

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Prof. Dr. med. Matthias Glanemann

**Bedeutung von bariatrischer Chirurgie im Rahmen der Adi-
positas Erkrankung für die Expression von Genen des
mTOR-Stoffwechselweges**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2022

Vorgelegt von Isabella Flora Schwörer
Geb. am 03.05.1998 in Herbolzheim

Kurzfassung

Bedeutung von bariatrischer Chirurgie im Rahmen der Adipositas Erkrankung für die Expression von Genen des mTOR-Stoffwechselweges

Das Gen mammalian/ mechanistic target of rapamycin (*mTOR*) spielt eine Schlüsselrolle in mehreren wichtigen anabolen und katabolen Stoffwechselprozessen des menschlichen Körpers. Durch die Expression von *mTOR* und seinem Downstream-Target *p70S6K* wird beispielsweise die Proteinsynthese, die Glykolyse sowie die Adipo- und Lipogenese induziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei 22 adipösen Probanden und 20 normalgewichtigen Kontrollprobanden zu verschiedenen Versuchszeitpunkten prä- und postoperativ peripheres Venenblut entnommen. Nach Entnahme von mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurde die RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Anschließend wurde die qRT-PCR durchgeführt, um die Genexpression von *mTORC1* (*mTOR* & *p70S6K*) und dem *mTORC2* zugehörigen *AKT* zu untersuchen.

Im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe zeigte sich präoperativ eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *mTOR* und *p70S6K*. Die Genexpression des *mTORC1* korrelierte positiv mit dem Gewicht und dem BMI.

Während der postoperativen Tage reduzierte sich die mRNA-Expression von *mTOR* und *p70S6K* signifikant auf ca. 40% verglichen mit dem präoperativen Zustand. In den folgenden drei und sechs Monaten blieb die Genexpression von *mTOR* und *p70S6K* signifikant reduziert und glich sich der Genexpression der normalgewichtigen Kontrollprobanden an. *AKT* als Bestandteil des *mTORC2* dient einerseits als Gegenspieler zu *mTORC1* und andererseits auch als Upstream-Target von *mTORC1* als direkter Induktor. Somit zeigte sich bei *AKT* eher ein heterogenes Bild der mRNA-Expression. 12 Monate postoperativ glich sich die mRNA-Genexpression der drei Zielgene wieder der ursprünglichen Expression an.

Postoperativ zeigte sich eine signifikante Remission des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) bei ca. 75% der an T2DM erkrankten Patienten. Alle Patienten mit T2DM und arterieller Hypertonie konnten ihre Medikation postoperativ reduzieren.

Es ist vorstellbar, dass die bariatrische Intervention die Dysregulation des mTOR-Stoffwechselweges bei Insulinresistenz durch die verringerte Genexpression von *mTORC1* aufhebt. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass im Rahmen der Adipositas und des T2DM die Proteine mTOR und p70S6K verstärkt exprimiert werden könnten, wodurch das Insulin-Rezeptor-

Substrat an der Zellmembran gehemmt wird. Dadurch könnte sich nach längerer Hemmung eine Insulinresistenz ausbilden. Durch die verringerte *mTOR* Genexpression könnte diese Dauerhemmung abgebaut und die Insulinresistenz postoperativ reduziert werden.

Der mTOR-Stoffwechselweg spielt somit eine wichtige Rolle im Verständnis der Entwicklung und Behandlung metabolischer Erkrankungen wie Adipositas und T2DM.

Abstract

Importance of bariatric surgery for the expression of genes in the metabolic pathway of mTOR in context of obesity

The mammalian/ mechanistic target of rapamycin (*mTOR*) is known as a key element of crucial regulatory pathways and a modulator of metabolic processes. Mediated by its downstream target *p70S6K*, *mTOR* induces glycolysis, protein synthesis, adipo- and lipogenesis.

In this study gene expression was monitored in peripheral blood mononuclear cells from 22 adipose patients and 20 healthy controls by qRT-PCR after isolating RNA and synthesizing cDNA. *mTORC1* (*mTOR* & *p70S6K*) and *mTORC2* (*AKT*) gene expressions were investigated by qRT-PCR in adipose patients pre- and postoperatively and in a control cohort.

Preoperatively, *mTOR* and *p70S6K* mRNA expression were revealed to be significantly elevated in adipose patients in comparison to the normal weight control cohort. *mTORC1* gene expression correlated positively with weight and BMI.

Directly after bariatric surgery in the postoperative days, a significant decrease to 40% of *mTOR* and *p70S6K* mRNA expression was monitored. In the following postoperative three and six months, gene expression from *mTORC1* remained significantly reduced and resembled the gene expression levels of the normal-weight control subjects. On the one hand, being a component of *mTORC2*, *AKT* serves as an antagonist to *mTORC1*, while on the other hand, *AKT* also serves as an upstream target of *mTORC1* as a direct inductor. Thus, *AKT* shows a rather heterogeneous picture of mRNA expression. 12 months postoperatively, gene expression at the mRNA level of the three target genes increased back to the original expression levels.

Postoperatively, patients with T2DM showed significant remission by 75%. All patients with T2DM and arterial hypertension were able to reduce their medication after bariatric surgery.

Bariatric intervention might reverse the dysregulation of the mTOR pathway in insulin resistance through decreased *mTORC1* gene expression. Obesity and T2DM significantly increase mRNA expression of *mTOR* and *p70S6K* to inhibit the insulin-receptor-substrate at the cell membrane. Long-time inhibition could lead to insulin resistance. Reduced *mTORC1* gene expression might decrease this inhibition and subsequently diminish insulin resistance postoperatively.

Therefore, the mTOR-pathway plays an important role in the context of understanding the development and therapy of metabolic diseases such as obesity and T2DM.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
Einheitsverzeichnis	XV
1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Adipositas-Erkrankung	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Ursachen	1
1.1.3 Folgeerkrankungen	2
1.2 Therapiemöglichkeiten	4
1.2.1 Konservativ	4
1.2.2 Adipositaschirurgie	4
1.2.3 Magenband	5
1.2.4 Schlauchmagen	5
1.2.5 Proximaler Roux-en-Y-Magenbypass	6
1.2.6 Omega-Loop-Magenbypass	6
1.2.7 Biliopancreatische Diversion (mit Duodenalswitch)	6
1.2.8 Perioperative Komplikationen	7
1.2.9 Ergebnisse bariatrischer Operationen im Vergleich	7
1.3 mTOR-Stoffwechselweg	9
1.3.1 Aufbau von mTOR	9
1.3.2 P70S6K	10
1.3.3 AKT	11
1.3.4 Ablauf des mTOR-Stoffwechselweges	12
1.3.5 Funktion von mTORC1	13

1.3.6	Funktion von mTORC2.....	14
1.3.7	Beeinflussende Faktoren des mTOR-Stoffwechselweges	14
1.4	Ziel der Promotion.....	16
2.	Material	17
2.1	Verwendete Kits.....	17
2.2	Verwendete Reagenzien	17
2.3	Angesetzte Puffer und Lösungen	18
2.4	Verwendete TaqMan™ Gene Expression Assays	18
2.5	Probenmaterialien	18
2.6	Verwendete Geräte	19
2.7	Verwendete Verbrauchswaren	20
2.8	Verwendete Software	20
3.	Methoden.....	21
3.1	Probandenakquise	21
3.2	Blutentnahme	21
3.3	Separation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Vollblut.....	22
3.4	Separation von Monozyten.....	24
3.5	Isolation von Ribonukleinsäure (RNA).....	25
3.6	Isolation von gDNA.....	28
3.7	Proteinseparation	29
3.8	Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	29
3.9	qRT-PCR mit TaqMan™ - Sonden	31
3.10	Statistische Auswertung	34
4.	Ergebnisse	36
4.1	Patienten- und Kontrollkohorte	36
4.1.1	Verlauf von Gewicht und BMI	36
4.1.2	Komorbiditäten und deren postoperative Veränderung.....	38
4.2	Vergleichende mRNA-Expression von <i>mTOR</i> , <i>p70S6K</i> und <i>AKT</i> im prä- und postoperativen Verlauf mit den Kontrollen.....	41
4.3	Veränderung der Genexpression einzelner Gene auf mRNA-Ebene	42

4.3.1	<i>mTOR</i> : Direkte postoperative Reduktion der <i>mTOR</i> mRNA-Expression.....	42
4.3.2	<i>p70S6K</i> : Konkordante Reduktion der <i>p70S6K</i> mRNA-Expression zur <i>mTOR</i> mRNA-Expression.....	43
4.3.3	<i>AKT</i> : heterogene mRNA-Expression	44
4.4	Vergleich des Verlaufs der mRNA-Expressionen der Zielgene	45
4.5	Korrelation der postoperativen klinischen Parameter mit der mRNA-Expression....	45
4.6	Vergleich der Adipositaspatienten mit und ohne T2DM in Bezug auf die <i>mTOR</i> mRNA-Expression	47
4.7	Vergleich der <i>mTOR</i> mRNA-Expression mit den durchgeführten bariatrischen operativen Verfahren	48
5.	Diskussion.....	49
5.1	Pathologischer Zustand des mTOR-Stoffwechselweges durch Übergewicht.....	49
5.1.1	Einfluss von Insulin	52
5.1.2	Einfluss von Aminosäuren	53
5.1.3	Einfluss des Fettgewebes	54
5.1.4	Inhomogene Reaktion des mTORC2 auf Übergewicht und T2DM.....	54
5.2	Veränderung der <i>mTOR</i> mRNA-Expression durch Crash-Diät	55
5.3	Signifikante postoperative Veränderungen des mTOR-Stoffwechselweg	56
5.3.1	Frühe postoperative Reaktion	56
5.3.2	Späte postoperative Reaktion	58
5.3.3	Langfristige Veränderung des Metabolismus nach bariatrischer Intervention ..	60
5.4	Fazit und Ausblick	62
	Literaturverzeichnis	XIII
	Anhang.....	XXVIII
	Publikationen.....	XLI
	Danksagung	XLII
	Lebenslauf.....	XLIII

*In der folgenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet, jedoch werden alle Geschlechter angesprochen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenstellung adipositasbegünstigender Faktoren	2
Abbildung 2: Signalweg des mTOR-Stoffwechsels	12
Abbildung 3: Prinzip der PBMC-Isolation mithilfe von Biocoll.....	23
Abbildung 4: Prinzip der TaqMan-Sonden	32
Abbildung 5: BMI und Gewichtsverlauf der Probanden.....	36
Abbildung 6: Postoperative BMI-Reduktion	37
Abbildung 7: Postoperativer EWL-Verlauf.....	38
Abbildung 8: Verteilung der Komorbiditäten bei Adipositaspatienten	39
Abbildung 9: Untersuchte Komorbiditäten im Adipositaskollektiv	40
Abbildung 10: Anzahl an T2DM-Patienten im Verlauf	40
Abbildung 11: Vergleichende mRNA-Expression von <i>mTOR</i> , <i>p70S6K</i> und <i>AKT</i> mit den Kontrollen.....	41
Abbildung 12: <i>mTOR</i> mRNA-Expression: Vergleich mit PräOP	42
Abbildung 13: <i>mTOR</i> mRNA-Expression: Vergleich mit VCD	43
Abbildung 14: <i>p70S6K</i> mRNA-Expression: Vergleich mit PräOP.....	44
Abbildung 15: <i>AKT</i> mRNA-Expression: Vergleich mit PräOP.....	44
Abbildung 16: Vergleich der mRNA-Expressionen von <i>mTOR</i> , <i>p70S6K</i> und <i>AKT</i> mit VCD ..	45
Abbildung 17: Korrelation der <i>mTOR</i> mRNA-Expression mit dem Gewicht der Probanden und Kontrollen.....	46
Abbildung 18: Korrelation der <i>p70S6K</i> mRNA-Expression mit dem Gewicht der Probanden und Kontrollen.....	46
Abbildung 19: mTOR mRNA-Expression bei T2DM-Patienten und Nicht-Diabetikern im Vergleich zu VCD.....	47
Abbildung 20: mTOR mRNA-Expression bei SG und RYGB im Vergleich zu VCD.....	48
Abbildung 21: Vom physiologischen zum pathologischen Zustand des mTOR- Stoffwechselweges bei Adipositas und T2DM	51
Abbildung 22: Magenband (LAGB).....	XXVIII
Abbildung 23: Schlauchmagen (SG).....	XXVIII
Abbildung 24: Proximaler Roux-en-Y-Magenbypass (pRYGB)	XXVIII
Abbildung 25: Omega-Loop-Magenbypass.....	XXVIII
Abbildung 26: Biliopancreatische Diversion nach Scopinaro (BPD).....	XXIX
Abbildung 27: Biliopancreatische Diversion mit Duodenalswitch (BPD-DS).....	XXIX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation des Übergewichts nach Body-Mass-Index.....	1
Tabelle 2: Verwendete Kits mit Herstellerangabe und Verwendungszweck	17
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe	17
Tabelle 4: Angesetzte Puffer und Lösungen mit deren Zusammensetzung	18
Tabelle 5: Verwendete Gene Expression Assays	18
Tabelle 6: Verwendete Blutproben.....	18
Tabelle 7: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe	19
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchswaren mit Herstellerangabe	20
Tabelle 9: Verwendete Software mit Herstellerangabe	20
Tabelle 10: Zeitpunkte der Blutabnahmen	22
Tabelle 11: Ablauf der cDNA-Synthese (Thermocycler).....	30
Tabelle 12: Zusammensetzung des Master Mix-Ansatzes für eine Probe der qRT-PCR	33
Tabelle 13: Zusammensetzung der Vorverdünnungen für die Standardreihe	33
Tabelle 14: Pipettierschema für Standardreihe	34
Tabelle 15: Programmierung des 7500 Real-Time PCR Systems zur TaqMan qRT-PCR	34
Tabelle 16: Festlegung der Signifikanz.....	35
Tabelle 17: Übersicht der Adipositasprobanden	XXXVIII
Tabelle 18: Übersicht der Kontrollkohorte.....	XL

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

-/-	Knockout
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
aH	Arterielle Hypertonie
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK (β)	AMP-activated protein kinase (β)
AoD	Assay on Demand
ATF4	Activating transcription factor 4
ATG13	Autophagy-related protein 13
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BE	Elution Buffer (Eluationspuffer)
BES	Binge-Eating-Störung
BMI	Body-Mass-Index
BPD (-DS)	Biliopancreatische Diversion (mit Duodenalswitch)
CAD	Carbamoylphosphate synthetase 2, Aspartate trans-carbamoylase & Dihydroorotase
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CREM	cAMP responsive element regulator
CXR	Carboxy-XRhodamin
DAG	Deutsche Adipositas Gesellschaft e.V.

