicht vielmehr einen bedeutenden Einfluss auf die Progression von vaskulärer, metabolischer und inflammatorischer Dysregulation im Rahmen der CKD hat, muss in weiterführenden Studien beleuchtet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Deutschland, Statistisches Bundesamt. Datenreport 2013: ein Sozialbericht für die Bundesrepublik Deutschland. Bonn: Bundeszentrale für politische Bildung; 2013.
- [2] World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
- [3] Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968–77.
- [4] Ting SMS, Nair H, Ching I, Taheri S, Dasgupta I. Overweight, obesity and chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2009;112:c121–127; discussion c127.
- [5] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625–38.
- [6] Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:579–91.
- [7] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548–56.
- [8] Leal V de O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta* 2013;419:87–94.
- [9] Ruster C, Wolf G. Adipokines promote chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28 Suppl 4:iv8–14.
- [10] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *CircRes* 2005;96:939–49.
- [11] Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2013;216:T17–36.
- [12] Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *JBiolChem* 1996;271:10697–703.
- [13] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *JBiolChem* 1995;270:26746–9.
- [14] Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *BiochemBiophysResCommun* 1996;221:286–9.
- [15] Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein. *JBiochem(Tokyo)* 1996;120:803–12.
- [16] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *BiochemBiophysResCommun* 1999;257:79–83.
- [17] Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, *et al.* Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226–8.
- [18] Jia T, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P. The complex role of adiponectin in chronic kidney disease. *Biochimie* 2012;94:2150–6.

- [19] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473–6.
- [20] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, *et al.* Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102:1296–301.
- [21] Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2000;20:1595–9.
- [22] Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004;291:1730–7.
- [23] Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E745–751.
- [24] Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *JClinInvest* 1995;95:2409–15.
- [25] Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, *et al.* Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *JBiolChem* 2007;282:28175–88.
- [26] Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, *et al.* Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *JExpMed* 2003;198:977–85.
- [27] Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, *et al.* Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *EurJ Endocrinol* 2009;161:339–44.
- [28] Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, Svestak M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *BiomedPapMedFacUniv PalackyOlomoucCzechRepub* 2008;152:217–21.
- [29] Krusinova E, Pelikanova T. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes ResClinPract* 2008;82 Suppl 2:S127–S134.
- [30] Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* 2013;56:10–21.
- [31] Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52:405–13.
- [32] Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996;274:1377–9.
- [33] Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, *et al.* Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007;447:959–65.

- [34] Lan H, Cheng CC, Kowalski TJ, Pang L, Shan L, Chuang C-C, *et al.* Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Lipid Res* 2011;52:646–56.
- [35] Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, *et al.* Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *NatMed* 2001;7:699–705.
- [36] Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *JBiolChem* 2005;280:12888–95.
- [37] Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest* 2006;36:621–5.
- [38] Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, *et al.* Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150–158.
- [39] Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Nakamura K, Usui S, Takeda K, *et al.* Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:44.
- [40] Bao Y, Lu Z, Zhou M, Li H, Wang Y, Gao M, *et al.* Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein are associated with the severity of coronary artery disease in Chinese women. *PLoS ONE* 2011;6:e19115.
- [41] Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, Lazaro I, Aragonés G, Parra S, *et al.* The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147–53.
- [42] Xu A, Tso AWK, Cheung BMY, Wang Y, Wat NMS, Fong CHY, *et al.* Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007;115:1537–43.
- [43] Tso AW, Xu A, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, *et al.* Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care* 2007;30:2667–72.
- [44] Peeters W, de Kleijn DPV, Vink A, van de Weg S, Schoneveld AH, Sze SK, *et al.* Adipocyte fatty acid binding protein in atherosclerotic plaques is associated with local vulnerability and is predictive for the occurrence of adverse cardiovascular events. *Eur Heart J* 2011;32:1758–68.
- [45] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095–128.
- [46] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* n.d.
- [47] Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, *et al.* Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood

- Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003;108:2154–69.
- [48] Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, *et al.* Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *JAMA* 2005;293:1737–45.
- [49] Axelsson J, Heimbürger O, Stenvinkel P. Adipose tissue and inflammation in chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2006;151:165–74.
- [50] Hsu C, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med* 2006;144:21–8.
- [51] Fox CS, Larson MG, Leip EP, Culleton B, Wilson PWF, Levy D. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA* 2004;291:844–50.
- [52] Noori N, Hosseinpanah F, Nasiri AA, Azizi F. Comparison of Overall Obesity and Abdominal Adiposity in Predicting Chronic Kidney Disease Incidence Among Adults. *Journal of Renal Nutrition* 2009;19:228–37.
- [53] Sharma K, Considine RV, Michael B, Dunn SR, Weisberg LS, Kurnik BR, *et al.* Plasma leptin is partly cleared by the kidney and is elevated in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997;51:1980–5.
- [54] Merabet E, Dagogo-Jack S, Coyne DW, Klein S, Santiago JV, Hmiel SP, *et al.* Increased plasma leptin concentration in end-stage renal disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:847–50.
- [55] Nordfors L, Lönnqvist F, Heimbürger O, Danielsson A, Schalling M, Stenvinkel P. Low leptin gene expression and hyperleptinemia in chronic renal failure. *Kidney Int* 1998;54:1267–75.
- [56] Mak RH, Cheung W, Cone RD, Marks DL. Leptin and inflammation-associated cachexia in chronic kidney disease. *Kidney International* 2006;69:794–7.
- [57] Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D’Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int* 2001;59:1498–509.
- [58] Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, *et al.* Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]. *Kidney Int* 1999;56:860–72.
- [59] Komura N, Kihara S, Sonoda M, Maeda N, Tochino Y, Funahashi T, *et al.* Increment and impairment of adiponectin in renal failure. *Cardiovasc Res* 2010;86:471–7.
- [60] Kollerits B, Fliser D, Heid IM, Ritz E, Kronenberg F, MMKD Study Group. Gender-specific association of adiponectin as a predictor of progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *Kidney Int* 2007;71:1279–86.
- [61] Becker B, Kronenberg F, Kielstein JT, Haller H, Morath C, Ritz E, *et al.* Renal Insulin Resistance Syndrome, Adiponectin and Cardiovascular Events in Patients with Kidney Disease: The Mild and Moderate Kidney Disease Study. *JASN* 2005;16:1091–8.
- [62] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, *et al.* Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:134–41.

- [63] Drechsler C, Krane V, Winkler K, Dekker FW, Wanner C. Changes in adiponectin and the risk of sudden death, stroke, myocardial infarction, and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2009;76:567–75.
- [64] Sharma K, RamachandraRao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, *et al.* Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2008.
- [65] Pfau D, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, *et al.* Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function. *Diabetes Care* 2010;33:171–3.
- [66] Hu W, Feng P. Elevated serum chemerin concentrations are associated with renal dysfunction in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;91:159–63.
- [67] Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, *et al.* Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol* 1995;154:882–92.
- [68] Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, *et al.* Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1189–97.
- [69] Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, *et al.* Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1212–8.
- [70] Bemelmans MH, Gouma DJ, Buurman WA. Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model. *J Immunol* 1993;150:2007–17.
- [71] Iwamoto M, Miyoshi T, Doi M, Takeda K, Kajiya M, Nosaka K, *et al.* Elevated serum adipocyte fatty acid-binding protein concentrations are independently associated with renal dysfunction in patients with stable angina pectoris. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:26.
- [72] Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, Hayashi M, Nishitani T, Tanaka M, *et al.* Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *PLoS ONE* 2011;6:e27356.
- [73] Sommer G, Ziegelmeier M, Bachmann A, Kralisch S, Lossner U, Kratzsch J, *et al.* Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) are increased in chronic haemodialysis (CD). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:901–5.
- [74] Yeung DCY, Xu A, Tso AWK, Chow WS, Wat NMS, Fong CHY, *et al.* Circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins in relation to nephropathy staging and macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2009;32:132–4.
- [75] KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 2013; 3: 1. n.d.
- [76] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, *et al.* A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
- [77] Argiles A, Mourad G, Basset N, Axelrud-Cavadore C, Haiech J, Mion C, *et al.* Acute adaptive changes to unilateral nephrectomy in humans. *Kidney Int* 1987;32:714–20.