DAG	Diacylglycerol
Deptor	DEP domain containing mTOR interacting protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF2K	Eukaryotic elongation factor 2 kinase
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF -4B/ -4E	Eukaryotic translation initiation factor -4B/ -4E
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER α	Estrogen receptor α
EWL	Excess Weight Loss (Gewichtsverlust)
FoxO1/3a	Forkhead box protein O1
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
GLUT	Glukosetransporter
Grb10	Growth factor receptor-bound protein 10
GS	Glykogensynthese
GSK3(b)	Glycogen synthase kinase 3(b)
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	High-density Lipoprotein
HFD	High-fat-diet
HIF1 α	Transcription factor hypoxia inducible factor 1 α
HWS	Halswirbelsäule
IDF	International Diabetes Federation
IR	Insulinrezeptor

IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
LAGB	Laparoscopic adjustable gastric banding (Magenband)
LWS	Lendenwirbelsäule
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
Mdm2-Protein	Murine double minute 2-Protein
miR-496	MicroRNA-496
miRNA	MicroRNA
mLST8	Mammalian lethal with Sec13 protein 8
MNK	Monats-Nachkontrolle
mRNA	MessengerRNA
MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2
mTOR	Mammalian/ mechanistic target of rapamycin
mTORC1/2	mTOR Komplex 1/2
MW	Mittelwert (Arithmetisches Mittel)
NAFLD	Nicht-Alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-Alkoholische Steatohepatitis
NCBP1	Nuclear cap-binding protein subunit 1
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug (Nichtsteroidale Entzündungshemmer)
OHS	Obesitas-Hypoventilations-Syndrom
OLGB	Omega-Loop-Gastric Banding (Omega-Loop-Magenbypass)
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
P70S6K	70kDa ribosomal protein S6 kinase
P85S6K	85kDa ribosomal protein S6 kinase
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3K-R1	Phosphatidylinositol-3-Kinase regulatorische Einheit 1
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PK	Proteinkinase
PKC	Proteinkinasen vom Typ C
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
pRYGB/ RYGB	Proximal Roux-en-Y gastric bypass (Proximaler Roux-en-Y-Magenbypass)
PSMB6	Proteasome subunit beta type-6
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
Q	Quencher
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
Qty	Quantity
R	Reporter
Rag	Ras-related GTP-binding protein
Raptor	Regulatory protein associated with mTOR
Ras	Rat sarcoma (Protoonkogen)
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rho	Ras homologue

Rictor	Rapamycin insensitive companion of mTOR
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitation-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S6K1/2- Proteine	Ribosomal protein S6 kinase 1/2
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard error of mean (Standardfehler des Mittelwerts)
Ser	Serin
SG	Sleeve gastrectomy (Schlauchmagen)
SKAR	S6K1 Aly/REF-like target
SOS-Studie	Swedish Obese Subjects intervention study
SREBP	Sterol responsive/ regulatory element binding protein
STD	Standard
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TF	Transkriptionsfaktor
TG	Triglyzerid
Thr	Threonin
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
tRNA	Transfer-RNA
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
ULK1	Unc-51-like autophagy-activating kinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
UVRAG	UV Radiation Resistance Associated Gene Protein
VCD	Vor der Crash-Diät

Einheitsverzeichnis

Einheiten

° C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Chr	Charrière
cm	Zentimeter
dl	Deziliter
g	Gravitationskraft
h	Stunde
kcal	Kilokalorien
kcal/d	Kilokalorien/Tag
kg	Kilogramm
m	Meter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ng	Nanogramm
s	Sekunden
S	Sedimentationskoeffizient

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Adipositas-Erkrankung

1.1.1 Überblick

Adipositas definiert sich über eine starke Vermehrung der Fettmasse über das Normalmaß hinaus, in Kombination mit den daraus resultierenden Folgeerkrankungen des Körpers. Laut WHO spricht man ab einem Body-Mass-Index (BMI) $\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$ von Adipositas (Branca 2007). Die weitere Klassifikation ist Tabelle 1 zu entnehmen (bezogen auf erwachsene Europäer). Die Prävalenz ist in der westlichen Welt im Verlauf des 21. Jahrhunderts stark angestiegen (Branca 2007). Etwa 67% der Männer und 53% der Frauen sind übergewichtig, ca. 18% sind adipös. Vor allem die jüngeren Altersgruppen (18-29 Jahre) zeigen einen deutlichen Anstieg der Erkrankung (Schienkiewitz et al. 2017).

Tabelle 1: Klassifikation des Übergewichts nach Body-Mass-Index

Quelle: WHO (2000)

Klassifikation	BMI (kg/m ²)
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht/ Präadipositas	25,0-29,9
Adipositas I°	30,0-34,9
Adipositas II°	35,0-39,9
Adipositas III°	$\geq 40,0$

1.1.2 Ursachen

Adipositas liegt ein gestörtes Energiegleichgewicht mit Überwiegen der Energiezufuhr durch Nahrung bei unzureichendem Energieverbrauch zu Grunde. Die Ursachen von Adipositas sind multifaktoriell (Abbildung 1), sodass sie in ihrer Gesamtheit zu einer Störung der ausgewogenen Energiebilanz führen (Ordemann und Elbelt 2017).

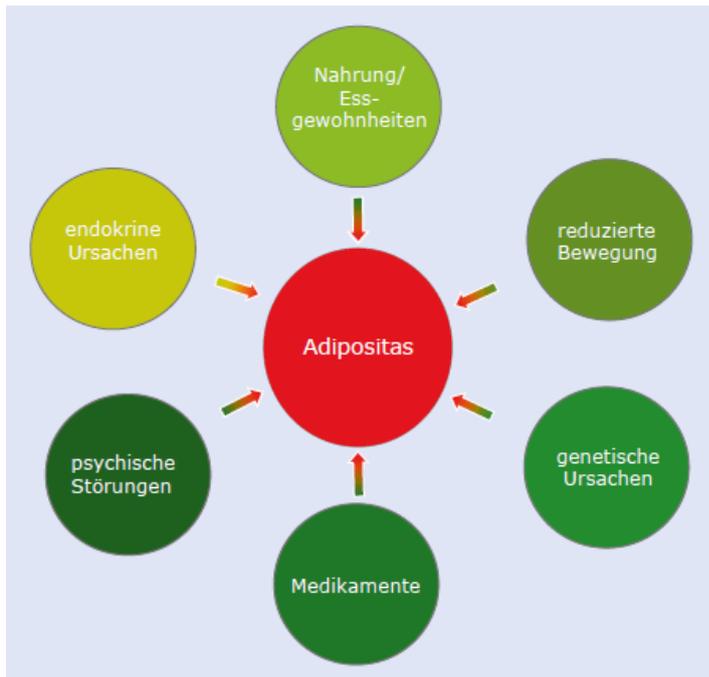


Abbildung 1: Zusammenstellung adipositasbegünstigender Faktoren

Quelle: Ordemann und Elbelt (2017)

1.1.3 Folgeerkrankungen

Die Auswirkungen des Übergewichts bzw. Adipositas lassen sich hauptsächlich im metabolischen Syndrom zusammenfassen. Nach der International Diabetes Federation (IDF) definiert sich das metabolische Syndrom durch das Vorliegen einer zentralen (viszeralen) Adipositas mit einem Bauchumfang ≥ 94 cm bei europäischen Männern, ≥ 80 cm bei europäischen Frauen sowie mindestens zwei weiteren der nachfolgenden Kriterien:

- Hypertriglyzeridämie (> 150 mg/dl) oder spezifische Triglyzerid (TG)-senkende Therapie
- High-density Lipoprotein (HDL)-Hypocholesterinämie (< 40 mg/dl für Männer, < 50 mg/dl für Frauen) oder spezifische HDL-anhebende Therapie
- Arterielle Hypertonie (systolisch ≥ 130 mmHg und/ oder diastolisch ≥ 85 mmHg) oder spezifische antihypertensive Therapie
- Erhöhte Nüchternplasmaglukose (≥ 100 mg/dl) oder diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM)

(Grundy et al. 2005; International Diabetes Federation (IDF) 2006).

Ferner führt der stark erhöhte Körperfettanteil zu degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparats wie Gon- und Coxarthrose sowie Dorsopathien (DGAV 2018).

Die Erhöhung des Körperfetts betrifft ebenfalls die Leber, welche vermehrt Fett einlagert (Steatosis hepatis/ Nicht-Alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)). Dies bildet die Grundlage für die sich daraus entwickelnde Nicht-Alkoholische Steatohepatitis (NASH) mit dem Endstadium der Leberzirrhose und Bildung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) (Bray et al. 2018).

Als eigener Risikofaktor gilt die Adipositas für einen Herzinfarkt, eine Herzinsuffizienz (Adipositas-Kardiomyopathie) sowie einen plötzlichen Herztod. Das Risiko für zerebrovaskuläre Ereignisse ist stark erhöht. Die Gerinnung und Fibrinolyse wird durch eine erhöhte Freisetzung von Fibrinogen und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) durch Adipositas negativ beeinflusst, so dass ein erhöhtes Thromboserisiko aufgrund einer Hyperkoagulabilität besteht (Ordemann und Elbelt 2017).

Adipositas erhöht das Risiko, an einem obstruktiven Schlafapnoesyndrom (OSAS) zu erkranken. Bei einem vergrößerten Halsumfang kann man eine gesteigerte Häufigkeit an nächtlichen Apnoen beobachten. Des Weiteren lässt sich gehäuft das Obesitas-Hypoventilations-Syndrom (OHS) erkennen, wobei es zu vermehrten Hypoventilationen mit Hyperkapnie kommt (Bray et al. 2018).

Die Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt zeigen sich durch vermehrtes Auftreten der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD), welche mit Adipositas assoziiert ist, aufgrund des erhöhten abdominalen Drucks bei Adipositas (Hampel et al. 2005). Eine gesteigerte biliäre Cholesterinsekretion mit Verlauf zu einer Cholezystolithiasis und Cholezystitis wird bei Adipositas III° siebenfach häufiger beobachtet im Vergleich zu Normalgewichtigen (Wirth et al. 2014; Banim et al. 2011).

Im Bereich der Endokrinologie zeigen sich vermehrt Adipositas-assoziierte Erkrankungen wie das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) mit Hyperandrogenämie, Zyklusstörungen sowie polyzystischen Ovarien. Das Risiko für Gestationsdiabetes steigt bei adipösen Frauen. Des Weiteren besteht eine höhere Rate an Geburtskomplikationen. Neugeborene adipöser Frauen haben ein höheres Risiko für Frühgeburten, Makrosomie, kongenitale Anomalien und perinatale Mortalität (Marchi et al. 2015).

Das Karzinomrisiko ist bei adipösen Menschen insgesamt erhöht. Ungefähr ein Fünftel der Kolonkarzinome sind auf Übergewicht zurückzuführen. Für die Hälfte der Endometrium- und ein Achtel der Brustkrebserkrankungen von Frauen nach der Menopause ist Übergewicht verantwortlich (Branca 2007).

Bei Patienten mit Adipositas II° und III° mit dem Anliegen einer bariatrischen Behandlung treten gehäuft komorbide psychische Störungen auf. Die drei häufigsten psychischen Erkrankungen bei adipositaschirurgischen Patienten (Depression, Angststörungen und Binge-Eating-Störung

(BES)) treten im Vergleich zur normalgewichtigen Bevölkerung vielfach häufiger auf (Zwaan et al. 2019; Dawes et al. 2016).

Adipositas reduziert die Lebenserwartung deutlich. Bei Menschen mit Adipositas III° (≥ 40 - $44,9 \text{ kg/m}^2$) reduziert sie sich um durchschnittlich 6,5 Jahre, im BMI-Bereich von 55 - $59,9 \text{ kg/m}^2$ um mehr als 13 Jahre (Kitahara et al. 2014).

1.2 Therapiemöglichkeiten

1.2.1 Konservativ

Die konservative Gewichtsreduktion und die folgende Gewichtsstabilisierung setzen sich aus den Komponenten Ernährungs-, Bewegungs- und Verhaltenstherapie zusammen. Adipositas I° oder Präadipositas mit dem gleichzeitigen Vorliegen von übergewichtsbedingten Gesundheitsstörungen bzw. Erkrankungen, welche durch Übergewicht verschlimmert werden, stellen laut Deutscher Adipositas Gesellschaft (DAG) die Indikationen zur konservativen Behandlung dar (Wirth et al. 2014).

Eine Ernährungsumstellung auf Reduktionskost vermindert die Energieaufnahme und reduziert so das Körpergewicht und die Körperfettmasse. Metaanalysen zeigten, dass die mittlere Gewichtsabnahme durch hypokalorische Kost und körperliche Aktivität (3-5x/ Woche 30-60 min) bei ca. 3,6 kg im Vergleich zu ca. 1,8 kg durch alleinige Ernährungsumstellung liegt (Wu et al. 2009). Stärkere Gewichtsabnahmen sind durch hypokalorische Diäten (ca. 850 kcal/d) zu erwarten (Wirth et al. 2014). Ferner wird von der DAG die mediterrane Diät (1.500 kcal/d) empfohlen, da eine vergleichbare Gewichtsreduktion wie bei fettreduzierter oder kohlenhydratarmer Kost erreicht werden kann und sich gleichzeitig günstige metabolische Effekte zeigen (Shai et al. 2008).

1.2.2 Adipositaschirurgie

Die Ergebnisse der konservativen Therapie zeigten, dass die Therapieziele gemäß der DAG-Leitlinie (Gewichtsreduktion $> 5\%$ bei BMI 25 - 35 kg/m^2 und $> 10\%$ bei BMI $> 35 \text{ kg/m}^2$ innerhalb eines Jahres) in der Regel nicht erreicht werden, weshalb chirurgische Therapieoptionen notwendig sind.

Unter Adipositaschirurgie werden operative Eingriffe verstanden, durch die eine nachhaltige Gewichtsreduktion mit einer Verbesserung der Komorbiditäten und der Lebensqualität erreicht werden soll. Unter Metabolischer Chirurgie werden operative Eingriffe wie jene der Adipositaschirurgie verstanden, jedoch wird hier die Indikation primär zur Verbesserung der glykämischen Stoffwechsellage (vorbestehender T2DM) gestellt (DGAV 2018).

Die Indikation für einen adipositaschirurgischen Eingriff ist bei Patienten mit einem BMI ≥ 35 kg/m² mit zusätzlich einer oder mehreren Adipositas-assoziierten Begleiterkrankungen gegeben, wenn die konservative Therapie bereits erschöpft ist. Ebenfalls indiziert ist die chirurgische Therapie bei Patienten mit einem BMI ≥ 40 kg/m² ohne Begleiterkrankungen und ohne Kontraindikationen nach Ausschöpfung der konservativen Therapie. Bei einem BMI ≥ 50 kg/m² kann primär operativ bariatrisch therapiert werden, ohne dass zuvor eine konservative Therapie durchgeführt werden muss (Mechanick et al. 2013; DGAV 2018).

Eine Primärindikation im Sinne der metabolischen Chirurgie stellt ein BMI ≥ 40 kg/m² mit synchronem Auftreten eines T2DM dar (Rubino et al. 2016; DGAV 2018).

Der Wirkmechanismus bariatrischer Operationen beruht auf restriktiven oder hormonalen (malabsorptiven) sowie kombinierten laparoskopischen Operationen (siehe Anhang ab Seite XXVIII). Bei den restriktiven Methoden wie der Magenbandanlage und der Schlauchmagenbildung wird aufgrund des kleinen Magenpouches weniger Nahrung aufgenommen mit einem früheren Einsetzen des Sättigungsgefühls. Bei malabsorptiven Methoden wird die Nährstoffaufnahme durch einen verkürzten Verdauungskanal im Ileum auf ca. 50-100 cm limitiert, wie bei der Biliopancreatischen Diversion nach Scopinaro. Der proximale Roux-en-Y-Magenbypass, der Omega-Loop-Magenbypass und die Biliopancreatische Diversion mit Duodenal-switch zählen zu den kombinierten Operationsmethoden (Billmann und Keck 2017).

1.2.3 Magenband

Die laparoskopische Anlage des Magenbandes (LAGB) erfolgt 1-2 cm aboral des gastroösophagealen Übergangs mit Bildung eines ca. 15-30 ml großen Magenpouches (Anhang Abbildung 22). Das verstellbare Silikonband kann von außen über das Portsystem individuell gesteuert werden, indem die innenliegende Seite des Bandes befüllt wird und somit eine variable Restriktion erreicht wird (Hüttl et al. 2015; Billmann und Keck 2017).

1.2.4 Schlauchmagen

Der Schlauchmagen (SG) ist die am häufigsten durchgeführte bariatrische Operation in Deutschland und diente ursprünglich als ersten Schritt für die Biliopancreatische Diversion mit Duodenal-switch (BPD-DS) (Hüttl et al. 2015). Gegebenenfalls können auch zweizeitige Operationen (Stufenkonzept) durchgeführt werden, um das perioperative Risiko zu senken, insbesondere bei Patienten mit Komorbiditäten. Dies bedeutet, dass zuerst ein Schlauchmagen angelegt wird, um zu einem späteren Zeitpunkt die BPD-DS zu vollenden (Hüttl et al. 2015). Die große Magenkurvatur wird entfernt und somit Fundus und Korpus subtotal reseziert, sodass

der restliche Magen eine ungefähre Dicke einer 32-40 Charrière (Chr) Magensonde besitzt (Anhang Abbildung 23). Das Magenrestvolumen beträgt noch ungefähr 10% (ca. 85 ml) des ursprünglichen Volumens (Keck und Germer 2017).

1.2.5 Proximaler Roux-en-Y-Magenbypass

Die kombinierte Operation aus restriktiver und malabsorptiver Methode stellt der proximale Roux-en-Y-Magenbypass (pRYGB/RYGB) dar. Hierbei wird ein Magenpouch mit ca. 20-30 ml Volumen und eine Roux-Y-Gastrojejunostomie gebildet, die bis zur Jejunojunostomie den alimentären Schenkel mit einer Länge von 75-150 cm bildet (Anhang Abbildung 24). Die biliopancreatische Schlinge (ca. 30-100 cm) wird aus dem jejunalem Schenkel vom Treitz-Band bis zur Jejunojunostomie dargestellt und leitet die Gallen- und Pancreassekrete ab. Der gemeinsame Endkanal des Dünndarms reicht von der Jejunojunostomie bis zur Ileo-zäkklappe und dient der verringerten Resorption (Ordemann und Elbelt 2017).

1.2.6 Omega-Loop-Magenbypass

Zur Gruppe der kombinierten Operationen zählt des Weiteren der Omega-Loop-Magenbypass (OLGB), auch Ein-Anastomosen-Bypass genannt (Anhang Abbildung 25). Nach der Schlauchmagenbildung ohne Entfernung des restlichen Magens wird eine Gastrojejunostomie angelegt. Die biliäre Schlinge misst 200 cm gemessen ab dem Treitzband und bildet nach der Gastrojejunostomie die restliche verkleinerte Resorptionsfläche (Ordemann und Elbelt 2017).

1.2.7 Biliopancreatische Diversion (mit Duodenalswitch)

Als rein malabsorptive Methode steht die Biliopancreatische Diversion (BPD) nach Scopinaro zur Verfügung, die in Deutschland sehr selten durchgeführt wird, aufgrund massiver Malabsorption und den damit einhergehenden Komplikationen. Die Operation wird wie ein Roux-en-Y-Magenbypass durchgeführt, jedoch mit einem größeren Magenpouch (Anhang Abbildung 26). Der gemeinsame Endkanal ist deutlich verkürzt auf ca. 50 cm Länge. Daher resultiert die sehr kurze Resorptionsfläche (Ordemann und Elbelt 2017).

Im Gegensatz zur BPD nach Scopinaro handelt es sich bei der Biliopancreatischen Diversion mit Duodenalswitch (BPD-DS) um eine kombinierte Methode aus Schlauchmagen mit Erhalt des Pylorus und Bildung einer Ileoduodenostomie direkt hinter dem Pylorus (Anhang Abbildung 27). Die alimentäre Schlinge erhält eine Länge von ca. 150 cm bis zur Anastomose mit der biliodigestiven Schlinge. Der gemeinsame Resorptionskanal kann unterschiedlich lang sein, meist zwischen 50-100 cm (Hüttl et al. 2015; Ordemann und Elbelt 2017).

1.2.8 Perioperative Komplikationen

Die operative Mortalität liegt bei ca. 0,1% bei restriktiven Methoden, ca. 0,5% bei Anlage eines Magenbypasses und bei ca. 1,1% bei der BPD-DS (Buchwald et al. 2004). Die Komplikationsrate steigt mit dem BMI, dem fortgeschrittenem Patientenalter, dem männlichen Geschlecht und den vorhandenen Komorbiditäten (Gentileschi et al. 2002; Billmann und Keck 2017).

Frühkomplikationen werden durch Wundinfektion, Blutungen und Lungenembolien beschrieben (Flum et al. 2009). Das Auftreten einer Leckage oder einer Lungenembolie stellen die häufigsten Todesursachen nach bariatrischer Operation dar (DeMaria et al. 2007a; DeMaria et al. 2007b).

Die Spätkomplikationen unterscheiden sich je nach Operationsmethode. Bei der Anlage des LAGB zeigen sich sehr niedrige frühpostoperative Komplikationsraten, jedoch steigt die längerfristige Reoperationsrate auf ca. 10-20% an, meist aufgrund einer Band-Slippage (Chevallier et al. 2004). Bei der SG treten gehäuft Stenosen, Fistelbildungen und Refluxbeschwerden auf. Spät auftretende Anastomosenstenosen zeigen sich gehäuft bei Magenbypassen, vor allem nach pRYGB im Bereich der Gastrojejunostomie. Anastomosenzulzera entstehen nach Magenbypass durch eine hohe Magensaftproduktion, Nikotinabusus sowie Einnahme von Medikamenten wie Nichtsteroidalen Entzündungshemmern (NSAIDs). Die Inzidenz für innere Hernien, Briden, Adhäsionen und Trokarhernien steigt nach einer Magenbypassoperation. Durch die vorhandene Adipositas und rasche Gewichtsreduktion bei pRYGB steigt die Inzidenz für Cholezystolithiasis auf ca. 10% (Ordemann und Elbelt 2017). Weitaus häufiger zeigt sich das neurohormonal verursachte Dumping-Syndrom mit einer Inzidenz bis zu 70% nach pRYGB nach der Einnahme von Zucker. Ursächlich wird von einer Störung der Vasomotorik des Magens mit Verlust der Pylorusfunktion ausgegangen. Innerhalb der ersten Stunde postprandial (Frühdumping) wird durch den raschen Einstrom von hyperosmolarer Nahrung in die alimentäre Schlinge vermehrt Flüssigkeit in das Darmlumen verschoben. Die Dumping-Symptomatik zeichnet sich folglich durch Hypotension und verstärkte Aktivität des Sympathikus aus (van Beek et al. 2017). Mehrere Stunden postprandial (Spätdumping) werden die einfachen Kohlenhydrate zu schnell resorbiert mit der Folge einer Hyperglykämie und einer überschießenden Hyperinsulinämie, wodurch hypoglykämische Symptome möglich sind (van Beek et al. 2017). Besonders bei malabsorptiven und kombinierten Methoden können Mängel an Mikro- und Makronährstoffen auftreten. Nach der BPD werden hauptsächlich die fettlöslichen Vitamine und Proteine verringert aufgenommen (Billmann und Keck 2017).

1.2.9 Ergebnisse bariatrischer Operationen im Vergleich

Der Gewichtsverlust nach bariatrischen Operationen wird anhand des Excess Weight Loss (EWL), dem Verlust an Übergewicht in % gemessen und vergleichbar gemacht. Ein BMI von

25 kg/m² dient als Ausgangswert, woraus sich das Normalgewicht berechnen lässt. Bei bariatrischen Operationen wird ein Therapieerfolg mit einem EWL von 50% definiert, dies bedeutet einer Verringerung des Übergewichts von 50%. Hinzu kommen die Verbesserung der Komorbiditäten sowie der Lebensqualität (Hüttl et al. 2015; O'Brien et al. 2019; Chiappetta 2016).

Den größten Effekt, um Gewicht zu verlieren, zeigte der pRYGB mit einem hohen Gewichtsverlust sowohl in den ersten zwei Jahren als auch nach fünf Jahren. Der BMI konnte im Langzeitverlauf durchschnittlich um etwa 14 Punkte gesenkt werden (Chang et al. 2014). In der Metaanalyse von Buchwald et al. (2004) wurden die Ergebnisse der einzelnen Methoden deutlich. Durchschnittlich wurde ein EWL von 61,2% erreicht. Die geringsten EWL-Prozentpunkte wurden beim LAGB (47,5%) erreicht, gefolgt vom Magenbypass (61,6%). Am Erfolgreichsten stellte sich der BPD-DS (70,1%) in der Studie von Buchwald et al. (2004) dar.

Die BPD-DS zeigte eine nahezu vollständige Remission eines vorbestehenden T2DM (95%) innerhalb von zwei Jahren nach der OP, sowie im Langzeitergebnis. Die Anlage eines Magenbypasses führte durchschnittlich in ca. 80% der Operationen zu einer Remission des T2DM, während sich nach LAGB der geringste Effekt zeigte (ca. 57%) (Buchwald et al. 2009). Im Gesamten präsentierte sich in mehr als 70% der operierten Probanden eine Verbesserung der Hyperlipidämie und eine Reduktion der arteriellen Hypertonie (Buchwald et al. 2004).

Die positiven Folgen der Adipositaschirurgie lassen vermuten, dass sich der menschliche Stoffwechsel nach der Operation verändert bzw. sich der neuen Gegebenheit anpasst. Diesbezüglich kann die Hormonsekretion im Gastrointestinaltrakt bedeutend sein (Dimitriadis et al. 2017), ebenso wie das komplexe Zusammenspiel des Metabolismus und deren Regulationen im ganzen menschlichen Organismus. Hierzu können die verschiedenen anabolen und katabolen Stoffwechselwege sowie deren Gene und Expressionsmuster mithilfe molekularbiologischer Methoden genauer erforscht werden.

Beispielsweise kann hierfür der metabolisch wichtige mTOR-Stoffwechselweg genauer untersucht werden. Hinweise auf eine Beteiligung in Stoffwechselprozessen zeigten sich bei T2DM und Übergewicht durch eine verstärkte Genexpression von *mTOR* (Rubie et al. 2019). Weitergehend interessiert die genaue Reaktion von *mTOR* auf bariatrische Operationen. Nach RYGB konnten Veränderungen der *mTOR*-Expression und der folgenden Ghrelin-Hormonsekretion in Magenzellen in Mäusen erforscht werden (Li et al. 2018). Die folgenden Forschungsuntersuchungen dienen dazu, das Expressionsverhalten von *mTOR* nach bariatrischen Operationen besser zu verstehen und um neue Erkenntnisse der Auswirkung von adipositaschirurgischen Eingriffen zu bekommen.

1.3 mTOR-Stoffwechselweg

mTOR (mammalian/ mechanistic target of rapamycin) ist eine Serin- (Ser-)/ Threonin- (Thr)-Proteinkinase im verwandten Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signalweg (Keith und Schreiber 1995).