## A. Abkürzungsverzeichnis

AFABP .....	<i>Adipocyte fatty acid binding protein</i>
ApoE.....	<i>Apolipoprotein E</i>
AKD .....	<i>Acute kidney dysfunction</i>
BMI .....	<i>Body mass index</i>
CKD .....	<i>Chronic Kidney disease, Chronische Niereninsuffizienz</i>
CRP .....	<i>C-reactive protein</i>
CVD .....	<i>Cardiovascular disease</i>
DALY .....	<i>Disability adjusted life year</i>
DBP .....	<i>Diastolic blood pressure, diastolischer Blutdruck</i>
eGFR .....	<i>estimated Glomerular filtration rate, geschätzte glomeruläre Filtrationsrate</i>
ELISA .....	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESRD .....	<i>End-stage renal disease, terminales Nierenversagen</i>
GFR .....	<i>glomeruläre Filtrationsrate</i>
HDL .....	<i>High density lipoprotein</i>
hs .....	<i>High sensitivity</i>
IL .....	<i>Interleukin</i>
KDIGO.....	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
KHK .....	<i>Koronare Herzkrankheit</i>
LDL .....	<i>Low density lipoprotein</i>
<i>ratio</i> .....	<i>Verhältnisswert von postoperativen zu präoperativen Werten</i>
T2DM.....	<i>Type 2 diabetes mellitus, Diabetes mellitus Typ 2</i>
TG.....	<i>Triglyzeride</i>
TNF .....	<i>Tumor necrosis factor</i>
WC .....	<i>Waist circumference, Taillenumfang</i>
WHR .....	<i>Waist-to-hip ratio, Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang</i>

## **B. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. 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 an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## **C. Erklärung über die Vorbehaltlichkeit der Verfahrenseröffnung zur Verleihung des Titels Dr. med.**

Der erfolgreiche Abschluss des letzten Staatsexamens oder die Approbation zum Arzt ist Voraussetzung für den Abschluss des Promotionsverfahrens und damit der Verleihung des akademischen Grades. Die Zulassung zum Promotionsverfahren ist insoweit nur vorläufig und steht unter der auflösenden Bedingung des Nichtbestehens des letzten Staatsexamens oder der Approbation zum Arzt. Dieser Abschluss ersetzt nach Regelung im § 12 der Promotionsordnung das Rigorosum. Das Rigorosum ist essentieller Bestandteil und notwendig zum erfolgreichen Abschluss des Promotionsverfahrens. Entsprechend den Regelungen in § 12 wird das eröffnete Promotionsverfahren bei Nichtbeendigung des Studiums durch die Promotionskommission ohne Titelvergabe eingestellt.

Hiermit erkläre ich, dass mir dieser Sachverhalt im Rahmen der Eröffnung meines Promotionsverfahrens bekannt ist und ich im Falle des Fehlens der Voraussetzung des Abschlusses meines Promotionsverfahrens keine rechtlichen Ansprüche an eine Vergabe eines akademischen Grades oder Titels stelle.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## D. Darstellung des wissenschaftlichen Werdeganges

Anna Lisa-Marie Hopf

geboren am 06.12.1988 in Barsinghausen

### Ausbildung:

08/2001-06/2008 Hannah-Arendt-Gymnasium, Barsinghausen  
06/2008 Abitur am Hannah-Arendt-Gymnasium, Barsinghausen  
seit 10/2008 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig  
09/2010 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Gesamtnote 1,5