1964 wurde das heutige Immunsuppressivum Rapamycin aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Zunächst wurde eine antifungale und makrolidähnliche Wirkung angenommen (Vézina et al. 1975). In weiteren Untersuchungen zeigte Rapamycin seine immunsuppressive Wirkung (Martel et al. 1977). 1994 wurde in biochemischen Studien der weitere Aktionsmechanismus von Rapamycin deutlich, indem mTOR als das direkte Ziel des Rapamycin-FKBP12 Komplexes in Säugetieren identifiziert wurde (Sabatini et al. 1994).

Der mTOR-Signalweg ist Teil von mehreren wichtigen Signalwegen in Eukaryonten und spielt somit eine Schlüsselrolle der Zellphysiologie. mTOR und die weiteren beteiligten Proteinkinasen sind wichtig bei der Aktivierung metabolischer Prozesse wie der Protein-, Nukleotid-, Lipidsynthese und der Glukosehomöostase, sowie der Hemmung von katabolen Mechanismen wie der Autophagie (Liu und Sabatini 2020).

1.3.1 Aufbau von mTOR

mTOR besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten mTOR Komplex 1 (mTORC1) und mTOR Komplex 2 (mTORC2) (Liu und Sabatini 2020).

mTORC1 ist aus drei Hauptkomponenten aufgebaut: mTOR, regulatory protein associated with mTOR (Raptor) und mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8) (Kim et al. 2002). Raptor ist ein regulatorisches Protein, welches die Substratanlagerung an mTOR erleichtert und notwendig ist für die richtige subzelluläre Lokalisation von mTORC1 (Nojima et al. 2003). mLST8 assoziiert mit der katalytischen Region des mTORC1 und stabilisiert die Aktivierung der Kinase (Yang et al. 2013). Zusätzlich besitzt mTORC1 proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) und DEP domain containing mTOR interacting protein (Deptor) als inhibitorische Untereinheiten (Sancak et al. 2007; Peterson et al. 2009).

mTORC2 enthält ebenfalls mTOR, mLST8 und Deptor. Zusätzlich rapamycin insensitive companion of mTOR (Rictor) und die beiden regulatorischen Domänen mSin1 und Protor1/2 (Sarbasov et al. 2004; Frias et al. 2006; Pearce et al. 2007). Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der beiden Komplexe lässt sich bei kurzzeitiger Gabe von Rapamycin die Insensitivität von mTORC2 erklären. mTORC2 besitzt Rictor, welcher vermutlich dafür sorgt, dass der FKBP12-Rapamycin-Komplex nicht an mTOR binden kann. Bei Langzeittherapie von Rapamycin lässt sich dies nicht beobachten (Liu und Sabatini 2020; Lamming et al. 2012).

mTORC1 spielt eine zentrale Rolle, die Homöostase zwischen Anabolismus und Katabolismus aufrecht zu erhalten und auf Umweltfaktoren wie Nahrungsangebot, Wachstumsfaktoren, Energie- und Sauerstoffangebot und zellulären Stress zu reagieren (Saxton und Sabatini 2017).

mTORC2 wird als regulatorisches Element des Aktinzytoskeletts und der Zellmigration verstanden. Eine bedeutende Rolle spielt mTORC2 beim Ablauf des mTOR-Stoffwechselweges und die damit verbundenen Phosphorylierungen und Aktivierungen (Liu und Sabatini 2020).

1.3.2 P70S6K

70kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K) ist das Downstream-Target von mTORC1.

P70S6K zählt zur Gruppe der Serin-/Threoninkinasen (Dufner und Thomas 1999) und ist eine Unterform der S6 kinase 1 (S6K1) Proteine (Tavares et al. 2015). Neben S6K1 existiert S6K2, welches aufgrund seiner sehr ähnlichen Kinasedomäne (ca. 80%) bisher weniger erforscht ist (Pardo und Seckl 2013).

P70S6K besteht aus 502 Aminosäuren und findet sich meist im Zytoplasma (Fenton und Gout 2011). Die längere Isoform P85S6K enthält zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus (Grove et al. 1991). Die zu S6K2 gehörigen Proteine, p54 und p56, besitzen ein nukleäres Lokalisationssignal an ihrem N-Terminus, weshalb davon ausgegangen wird, dass diese Isoformen vorrangig im Zellkern lokalisiert sind (Magnuson et al. 2012). Kürzere Isoformen von S6K1 (p31, h6A und h6C) entsteht durch alternatives Splicing (Ben-Hur et al. 2013; Tavares et al. 2015).

An zahlreichen Proteininteraktionen sind P70S6K sowie die weiteren Isoformen beteiligt.

Eines der wichtigsten Ziele ist das ribosomale Protein S6, eine Komponente der 40S Untereinheit der Ribosomen. S6K1 und S6K2 sind notwendig für die vollständige Phosphorylierung von S6 (Pende et al. 2004) und somit essenziell für die Proteinsynthese und den Zellzyklus (Chauvin et al. 2014). Weitere Ziele von S6K1 sind der eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B) und die eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K), welche die Proteinsynthese stimulieren (Magnuson et al. 2012; Wang et al. 2001). Die Regulation des Transkriptionsprozesses von S6K1 mit dem cAMP responsive element regulator (CREM) und dem estrogen receptor α (ER α) konnten von Groot et al. (1994) und Yamnik et al. (2009) gezeigt werden. S6K1 scheint ebenfalls am mRNA-Splicing beteiligt zu sein, da S6K1 Aly/REF-like target (SKAR) und nuclear cap-binding protein subunit 1 (NCBP1) als potenzielle Ziele von S6K1 identifiziert wurden (Richardson et al. 2004).

S6K1 spielt eine Rolle für das Überleben der Zellen, indem die glycogen synthase kinase 3 (GSK3) und das pro-apoptotische Protein Bcl-2-associated death promoter (BAD)

phosphoryliert und inhibiert werden, wodurch folglich die Apoptose gehemmt wird (Magnuson et al. 2012). Im Gegensatz dazu, besitzt S6K1 die Fähigkeit die Apoptose über p53 einzuleiten. S6K1 bindet an das murine double minute 2- (Mdm2-) Protein, wodurch die Translokation von Mdm2 aus dem Zellkern und die Ubiquitinierung des Tumorsuppressorgens p53 verhindert wird (Lai et al. 2010).

Eine weitere wichtige Aufgabe von S6K1 stellt die Organisation des Zytoskeletts dar. Phosphoryliertes S6K1 bindet an F-Aktin und dient somit dessen Reorganisation. Weitere Proteine der (Ras homologue-) Rho-GTPasen können durch S6K1 aktiviert werden und damit das Zellskelett regulieren (Ip et al. 2011).

1.3.3 AKT

Proteinkinase B (AKT/PKB) ist das Downstream-Target von mTORC2.

AKT besteht aus drei Untereinheiten: pleckstrin homology (PH), welches die Membrantranslokation von AKT reguliert, middle kinase und die regulatorische Untereinheit regulatory carboxy-terminal domain (Abeyrathna und Su 2015). Des Weiteren finden sich drei Isoformen von AKT, welche sich durch unterschiedliche Serin-/Threoninreste charakterisieren. AKT1 lässt sich im ganzen Organismus finden, während AKT2 in insulinsensitiven Geweben wie Skelettmuskel, Fettgewebe und Leber exprimiert wird. AKT3 findet sich vor allem im Hoden und im Gehirn (Abeyrathna und Su 2015; Krycer et al. 2010).

Durch zwei Mechanismen wird AKT vollständig aktiviert (Huang et al. 2018). Die erste Phosphorylierung entsteht an der Kinasedomäne Threonin308 durch Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) über Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) (Alessi et al. 1997). Zusätzlich erfolgt der zweite Aktivierungsschritt durch die Phosphorylierung von Serin473 an der C-terminalen regulatorischen Einheit durch mTORC2 über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Sarbasov et al. 2005). Möglicherweise sind auch PI3K-unabhängige Aktivierungen von AKT möglich, beispielsweise durch die an der Plasmamembran lokalisierten Phospholipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und PIP₃ (Jethwa et al. 2015). Die Inaktivierung von AKT erfolgt über die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen (Andjelković et al. 1996; Gao et al. 2005).

AKT besitzt viele Downstream-targets, welche über die Serin- und/ oder Threoninreste phosphoryliert und damit aktiviert oder inaktiviert werden. Dazu zählen Protein- und Lipidkinasen, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren und metabolische Enzyme, wodurch AKT eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie Apoptose, Zellzyklus und Metabolismus spielt (Manning und Toker 2017; Huang et al. 2018).

Bei Glukoseangebot wird die Expression des Glukosetransporters Typ 4 (GLUT4) und der Enzyme für Glykolyse und Glykogensynthese induziert (Manning und Cantley 2007). Die Enzyme für die Gluconeogenese werden durch AKT gehemmt (Huang et al. 2018).

Ferner reguliert AKT den Lipidstoffwechsel durch sterol regulatory element binding proteins (SREBP), welche die Akkumulation von Cholesterin- und Fettsäuren induzieren (Krycer et al. 2010).

Die Rolle der Downstream-Targets, p70S6K und AKT, im mTOR-Stoffwechselweg wird im Weiteren erläutert.

1.3.4 Ablauf des mTOR-Stoffwechselweges

Der Ablauf der Signalweiterleitung des Stoffwechselweges ist Abbildung 2 zu entnehmen.

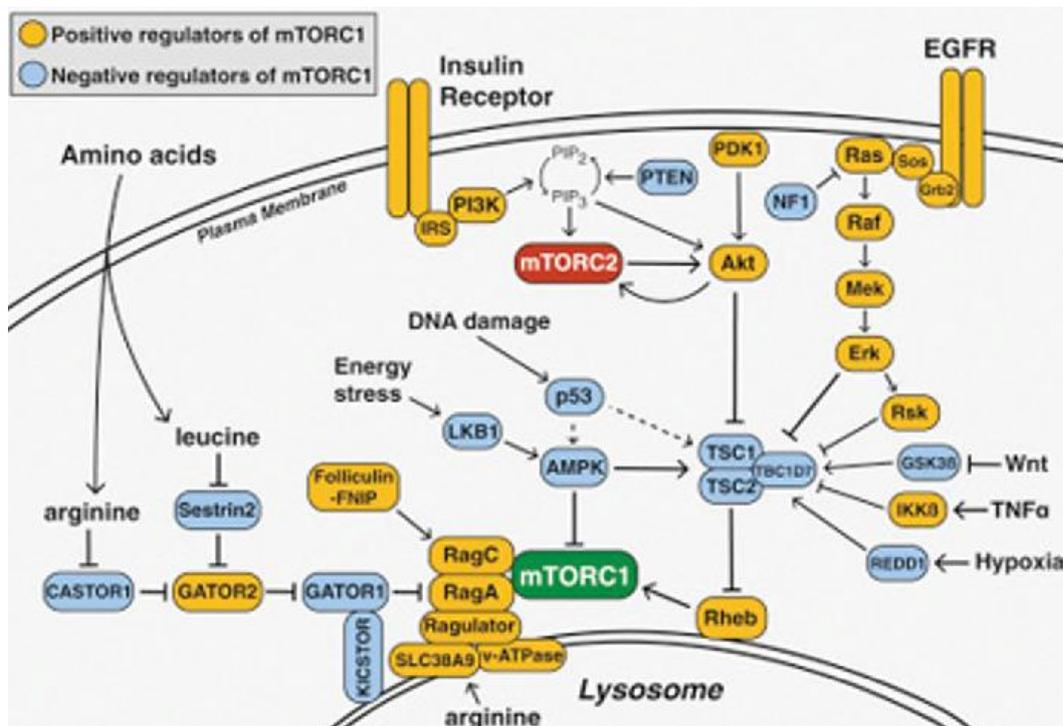


Abbildung 2: Signalweg des mTOR-Stoffwechsels

Quelle: Saxton und Sabatini (2017)

Der Insulinrezeptor (IR) an der Plasmamembran führt nach Aufnahme von Insulin zur Aktivierung des Insulin-Rezeptor-Substrates (IRS). Folglich wird die PI3K aktiviert, welche PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert und PIP₃ somit aktiviert. PIP₃ phosphoryliert und aktiviert mTORC2.

AKT wird durch mTORC2 und PDK1 aktiviert und erhält somit eine doppelte Aktivierung, da AKT den Schlüsselfaktor des Insulin-/ PI3K-Signalwegs darstellt und für die folgende Aktivität

von mTORC1 essenziell ist. Im Sinne der doppelten Inhibierung wird durch Phosphorylierung der Tuberous Sclerosis Complex (TSC) inhibiert, wodurch die von TSC ausgehende Hemmung auf die Guanosinriphosphat- (GTP)-asen Ras homolog enriched in brain (Rheb) und Ras-related GTP-binding protein (Rag) und somit mTORC1 aufgehoben wird (Saxton und Sabatini 2017). Die sich an der Lysosomenmembran befindenden GTPasen Rheb und Rag sind dafür zuständig, dass mTORC1 nur dann aktiviert wird, wenn die intra- und extrazellulären Konditionen dafür gegeben sind. Sofern ausreichend Aminosäuren, Glukose und Wachstumsfaktoren vorliegen, kann das Rag-Heterodimer aktiviert werden, welches mTORC1 vom Zytoplasma zur Lysosomenmembran rekrutiert, um dann mit Rheb-GTP in Verbindung zu kommen (Liu und Sabatini 2020).

Die Regulation des Signalweges geht vom aktivierten mTORC1 aus, da dieser sein Downstream-Target p70S6K phosphoryliert und aktiviert, wodurch IRS gehemmt wird. Ferner kann mTORC1 das Growth factor receptor-bound protein 10 (Grb10) als weiteren negativen Regulator des IRS aktivieren (Yu et al. 2011).

1.3.5 Funktion von mTORC1

mTORC1 fördert die Proteinsynthese durch Aktivierung von p70S6K und der daraus folgenden Aktivierung des eIF-4B zur Verbesserung der 5'cap-abhängigen Translation der mRNA (Holz et al. 2005). Auf den gleichen Effekt zielt die Hemmung des eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) mit nachfolgender Inhibierung des eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF-4E) ab. Weitere Translationsfaktoren werden durch mTORC1 beeinflusst, um die Entwicklung der Ribosomen zu fördern (Liu und Sabatini 2020).

Als Voraussetzung für Zellwachstum ist neben der Nukleotidsynthese auch die Lipidsynthese notwendig, um neue Zellmembranen aufbauen zu können. Hierbei werden über Aktivierung von p70S6K die SREBP aktiviert, ebenso wie durch die doppelte Inhibierung über Lipin-1 (Porstmann et al. 2008, Peterson et al. 2011). Bei geringem Cholesterinanteil in der Zelle, translozieren die SREBP von der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) in den Nukleus und führen zu einer Hochregulierung der Gene für die de-novo-Lipid- und Cholesterinsynthese (Horton et al. 2002). Die Nukleotidsynthese wird verstärkt aktiviert durch p70S6K, wodurch die Aktivierung von Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamoylase und Dihydroorotase (CAD) eine verbesserte Pyrimidinsynthese auslöst (Ben-Sahra et al. 2013). mTORC1 aktiviert den Activating transcription factor 4 (ATF4) und sein Downstream-Target methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2) für eine gesteigerte de-novo-Purinsynthese (Ben-Sahra et al. 2016). Neben den direkten Effekten auf Enzyme und Transkriptionsfaktoren, hat mTORC1 die Fähigkeit den Transkriptionsfaktor

hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) hochzuregulieren, um eine verstärkte Expression glykolytischer Enzyme zu erreichen und somit die aerobe Glykolyse zu steigern (Duvel et al. 2010).

Während mTORC1 anabolische Prozesse steigert, werden gleichzeitig katabole Mechanismen – die katabole Autophagie – verringert. Dafür werden die beiden Haupteffektoren der Autophagieinduktion Unc-51-like autophagy-activating kinase (ULK1) und Autophagy-related protein 13 (ATG13) durch Phosphorylierung gehemmt (Hosokawa et al. 2009). Des Weiteren sorgt mTORC1 für die Inaktivierung des Ultraviolett (UV) Radiation Resistance Associated Gene Proteins (UVRAG), um die Reifung der Autophagosomen zu hemmen und die Entwicklung von Endosomen zu Lysosomen zu verringern (Kim et al. 2015). Weitere Transkriptionsfaktoren (TF-EB, TF-E3) für die Entstehung von Lysosomen werden ebenfalls gehemmt (Roczniak-Ferguson et al. 2012).

1.3.6 Funktion von mTORC2

mTORC2 stellt eine wichtige Rolle der Zellmigration und des Zytoskelettremodelings dar, indem mehrere Proteinkinasen vom Typ C (PKC) aktiviert werden. Die PKC α dient als Regulator des Aktinzytoskeletts (Jacinto et al. 2004).

Die wichtigste Funktion von mTORC2 stellt die durch Phosphorylierung ausgelöste Aktivierung von AKT dar. Über eine doppelte Inaktivierung über TSC wird mTORC1 aktiviert. Ferner unterstützt AKT die Glukosehomöostase durch Aktivierung der Glykogensynthese. Die glycogen synthase kinase 3b (GSK3b) wird durch AKT gehemmt, und die Glykogensynthase (GS) über eine doppelte Inaktivierung aktiv (Wan et al. 2013). Die Transkriptionsfaktoren Forkhead box protein O1 (FoxO1/3a) induzieren die Gluconeogenese, jedoch inhibiert AKT die Expression von FoxO1/3a, wodurch die Gluconeogenese gehemmt wird (Zoncu et al. 2011). Die durch mTORC2 gehemmten FoxO1/3a dienen ferner der Unterstützung des Metabolismus gegen Stressoren (Webb und Brunet 2014).

1.3.7 Beeinflussende Faktoren des mTOR-Stoffwechselweges

Insulin bindet an den membranständigen Insulinrezeptor und führt zur Aktivierung des IRS mit folgender Aktivierung von AKT und mTORC1. Wachstumsfaktoren können über den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und den intrazellulären Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg TSC hemmen und somit zu einer gesteigerten Aktivierung des mTOR-Stoffwechselweges führen (Menon et al. 2014).

Hypoxie und zellulärer Stress führen zur Aktivierung von TSC und der damit verbundenen verringerten Aktivität von mTORC1, vergleiche Abbildung 2.

Eine erhöhte Adenosintriphosphat (ATP)/Adenosinmonophosphat (AMP)-Ratio führt zur direkten Aktivierung der AMP-activated protein kinase (AMPK), was durch eine Phosphorylierung von Raptor zu einer direkten Inhibierung von mTORC1 führt und durch Aktivierung von TSC zu einer indirekten (Gwinn et al. 2008). Zellschädigungen führen über die Zielgene AMPK β , Phosphatase and tensin homologue (PTEN) und TSC2 zur verringerten Aktivität von mTORC1, um die Proliferation zu verlangsamen und die Genomintegrität aufrecht zu erhalten (Feng et al. 2007).

Aminosäuren, vor allem Valin, Leucin, Isoleucin und Arginin, spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von mTORC1 über Rheb-GTP und Rag-Heterodimer, ersichtlich in Abbildung 2 (Hara et al. 1998).

Bei erhöhten Insulin- und Aminosäurespiegeln – sprich bei Nahrungsaufnahme – wird der mTOR-Stoffwechselweg verstärkt aktiviert. Zellhypertrophie und -wachstum werden durch den anabolen Metabolismus gefördert, indem Glukoseaufnahme, Glykogensynthese, Adipo- und Lipogenese und gleichzeitiger Hemmung der Glukoneogenese und Ketogenese stattfinden (Liu und Sabatini 2020). Bei Adipositas kommt es zu einer Überaktivität von mTORC1 mit nachfolgender Hemmung des IRS an der Zellmembran durch p70S6K und Grb10. Bei langanhaltendem Zustand stellt dies eine Grundlage für die Entwicklung eines T2DM und des metabolischen Syndroms dar (Um et al. 2004).

1.4 Ziel der Promotion

In unserer Arbeitsgruppe wurde vor einigen Jahren eine funktionelle Interaktion der microRNA-496 (miR-496) mit *mTOR* und deren Einfluss auf die Regulation des menschlichen Alterns demonstriert (Rubie et al. 2016). T2DM tritt am häufigsten bei älteren Menschen auf, weshalb danach untersucht wurde, ob miR-496 auch einen Einfluss auf die *mTOR*-Genexpression bei T2DM haben könnte. Tatsächlich konnte eine signifikante Hochregulierung der Phospho-mTOR- und P70S6-Kinase- (P70S6K-) Spiegel und eine signifikante Herunterregulierung von miR-496 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) der älteren T2DM-Patienten gezeigt werden. Darüber hinaus wurde in fortgeschrittenen Stadien der Adipositas eine verstärkte Expression des Phospho-mTOR-Proteins, bei gleichzeitig deutlich reduzierter Expression von miR-496 beobachtet (Rubie et al. 2019). Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang der miRNA- und *mTOR*-Expression mit der Entwicklung der Adipositas hin. Zudem zeigen die Forschungsergebnisse von Rubie et al. (2019), dass der mTORC1 Signalweg an der Regulation des T2DM beteiligt sein könnte.

Durch verstärkte Nahrungsaufnahme und der folgenden erhöhten Insulinausschüttung wird *mTOR* vor allem in den metabolisch wichtigen Geweben wie Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe verstärkt aktiviert. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine verringerte Expression von *mTOR* bei geringer Nahrungsaufnahme (Liu und Sabatini 2020). Folglich stellt sich die Frage, ob eine signifikante Gewichtsabnahme nach einer adipositaschirurgischen Operation mit einer Reduktion der *mTOR*-Genexpression verbunden ist.

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob nach adipositaschirurgischen Operationen und im weiteren Verlauf eine Veränderung des mTOR-Stoffwechselweges simultan zur Verbesserung klinischer Parameter beobachtet werden kann und in welchem Ausmaß diese eintritt. Durch die Veränderung des mTOR-Stoffwechselweges können weitere Rückschlüsse auf die Entwicklung und den Verlauf von Adipositas und T2DM gezogen werden.

Um den mTOR-Stoffwechselweg untersuchen zu können, werden *mTOR*, sein Downstream-Target *p70S6K* und *AKT*, das Downstream-Target von *mTORC2*, als Zielgene ausgewählt. Als Housekeeping Gen dient Proteasome subunit beta type-6 (*PSMB6*), um die Genaktivität der untersuchten Probanden untereinander, bezogen auf den Referenzwert des Housekeepers, vergleichen zu können. Mithilfe der qRT-PCR soll die Genexpression der drei Zielgene quantifiziert werden.

2. Material

2.1 Verwendete Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits mit Herstellerangabe und Verwendungszweck

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Corporation	cDNA-Synthese aus isolierter RNA
NucleoSpin® miRNA	Macherey-Nagel GmbH (Juni 2017, Rev. 05)	RNA-Isolation
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel GmbH (Januar 2017, Rev.17)	DNA-Isolation
MagniSort™ Human CD14 Positive Selection Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Corporation	Monozyten-Isolation
GoTaq Probe qPCR Master Mix	Promega Corporation	qRT-PCR

2.2 Verwendete Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
Ammonium Chlorid Solution	StemCell Technologies
Bidestilliertes Wasser	Hauseigene Anlage
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH
CXR Reference Dye	Promega Corporation
Destilliertes Wasser	Hauseigene Anlage
DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco by Thermo Fisher Scientific Corporation
EDTA 0,5M pH 8,0	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Corporation
Ethanol absolut EMPROVE®	VWR International LLC
GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X	Promega Corporation
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific Corporation
HI Bovine Serum, Heat Inactivated	Gibco by Thermo Fisher Scientific Corporation

RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific Corporation
RNase-free-H2O	Macherey-Nagel GmbH
Trypanblau Lonza17-942E	Lonza by VWR International LLC
Water, Sterile, Nuclease-free	VWR International LLC

2.3 Angesetzte Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Angesetzte Puffer und Lösungen mit deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Komponenten	Anteil
PBS + 1 mM EDTA	DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	500 ml
	EDTA 0,5M pH 8,0	1 ml
Separationspuffer	DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	47 ml
	EDTA 0,5M pH 8,0	940 µl
	HI Bovine Serum, Heat Inactivated	1,44 ml

2.4 Verwendete TaqMan™ Gene Expression Assays

Tabelle 5: Verwendete Gene Expression Assays

Bezeichnung	Zielgen	Hersteller
HS00382586	<i>PSMB6</i>	Thermo Fisher Scientific Corporation
HS00234508	<i>mTOR</i>	Thermo Fisher Scientific Corporation
HS00177357	<i>P70S6K</i>	Thermo Fisher Scientific Corporation
HS00178289	<i>AKT</i>	Thermo Fisher Scientific Corporation

2.5 Probenmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Blutproben

Blutproben	Herkunft
EDTA-Vollblut	22 freiwillige Adipositaspatienten des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg
	20 freiwillige Kontrollprobanden (zwischen 20 und 60 Jahren mit einem BMI < 25 kg/m ² ohne vorherige/ aktuelle schwerwiegende Erkrankungen)

2.6 Verwendete Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Corporation
Centrifuge 5417R	Eppendorf GmbH
Centrifuge 5810R	Eppendorf GmbH
DS-11 Spectrophotometer	DeNovix Inc.
Gefrierschrank (-20° C), Premium NoFrost	Liebherr GmbH
Kühlschrank (4° C), Gastro Line	Liebherr GmbH
Laborgefrierschrank (-20° C), Medline Lgex 3410 – 22A 001	Liebherr GmbH
Magnet, EasySep™	Stemcell Technologie
Mikroskop ECLIPSE TS100	Nikon Corporation
Mini-Zentrifuge ROTILABO® mit Butterfly-Rotor (6000 RPM)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Neubauer-Zählkammer, Neubauer Improved	LO-Laboroptik GmbH
Pipetten, Reference/ Research/ Research Plus	Eppendorf GmbH
Simpli Amp™ Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific Corporation
Thermomixer compact	Eppendorf GmbH
Ultratiefkühlschrank UF V (-80° C)	BINDER GmbH
Vortex-Schüttler, Lab Dance S40	VWR International LLC

2.7 Verwendete Verbrauchswaren

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchswaren mit Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
0,2 ml Thin-walled Tube with Flat Cap	VWR International LLC
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Thermo Fisher Scientific Corporation
Kryoröhrchen 5ml, Außengewinde, Standring	VWR International LLC
MicroAmp™ Optical Adhesive Film (PCR Compatible, DNA/RNA/RNase-free)	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Corporation
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Corporation
Pipettenspitzen	VWR International LLC
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml	Thermo Fisher Scientific Corporation
Reaktionsgefäße 3810X, g-Safe®, 1,5 ml	Eppendorf GmbH
Reaktionsgefäß mit anhängendem Schraubdeckel (aufgeschraubt) mit Silikondichtung; 1,5 ml und 2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG
Safety-Multifly-Kanüle 0,8x19 mm 21G	Sarstedt AG & Co. KG
S-Monovette®, 9 ml K3E	Sarstedt AG & Co. KG

2.8 Verwendete Software

Tabelle 9: Verwendete Software mit Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
7500 Software For 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems v.2.3	Life Technologies by Thermo Fisher Scientific Corporation

3. Methoden

3.1 Probandenakquise

Die Probenakquise dieser Arbeit umfasste 22 freiwillige Probanden, die als Patienten des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) in der Adipositasprechstunde mit Intention einer bariatrischen Operation am hiesigen Klinikum vorstellig wurden.

Um die Studienergebnisse auch mit normalgewichtigen Probanden vergleichen zu können, wurden auf freiwilliger Basis 20 Kontrollprobanden aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie akquiriert. Auswahlkriterien für das Kontrollkollektiv umfassten neben einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ auch einen Altersrahmen zwischen 20 und 60 Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Ausschlusskriterien bildeten das Vorliegen von schweren aktuellen sowie vergangenen Vorerkrankungen wie Krebs oder chronische Erkrankungen. Auf diese Weise sollte eine möglichst gute Vergleichbarkeit zum Patientenkollektiv gewährleistet werden.

Die Patienten und Kontrollprobanden wurden über das Vorgehen aufgeklärt, nachdem das Prozedere erläutert wurde. Die Patienteninformation und die Einverständniserklärung sind im Anhang ersichtlich (Seiten XXX-XXXVII). Die Ethikkommission willigte in die durchführende Studie ein (Ethiknummer: 22/18).