### Famulaturen:

2012 Abteilung für Innere Medizin, Fachbereich Infektiologie,  
Klinikum St. Georg, Leipzig  
2012 Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtsmedizin,  
Universitätskrankenhaus Nord-Norge, Tromsø  
2013 Internistische Notfallaufnahme, Robert-Koch-Krankenhaus, Gehrden  
2013 Litembo Diocesan Hospital, Tansania  
2014 Interdisziplinäre Notfallaufnahme, Diakonissenkrankenhaus, Leipzig

### Stipendien:

seit 10/2010 Studienstipendiatin der Heinrich Böll Stiftung  
10/2012-05/2013 Forschungsstipendium im Rahmen der MD Pro 1-Förderung des IFB  
Adipositaserkrankungen Leipzig

### Wissenschaftliche Publikationen:

Ebert T, Hopf LM (*equally contributing*), Wurst U, Bachmann A, Kralisch S, Lössner U, Platz M, Kratzsch J, Stolzenburg JU, Dietel A, Grisk O, Beige J, Anders M, Bast I, Klötting N, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M (2014). Circulating adipocyte fatty acid binding protein is increased in chronic and acute renal dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 24(9):1027-34

T. Ebert, H. Stepan, S. Schrey, S. Kralisch, J. Hindricks, L. Hopf, M. Platz, U. Lossner, B. Jessnitzer, S. Drewlo, M. Blüher, M. Stumvoll, M. Fasshauer (2014). Serum levels of irisin in gestational diabetes mellitus during pregnancy and after delivery. *Cytokine*, 65(2):153-8

J. Richter, T. Ebert, J.-U. Stolzenburg, A. Dietel, L. Hopf, J. Hindricks, S. Kralisch, J. Kratzsch, M. Fasshauer (2013). Letter to: Serum levels of the adipokine progranulin depend on renal function. *Diabetes Care*, 33(1):171-173

## E. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe meiner Promotion begleitet, beraten, unterstützt und bereichert haben.

Mein erster Dank geht dabei an meinen Betreuer Prof. Dr. med. Mathias Faßhauer. Ich danke ihm für seine beispiellos aufmerksame, geduldige und offene Unterstützung, die mich seit unserem ersten Gespräch beeindruckt hat. Vielen Dank für die gewissenhafte und freundliche Begleitung in vielen Stunden der wöchentlichen Arbeitsgruppentreffen, bei konstruktiver Problemlösung jeglicher Art und seine Einführung in die große Welt der Wissenschaft.

Außerdem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Faßhauer danken. Ich habe mich dort von Anfang an sehr wohl gefühlt. Dank an Frau Dr. Susan Kralisch für die Unterstützung bei allen kleinen und großen Problemen des Forschungsalltags, Frau Ulrike Löbner und Frau Beate Jessnitzer für ihre geduldigen Anleitungen und die Einarbeitung in die Laborarbeit und Dr. Thomas Ebert für die unermüdliche Einführung in die Statistik und zahlreiche Stunden gemeinsames Schreiben und Revidieren. Danke auch an meine Mitdotorandinnen Judit Richter und Janka Hindricks für die Unterstützung beim Einstieg und gute Zusammenarbeit, sowie Martin Platz und Ulrike Wurst für die Fortführung der Arbeit.

Vielen Dank allen StudienteilnehmerInnen und den teilnehmenden Kliniken für die Möglichkeit der PatientInnenrekrutierung.

Ein großer Dank geht an alle KorrekturleserInnen - an meine Mutter Elisabeth Hopf, Thomas, Nienke und Johanna - für Verständnisfragen und Rechtschreibregeln und an meinen Vater Dr. Joseph Knüver-Hopf für seine ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft.

Dem IFB Adipositaserkrankungen möchte ich für die tolle Unterstützung im Rahmen des MD Pro 1-Programmes danken.