3.2 Blutentnahme

Den Probanden wurden an acht Zeitpunkten etwa 36 ml Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblut (4 x 9 ml) entnommen, ersichtlich in Tabelle 10. Zur Bindung der im Blut befindlichen Calcium-Ionen wurden mit EDTA innenseitig beschichtete Monovetten eingesetzt. Die so bewirkte Bildung von Chelatkomplexen verhindert die Blutgerinnung.

Folgende Zeitpunkte wurden bestimmt:

Tabelle 10: Zeitpunkte der Blutabnahmen

Bezeichnung	Zeitpunkt
A	Vor der Crash-Diät (VCD)
B	Präoperativ
C	1. postoperativer Tag
D	3. postoperativer Tag
E	5. postoperativer Tag
F	3 Monate postoperativ = 3 Monats-Nachkontrolle (3MNK)
G	6 Monate postoperativ = 6 Monats-Nachkontrolle (6MNK)
H	12 Monate postoperativ = 12 Monats-Nachkontrolle (12MNK)

Den Kontrollprobanden wurde einmalig ca. 36 ml EDTA-Vollblut entnommen.

Die EDTA-Vollblut-Proben wurden innerhalb einer halben Stunde, maximal 20 Stunden nach Abnahme, weiterverarbeitet.

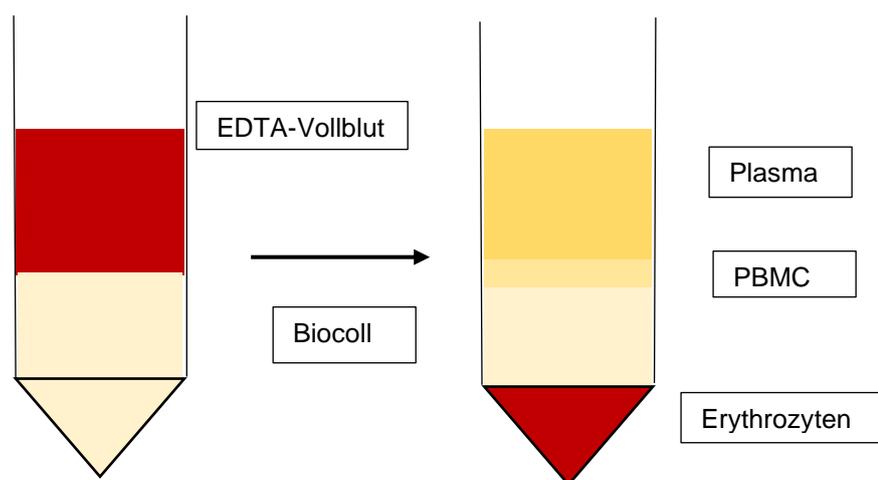
3.3 Separation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus Vollblut

Die Vorbereitung der PBMC-Separation bestand in der Bereitstellung verschiedener Gefäße (2 x 5 ml Kryoröhrchen, 4 x 50 ml Falcons, 4 Falcons mit je 15 ml Separationslösung Biocoll) sowie deren Beschriftung mit der jeweiligen Probandennummer.

Zur Abnahme des Plasmas wurden zwei der insgesamt vier EDTA-Vollblut-Monovetten zu je 9 ml zunächst bei 1000xg bei Raumtemperatur (RT) für eine Dauer von 15 min zentrifugiert. Die Blutzellen setzten sich unten ab. Anschließend wurden 3 ml Plasma in Kryoröhrchen umgefüllt und bei -20° C gelagert, um in fortführenden epigenetischen Untersuchungen des Labors zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt zu werden. Das fehlende Plasmavolumen wurde nach der Plasmaabnahme mit Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)) + 1 mM EDTA ausgeglichen und vorsichtig gemischt.

Jeweils 18 ml Blut, 1 x 9 ml EDTA-Vollblut und 1 x 9 ml PBS-EDTA-Blut, wurden in ein 50 ml Falcon umgefüllt und in einem 1:1 Verhältnis mit PBS + 1 mM EDTA aufgefüllt. Nach dem Vermengen wurden 4 x 15 ml Biocoll bereitgestellt. Biocoll stellt eine physikalische Trennmethode dar, die auf den physikalischen Unterschieden wie Größe, Gewicht und Dichte der zu trennenden Blutbestandteile beruht. Die spezifische Dichte dieses hydrophilen hoch vernetzten Bio-Polymers aus Saccharose beträgt 1,077 g/ml (im Vergleich Blutplasma = 1,028 g/ml) (Bio&SELL GmbH 2020).

Die 15 ml Biocoll in jedem der vier Falcons wurden vorsichtig und langsam mit je 18 ml der verdünnten Blutsuspension überschichtet. Anschließend wurde die Probe bei 1200xg bei RT für 20 min mit Bremse zentrifugiert. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde eine deutliche Schichtung erkennbar (siehe Abbildung 3). Die milchige Interphase, bestehend aus den mononukleären Zellen des Blutes, wurde vollständig abgenommen und in zwei neue 50 ml Falcons überführt. Es wurde darauf geachtet, möglichst wenig von der Plasma- und Biocollschicht mitzunehmen, um die Konzentration der PBMC nicht zu verdünnen. Das restliche Blut wurde verworfen.



Links: Überschichtung von Biocoll (weißlich) mit EDTA-Vollblut (rot)

Rechts: Schichtung nach der Dichtegradientenzentrifugation, Plasma (gelb) und PBMC (beige) auf Biocoll (weißlich)

Abbildung 3: Prinzip der PBMC-Isolation mithilfe von Biocoll

Quelle: Eigene Darstellung

Danach wurde ein Waschschriff mit PBS + 1 mM EDTA durchgeführt und bei 600xg bei RT für eine Dauer von 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen.

Die Zellpellets wurden in jeweils 1 ml PBS + 1 mM EDTA resuspendiert, dann in einem Falcon zusammengefügt und mit 8 ml PBS + 1 mM EDTA auf 10 ml aufgefüllt und gut gemischt.

Nun wurden 50 µl für eine Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen. Das Falcon wurde auf 50 ml mit PBS + 1 mM EDTA aufgefüllt und erneut bei 600xg bei RT für 10 min zentrifugiert.

Die entnommenen 50 µl Zellsuspension wurden mit 450 µl Trypanblaulösung vermischt. So wurde eine Verdünnung der Zellsuspension 1:10 in Trypanblau erreicht. Trypanblau dient der Bestimmung der Zellviabilität. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, da dieser aufgrund seiner Größe die Zellmembran nicht passieren kann. Abgestorbene und perforierte Zellen nehmen hingegen Trypanblau auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt. Wenn der Farbstoff nicht aufgenommen wird, kann man auf den Zustand der Zellmembran schließen, jedoch nicht auf die Funktionstüchtigkeit des Zellinneren (Schmitz und Desel 2018).

10 µl der Trypanblauzellsuspension wurden entnommen und auf eine Neubauerzählkammer aufgebracht. Unter dem Mikroskop wurden in den vier großen Eckquadraten, bestehend aus jeweils 16 kleineren Quadraten, die PBMC gezählt. Tote Zellen wurden bei der Zählung ausgeschlossen.

Anhand Formel 1 wurde die Zellzahl der PBMC berechnet:

Formel 1: Berechnung der Anzahl der PBMC unter dem Mikroskop

$$\frac{\sum \text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der großen Eckquadrate}} \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnung} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$
$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \times \text{Volumen in ml} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Für die nachfolgenden Schritte (DNA-, RNA-Isolation und Proteinlyse) wurde je nach erhaltener Zellzahl ein bestimmtes Volumen von PBMC in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

3.4 Separation von Monozyten

Im Zuge der PBMC-Separation wurden im Anschluss Monozyten aus den peripheren mononukleären Blutzellen isoliert, um diese für weitere Forschungsarbeiten zu Adipositas und Epigenetik zu verwenden. Die Monozyten wurden mithilfe des MagniSort™ Human CD14 Positive Selection Kit isoliert.

Monozyten exprimieren das Oberflächenprotein Cluster of differentiation (CD) 14+, wodurch die mit Hilfe von Biotin gekoppelten Anti-CD14-Antikörpern in Verbindung mit magnetischen Beads leicht zu isolieren sind.

Die isolierten PBMC wurden mit PBS + 1 mM EDTA aufgefüllt und bei 600xg bei RT für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Separationspuffer (100 µl pro 1×10^7 Zellen) resuspendiert und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen mit „Cell Strainer Cap“ überführt. Anschließend wurde 20 µl MagniSort™ Anti-Human CD14 Biotin pro 100 µl Zellsuspension hinzugegeben, 5 s gevortext und bei RT für 10 min inkubiert. Als folgenden

Waschschritt wurde das Volumen im Rundbodenröhrchen auf 4 ml mit dem Separationspuffer gebracht und bei 300xg bei RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Separationspuffer zum ursprünglichen Volumen resuspendiert (100 µl pro 1×10^7 Zellen).

Die Streptavidin-beschichteten magnetischen Beads wurden 30 s vor Gebrauch mit dem Vortex-Schüttler gemischt. Im Anschluss wurden 30 µl MagniSort™ Positive Selection Beads A pro 100 µl Zellsuspension hinzugegeben und gut resuspendiert, um die Beads gleichmäßig in der Zellsuspension zu verteilen. Dann wurde für 5 s gevortext und bei RT für 10 min inkubiert. CD14+-Zellen werden durch den Antikörper und danach durch die magnetischen Beads gebunden. Das Volumen wurde auf 2,5 ml mit dem Separationspuffer aufgefüllt und gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann für 5 min in dem Standmagneten bei RT inkubiert.

Dabei wurde darauf geachtet, dass das Rundbodenröhrchen bis zum Boden durch den Magnet geschoben wurde, damit sich die Zellsuspension und die darin enthaltenen Magnetbeads komplett im Magneten befinden. Die ungebundenen CD-14 negativen Zellen wurden nach der Inkubation verworfen, indem der Magnet samt Röhrchen vorsichtig in einer kontinuierlichen Bewegung invertiert wurde, sodass der Überstand herausfließen konnte. Das Röhrchen wurde nicht aus dem Magneten genommen werden, um die Bindung zwischen den CD-14+ Monozyten mit den haftenden Magnetbeads nicht zu lösen. Das Röhrchen wurde aus dem Magneten entfernt und mit dem Separationspuffer wieder auf 2,5 ml aufgefüllt und im Magneten platziert. Dieser Separationsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Separationsschritt enthielt das Röhrchen nur noch die isolierten Monozyten. In 1 ml PBS + 1 mM EDTA wurden die Monozyten resuspendiert und 50 µl in 450 µl Trypanblau gegeben. Aus der Trypanblau-Zellsuspension wurden 10 µl auf die Neubauerzählkammer pipettiert und anschließend, wie bei den PBMC, die Monozyten gezählt.

3.5 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA)

Die RNA wurde im späteren Verlauf zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben, um anschließend mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) die mRNA-Expression von den ausgewählten Genen zu untersuchen.

Je nach erhaltener Zellzahl wird ein bestimmtes Volumen von PBMC in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Für die RNA-Isolation wurden mindestens drei Millionen, jedoch maximal zehn Millionen Zellen eingesetzt. Das Reaktionsgefäß wurde mit PBS + 1 mM EDTA aufgefüllt und bei 1400xg bei 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen.

Der Ablauf der Isolation der RNA erfolgte mit dem Kit NucleoSpin® miRNA entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls.

Das Zellpellet wurde unabhängig der Zellzahl mit 300 µl Lysepuffer (Lysis Buffer ML) resuspendiert und gevortext, um neben der chemischen auch eine mechanische Lyse zu erreichen. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert.

Um die RNA-Isolation fortzusetzen, wurde das Lysat bei RT aufgetaut und nach dem Auftauen für weitere 5 min bei RT inkubiert. Für jede Probe wurde ein NucleoSpin® Filter Säule in ein 2 ml Sammelröhrchen mit Deckel platziert. Das Lysat wurde homogenisiert, indem das Lysat auf die Filtersäule pipettiert und anschließend bei 11000xg bei RT für eine Minute zentrifugiert wurde. Unlysierte Zellreste sollten durch den speziellen Filter zurückgehalten werden. Wenn im Durchfluss ein Pellet sichtbar wurde, wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der NucleoSpin® Filter wurde verworfen. Zum homogenisierten Lysat wurden 150 µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben und direkt für 5 s gevortext. Ethanol sorgt für passende Bedingungen für die Bindung der RNA an die NucleoSpin RNA-Säule. Anschließend wurde die Suspension bei RT für 5 min inkubiert. Sofern die Bildung eines Präzipitats beobachtet wurde, wurde dies im folgenden Schritt auf die NucleoSpin® Filter Säule pipettiert.

Eine NucleoSpin® RNA Säule wurde in ein 2 ml Sammelröhrchen mit Deckel platziert und die Säule mit dem kompletten Lysat inklusive der möglichen Präzipitate geladen. Anschließend wurde bei 11000xg bei RT für eine Minute zentrifugiert und der entstandene, die kleinen RNAs enthaltende Durchfluss aufgehoben und in einem späteren Schritt weiterverarbeitet. Die Säule enthielt nun sowohl DNA-, als auch größere RNA-Moleküle.

Die NucleoSpin® RNA Säule wurde in ein frisches Sammelröhrchen ohne Deckel platziert.

Zum anschließenden Entsalzen der Membran wurden 350 µl Puffer MDB auf die Säule gebracht und bei 11000xg bei RT für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder in das Sammelröhrchen eingesetzt.

Folgend musste die restlich vorhandene DNA entfernt werden, dies geschah mithilfe der Zugabe von 80 µl rDNase direkt auf die Säule. Bei offenem Deckel wurde bei RT für 15 min inkubiert. Währenddessen wurden die folgenden Schritte mit dem Durchfluss durchgeführt, welcher die kleinen RNAs enthielt.

Der Durchfluss mit den kleinen RNAs enthielt außerdem noch Proteinbestandteile, welche präzipitiert wurden, durch Zugabe von 300 µl Puffer MP direkt auf den Durchfluss. Anschließend wurde für 5 s gevortext. Um die restlichen Proteine auszufällen, wurde bei 11000xg bei RT für 3 min zentrifugiert. Das entstandene Proteinpellet wurde im Reaktionsgefäß belassen und der Überstand wurde auf eine neue NucleoSpin® Protein Removal Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen mit Deckel gebracht. Anschließend wurde bei 11000xg bei RT für eine Minute

zentrifugiert, die NucleoSpin® Protein Removal Säule verworfen und der Durchfluss im Sammelröhrchen aufgehoben. Durch Zugabe von 800 µl Puffer MX zum Durchfluss und dem folgenden Vortexen für 5 s sollten die Bindeoptionen für die microRNAs angepasst werden. 600 µl des Durchflusses wurden dann auf die NucleoSpin® RNA Säule, welche im oben beschriebenen Schritt für 15 min bei RT inkubiert wurde und die großen RNAs enthält, gegeben und direkt bei 11000xg bei RT für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule wieder eingesetzt und dieser Schritt so oft wiederholt, bis die komplette Probe geladen wurde (3x). In diesen beschriebenen Schritten wurden die microRNAs an die Säule gebunden.

Im Anschluss wurden mehrere Waschschrte vollzogen, um eine möglichst reine RNA-Probe zu erhalten. Es wurden zunächst 600 µl Puffer MW1 auf die geladene Säule gebracht und dann bei 11000xg bei RT für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder auf das Sammeltube gesetzt. Danach wurde die Säule mit 700 µl Puffer MW2 geladen und ebenfalls bei 11000xg bei RT für 30 s zentrifugiert. Um eine noch bessere Reinheit zu erhalten, lässt sich dieser letzte Schritt fakultativ wiederholen. Der Durchfluss wurde auch hier verworfen und die Säule wieder in das Sammelröhrchen platziert. Dann wurden 250 µl Puffer MW2 auf die Säule pipettiert. Zum Trocknen der Säule wurde bei 11000xg bei RT für 2 min zentrifugiert. Sofern der Durchfluss die Säule nach der Zentrifugation berührt haben sollte, wurde dieser entfernt und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, um dann mit der Elution beginnen zu können.

30-50 µl RNase-freies Wasser, variierend je nach Zellzahl, wurde auf die Säule pipettiert. Für mehr als 6 Millionen PBMC 50 µl, bei 4 bis 6 Millionen 40 µl und bei weniger als 4 Millionen PBMC wurden 30 µl verwendet. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde 30 s bei 11000xg und RT zentrifugiert. Das Eluat wurde in gefriergeeignete Reaktionsgefäße überführt und direkt auf Eis gestellt.

Im Anschluss wurde die Konzentration der RNA-Probe bestimmt. Dazu wurde der Probe 1 µl entnommen und diese mit dem Spectrophotometer DeNovix gemessen. Die Konzentration ist entscheidend bei der cDNA Synthese im Thermocycler.

Zunächst wurde ein Blindwert (Blank) mit RNase-freiem Wasser durchgeführt. Mithilfe des Spectrophotometers wurde die UV-Absorption bei 260 nm gemessen, welche sich proportional zur Konzentration der Nukleinsäuren verhält. Der A260-Wert gibt die Absorption bei 260 nm zusammen mit dem Faktor 40 als Konversionsfaktor an. Die erhaltene Konzentrationsangabe wurde in ng/µl angegeben. Der Quotient aus A260/A280 gibt die Reinheit der Probe frei von Proteinen und Phenolen an. Bei RNA sollte der Wert des Quotienten bei ca. 2,0 liegen. Eine Verringerung des Wertes spricht für eine Verunreinigung mit Protein. Die Detektion organischer Substanzen wurde durch den Quotienten A260/A230 angezeigt. Eine Verunreinigung mit organischen Substanzen wie EDTA oder Guanidinsalz, welches im Lysepuffer enthalten

ist, zeigt sich ebenfalls durch eine Verringerung des Quotienten, der nicht unter 2,0 liegen sollte (Koetsier und Cantor 2019).

3.6 Isolation von gDNA

Die isolierte genomische DNA (gDNA) diente der Probengewinnung und weiteren Forschungsarbeiten des Labors.

Je nach erhaltener Zellzahl wird ein bestimmtes Volumen von PBMC in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Für die DNA-Isolation wurden mindestens 1,5 Millionen, jedoch maximal 10 Millionen Zellen eingesetzt. Das Reaktionsgefäß wurde mit PBS + 1 mM-EDTA aufgefüllt und 5 min bei 4° C und 1400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Zellpellet auf Eis gestellt.

Die Isolation der DNA erfolgte mit dem Kit NucleoSpin® Tissue nach Angaben des Herstellerprotokolls.

Das Zellpellet wurde in 200 µl Puffer T1 resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer B3 hinzu pipettiert und gevortext. Im Schüttelinkubator wurde die Suspension bei 70° C für 10 min inkubiert, um so eine Lyse der Zellen zu erreichen. Die NucleoSpin® DNA-Säule wurde in ein vorbereitetes Sammelröhrchen platziert. 210 µl Ethanol (96-100%) wurden zum Lysat hinzugegeben, anschließend kräftig gevortext und dann auf die Säule gebracht. Durch Ethanol wurde eine geeignete Bedingung geschaffen, damit die DNA an der Silicamembran der Sammel tubes binden konnte. Anschließend wurde bei 11000xg bei RT für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule auf das bereitgestellte Sammel tube aufgesteckt. Die folgenden Waschschr itte dienten der Entfernung von Proteinresten und Verunreinigungen. 500 µl Puffer BW wurde auf die Säule pipettiert und bei 11000xg eine Minute bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule auf das gleiche Sammel tube platziert. Im Anschluss wurden 600 µl Puffer B5 auf die Säule pipettiert und bei wiederum einer Minute bei 11000xg und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde danach verworfen und die Säule wieder auf das Sammel tube gesetzt. Zum Trocknen der Säule wurde diese bei 11000xg bei RT eine Minute zentrifugiert. Im Folgenden wurde die Säule in ein vorbereitetes 1,5 ml Eppendor freaktionsgefäß platziert. Um die DNA von der Säule zu eluieren, wurden 30-50 µl Eluationspuffer (Elution Buffer (BE)) aufpipettiert und bei RT eine Minute inkubiert. Der BE löst die Bindung der DNA von der Säule. Je nach Zellzahl wurde die Menge des BE angepasst. Wenn mehr als 5 Millionen PBMC für die DNA-Isolation vorlagen, wurde mit einer Menge von 50 µl eluiert, bei weniger als 5 Millionen wurden 30 µl verwendet. Bei 11000xg bei RT wurde eine Minute zentrifugiert, das Eluat erneut auf die Säule

pipettiert und abzentrifugiert. Dieser Wiederholungsschritt dient der verbesserten Elution der DNA und somit einer Konzentrationserhöhung der DNA im Eluat.

Das Eluat wurde in ein gefriergeeignetes Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. 1 µl wurde entnommen, um mit dem Spectrophotometer die Konzentration zu messen. Ferner wurde mithilfe der Ratios die Probenqualität ermittelt, um über die Reinheit der Probe eine Aussage treffen zu können. Bei der DNA sollte der Quotient A260/A280 bei etwa 1,9 liegen. Eine Verunreinigung mit Proteinen verringert den Wert. Organische Substanzen wie Guanidinsalz oder EDTA reduzieren den Wert von A260/A230, der über 2,3 liegen sollte (Koetsier und Cantor 2019).

Anschließend wurde das Eluat bei -20° C gelagert.

3.7 Proteinseparation

Die isolierten Proteine dienen der Probengewinnung und weiteren Forschungsarbeiten des Labors.

Je nach erhaltener Zellzahl wurde ein bestimmtes Volumen von PBMC in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) überführt. Für die Proteinlyse wurden maximal 10 Millionen Zellen in 1,8 ml Radioimmunpräzipitation-Assay-Puffer (RIPA-Puffer) angesetzt.

Das Reaktionsgefäß wurde mit PBS + 1 mM EDTA aufgefüllt und bei 1400xg bei 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Zellpellet auf Eis gestellt. Je nach Zellzahl wurde der RIPA-Puffer sowie der Protease- und Phosphataseinhibitor angepasst. Bei einer Zellzahl unter 2 Millionen wurden 490 µl RIPA und jeweils 5 µl Protease- und Phosphataseinhibitor hinzugegeben; bei einer Zellzahl zwischen 2 bis 5 Millionen, 980 µl RIPA und jeweils 10 µl der Inhibitoren und bei einer Zellzahl > 5 Millionen, 1,764 ml RIPA und jeweils 18 µl der Inhibitoren. Danach wurde die Suspension gevortext und 15 min auf Eis gestellt. Nachfolgend wurde bei 13500xg bei 4° C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Gefrierreaktionsgefäß überführt und bei -80° C gelagert.

3.8 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Die Genexpression der ausgewählten Gene des mTOR-Signalweges sollten untersucht werden, wofür eine qRT-PCR durchgeführt wurde. Vorbereitend musste die isolierte RNA aller Proben zu cDNA synthetisiert werden. Hierfür wurde eine spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase, verwendet.

Zuvor musste ein Primer angehängt werden, damit die Transkription ablaufen konnte. Da mRNA am 3'-Ende Poly-A (Adenin-Wiederholung) enthält, konnte man einen Primer aus Poly-T (Thymin-Wiederholung) anfügen, von dem aus durch die Reverse Transkriptase die cDNA

in 5'- nach 3'-Richtung gebildet wurde. Diese wurde dann als Ausgangsmatrize zur qRT-PCR-Amplifikation verwendet. Da die ursprüngliche Matrize eine prozessierte RNA war, die das Splicing schon durchlaufen hat, befinden sich auf der cDNA nur Exons (kodierende Abschnitte) des Gens. Die cDNA ist demnach abhängig von der genetischen Aktivität (Passarge 2008).

Zunächst wurden die RNA-Isolate aufgetaut und deren Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) mit dem Spectrophotometer gemessen. Die Konzentration von 1 μg wurde in μl umgerechnet, um so die Menge an zu verwendendem Probenmaterial und Nuklease freiem Wasser mit einem Gesamtvolumen von 14,2 μl zu erreichen. Der cDNA-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10X RT Buffer	2 μl
10X RT Random Primers	2 μl
25X Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix	0,8 μl
MultiScribe [®] Reverse Transcriptase	1,0 μl

Endvolumen **5,8 μl**

Das Gesamtvolumen bestehend aus cDNA-Ansatz und RNA-Mix sollte 20 μl betragen, damit eine Konzentration von 50 ng/ μl erreicht wurde.

Es wurde darauf geachtet, dass die Puffermengen immer an die RNA-Menge angepasst wurden (1 μg RNA in 20 μl Ansatz, 5 μg in 100 μl Ansatz), da ansonsten die Proben nicht untereinander vergleichbar waren. Eine RNA-Probe wurde als Negativkontrolle ausgesucht, indem zu diesem Ansatz keine Reverse Transkriptase hinzugegeben wurde, sondern die äquivalente Menge an Nuklease freiem Wasser.

RNA und Nuklease freies Wasser wurden in 200 μl PCR-Reaktionsgefäße pipettiert, dann wurde 5,8 μl cDNA-Ansatz hinzugegeben ausgenommen bei der Kontrollprobe. Für einige Sekunden wurden die Proben in der Mini-Zentrifuge bei 6000xg zentrifugiert und dann in den Thermocycler gesetzt. Hier läuft die eigentliche cDNA-Synthese ab.

Folgende Programmierung wurde verwendet:

Tabelle 11: Ablauf der cDNA-Synthese (Thermocycler)

	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Cover	Volumen
Temperatur	25° C	37° C	85° C	4° C	105° C	20 μl
Zeit	10 min	120 min	5 min			

Die cDNA (50 ng/μl) wurde bei -20° C aufbewahrt.

Um bei der folgenden qRT-PCR eine Standardreihe erstellen zu können, wurde aus zwei Blutproben RNA isoliert, diese gepoolt und dann in cDNA umgeschrieben.

Zunächst wurden die RNA-Isolate aufgetaut und deren Konzentration (μg/ml) mit dem Spectrophotometer gemessen. Die Konzentration von 50 μg wurde in μl umgerechnet, um so die Menge an zu verwendendem Standardprobenmaterial und Nuklease freies Wasser mit einem Gesamtvolumen von 355 μl zu erreichen. Der cDNA-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10X RT Buffer	50 μl
10X RT Random Primers	50 μl
25X dNTP Mix	20 μl
MultiScribe® Reverse Transcriptase	25 μl

Endvolumen	145 μl
-------------------	---------------

50 μg cDNA befanden sich so in einem Gesamtvolumen von 500 μl, wodurch eine Konzentration von 100 ng/μl erreicht wurde. Für das weitere Vorgehen wurde die Gesamtmenge in 25 x 20 μl Portionen aufgeteilt und in 200 μl PCR-Gefäße pipettiert. Der weitere Verlauf der cDNA Synthese entspricht dem oben Beschriebenen.

3.9 qRT-PCR mit TaqMan™ - Sonden

Mithilfe der quantitativen Realtime PCR wurden die Nukleinsäuren vervielfältigt und gleichzeitig die gewonnene DNA mithilfe von Fluoreszenz-Messungen quantifiziert. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Die verwendete TaqMan™-Sonde bestand aus einem Oligonukleotid (Primer), das an einem Ende einen Reporter- und am anderen Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff trug, vergleiche Abbildung 4. Die Fluoreszenz des Reporters (R) wurde bei intakter Sonde durch einen Quencher (Q) unterdrückt, aufgrund dessen räumlicher Nähe. Zunächst hybridisierte die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Die Taq-Polymerase fungierte als Polymerase, sowie als 5'-3'-Exonuklease. Folglich wurde die TaqMan™-Sonde am 5'-Ende abgebaut, während gleichzeitig der Gegenstrang synthetisiert wurde. Dadurch wurden Quencher und Reporter voneinander getrennt, wodurch die Emission der Reporter-Fluoreszenz gemessen werden konnte, ersichtlich in Abbildung 4. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz war proportional zu der Entstehung von synthetisierten PCR-Produkten (Holzapfel und Wickert 2007).

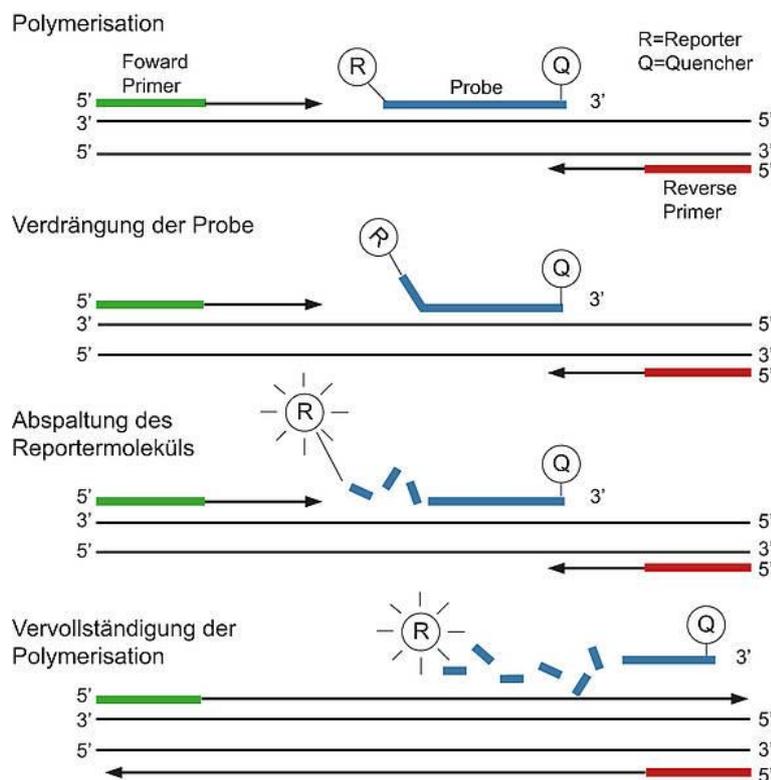


Abbildung 4: Prinzip der TaqMan-Sonden

Quelle: Klein und Rost (2019)

Mit der zuvor umgeschriebenen cDNA des Probanden- und Kontrollkollektivs wurde die mRNA-Expression von den Zielgenen *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* sowie dem Housekeeping Gen *PSMB6* mittels qRT-PCR und mit Hilfe von entsprechenden Gene Expression Assays untersucht. Um eine möglichst genaue mRNA Quantifizierung zu erhalten, wurde die Genexpression eines Zielgens auf das Housekeeping Gen bezogen, wodurch eine relative Quantifizierung möglich wurde (Pfaffl 2004).

Housekeeping Gene beschreiben nicht-regulierte Gene, welche unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden, im Gegensatz zu den regulierten Genen (Rubie et al. 2005; Koolman und Röhm 2009). Rubie et al. (2005) untersuchten die Expressionen mehrere Housekeeping Gene, wobei deutlich wurde, dass *PSMB6* eine stabile Genexpression in den verschiedenen untersuchten Geweben aufwies, weshalb die Verwendung von *PSMB6* in der durchgeführten Studie favorisiert wurde. *PSMB6* kodiert für ein Protein des 20S Proteasom-Komplexes, ein multikatalytischer Proteinasekomplex. Proteasomen befinden sich verteilt in eukaryotischen Zellen und sind für den regulierten Abbau von degradierten Peptiden und Proteinen über das ATP/Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) verantwortlich (NCBI- Gene 2020; Tomko und Hochstrasser 2013).

Zunächst wurden cDNA, TaqMan Gene Expression Assay (Assay on Demand (AoD)) und GoTaq Probe qPCR Master Mix komplett aufgetaut, einige Sekunden gevortext und abzentrifugiert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Das AoD und der Master Mix wurden vor Licht geschützt, da sie Fluorophore enthalten.

Zu 1 ml Master Mix wurde 2 µl Carboxy-XRhodamin (CXR) Reference Dye (30 µM) hinzugegeben und dann für einige Sekunden gevortext. Für jede Probe wurde je ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis vorbereitet und nach dem vorgegebenen Schema (siehe Tabelle 12) pipettiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Master Mix-Ansatzes für eine Probe der qRT-PCR

Master Mix	21,0 µl
AoD	2,1 µl
Nuklease freies Wasser	16,8 µl

Zusätzlich wurde 2,1 µl cDNA (50 ng/µl) hinzugegeben, gevortext und für wenige Sekunden abzentrifugiert. Bei geringer konzentrierter cDNA (25 ng/µl) wurde 4,2 µl cDNA verwendet und 14,7 µl Nuklease freies Wasser.

Es wurden außerdem zwei Negativkontrollen erstellt. Bei der ersten Negativkontrolle wurde statt cDNA eine noRT-Kontrolle in den Ansatz pipettiert, bei der zweiten Negativkontrolle wurde Nuklease freies Wasser statt cDNA verwendet.

Außerdem wurde eine Standardreihe aus sechs Standards (STD) mit Konzentrationen zwischen 450 ng/µl und 1 ng/µl erstellt. Ausgehend vom synthetisierten cDNA Standard (100 ng/µl) wurden Vorverdünnungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgenommen (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Zusammensetzung der Vorverdünnungen für die Standardreihe

Vorverdün- nung		Nuklease freies Wasser	Endkonzentration
1	5 µl aus 100 ng/µl	5 µl	50 ng/µl
2	1 µl aus 100 ng/µl	9 µl	10 ng/µl
3	1 µl aus 50 ng/µl	9 µl	5 ng/µl
4	1 µl aus 10 ng/µl	9 µl	1 ng/µl

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurde die Standardreihe nach dem Pipettierschema in Tabelle 14 hergestellt. Anschließend wurde jeweils 2,1 µl AoD und 21 µl Master Mix hinzugegeben, gevortext und abzentrifugiert.

Tabelle 14: Pipettierschema für Standardreihe

	STD 1: 450 ng	STD 2: 100 ng	STD 3: 50 ng	STD 4: 25 ng	STD 5: 5 ng	STD 6: 1 ng
cDNA	9,45 µl aus 100 ng/µl	2,1 µl aus 100 ng/µl	2,1 µl aus 50 ng/µl	2,1 µl aus 10 ng/µl	2,1 µl aus 5 ng/µl	2,1 µl aus 1 ng/µl
Nuklease freies Was- ser	9,45 µl	16,8 µl	16,8 µl	13,65 µl	16,8 µl	16,8 µl

Alle Proben, Kontrollen und Standards wurden als Duplikate auf die MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate pipettiert. Pro Well wurden 20 µl eingesetzt. Danach wurde die Platte luftdicht mit dem MicroAmp™ Optical Adhesive Film verschlossen und bei RT bei 1000xg für 5 min zentrifugiert. Die fertige 96-Well Platte wurde in das 7500 Real-Time PCR System gesetzt und entsprechend Tabelle 15 programmiert, damit die TaqMan qRT-PCR ablaufen konnte. Die qRT-PCR wurde anschließend mithilfe der Standardkurvenmethode ausgewertet.

Tabelle 15: Programmierung des 7500 Real-Time PCR Systems zur TaqMan qRT-PCR

Schritt	Enzymaktivierung	PCR	
	HOLD	40 Zyklen	
		Denature	Anneal/ Extend
Temperatur (°C)	95° C	95° C	60° C
Zeit	2 Minuten	15 Sekunden	60 Sekunden

3.10 Statistische Auswertung

Die erzielten Ergebnisse der qRT-PCR mit TaqMan™- Sonden wurden auf Basis der relativen Quantity-Werte (Qty) ausgewertet. Die Quantities wurden durch die Software des 7500 Real-Time PCR Systems nach der relativen Standardkurvenmethode nach Livak und Schmittgen (2001) bestimmt.

Nach Doppelbestimmung der Quantities wurde das arithmetische Mittel (MW) berechnet, welcher in Relation zur Expression zum Housekeeping-Gen *PSMB6* gesetzt wurde, siehe Formel 2.

Formel 2: Berechnung der relativen Zielgenexpression

$$\frac{Qty_{Zielgen}}{Qty_{PSMB6}}$$

So konnten die relativen Expressionen von *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* patientenbezogen zu allen Zeitpunkten bewertet werden.

Ferner wurde die relative Genexpression der Zielgene mit dem Mittelwert der Kontrollkohorte sowie patientenbezogen zu den verschiedenen Studienzeitpunkten verglichen, um so eine Veränderung der Genexpression prä- und postoperativ zu untersuchen.

Der unverbundene Vergleich von Probanden mit Kontrollen wurde anhand Formel 3 errechnet.

Formel 3: Berechnung der relativen Zielgenexpression bei unverbundenem Vergleich

$$\frac{\frac{Qty\ Zielgen}{Qty\ PSMB6}}{MW\ aus\ \frac{Qty\ Zielgen}{Qty\ PSMB6}}$$

Der verbundene Vergleich der Probanden mit sich selbst zu verschiedenen Zeitpunkten wurde wie in Formel 4 ermittelt.

Formel 4: Berechnung der relativen Zielgenexpression bei verbundenem Vergleich

$$\frac{\frac{Qty\ Zielgen}{Qty\ PSMB6}\ zum\ Zeitpunkt\ PräOP}{\frac{Qty\ Zielgen}{Qty\ PSMB6}\ zum\ Zeitpunkt\ VCD}$$

Aus den ermittelten Einzelwerten der Probanden wurden anschließend das arithmetische Mittel gebildet, um Verzerrungen innerhalb der Probandenpopulation zu minimieren.

Mithilfe des verbundenen und unverbundenen t-Test (normalverteilt) sowie des Mann-Whitney-U- und Wilcoxon-Test (nicht zwingend normalverteilt) wurden die Ergebnisse auf Signifikanz geprüft. Dabei wurde $p < 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt. In den Abbildungen sind Hinweise zur Signifikanz ersichtlich, siehe Tabelle 16.

Tabelle 16: Festlegung der Signifikanz

-	nicht signifikant
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,0001$

Die im Folgenden dargestellten Werte stellen Mittelwerte dar, sofern nicht gesondert erklärt. Die Abweichungen in den Grafiken präsentieren den Standardfehler des Mittelwerts (standard error of mean (SEM)).

4. Ergebnisse

4.1 Patienten- und Kontrollkohorte

Die Patientenkohorte umfasste 22 Probanden, davon 16 weiblich und 6 männlich mit einem durchschnittlichen Alter von 42 Jahren. Das normalgewichtige Kontrollkollektiv (n = 20) bestand aus 14 weiblichen und 6 männlichen Probanden mit einem mittleren Alter von 37 Jahren.

Alle bariatrischen Operationen der untersuchten Patienten wurden laparoskopisch durchgeführt. 68% der Probanden erhielten einen Schlauchmagen (n = 15), 27% einen RYGB (n = 6) und 5% eine OLAGB (n = 1). In drei Fällen kam es zu Komplikationen wie Anastomoseninsuffizienz, Revision eines Schlauchmagens und Umbau eines Schlauchmagens in einen RYGB.

4.1.1 Verlauf von Gewicht und BMI

Das Kontrollkollektiv charakterisierte sich durch einen mittleren BMI von 22,32 kg/m² bei einem durchschnittlichen Gewicht von 64,55 kg und einer Größe von ca. 1,70 m. Abbildung 5 zeigt den Verlauf des BMI und des Gewichts der Probanden, beginnend mit einem durchschnittlichen BMI von 56,89 kg/m² und ca. 164,20 kg VCD.

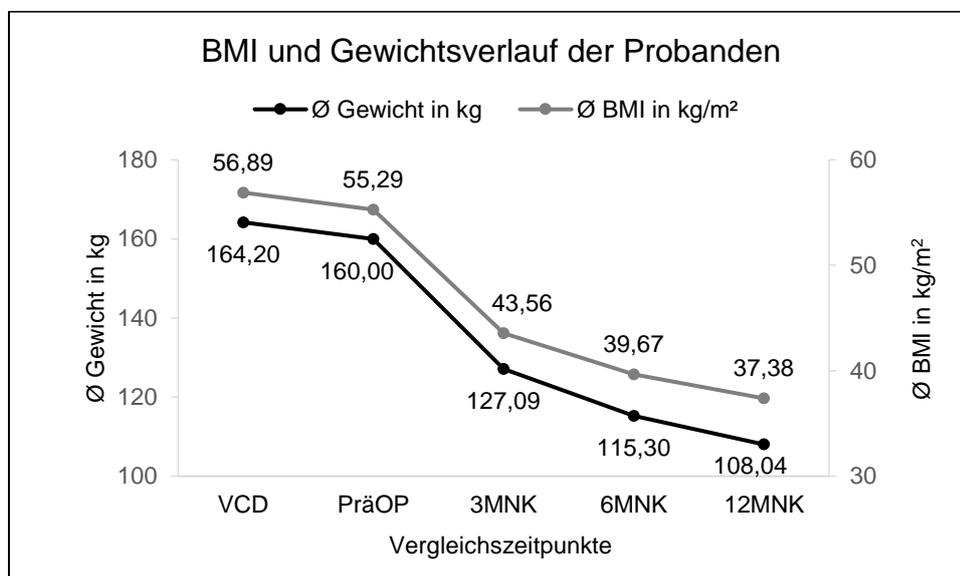


Abbildung 5: BMI und Gewichtsverlauf der Probanden

Nach der Crash-Diät zeigte sich im Mittel ein Gewichtsabfall von ca. 4 kg mit einem geringen Abfall des BMI um 1,6 kg/m² ($p < 0,05$). Nach der bariatrischen Operation kam es zu einem starken Gewichtsverlust zum Zeitpunkt der 3MNK von durchschnittlich 32,91 kg (-20,27%) bei n = 20 ($p < 0,0001$) im Vergleich zum präoperativen Zustand. Im weiteren postoperativen

Verlauf zeigte sich ein weiterer Gewichtsabfall bei allen Patienten ($n = 18$), wie in Abbildung 5 dargestellt ist. Im Mittel erreichten die Patienten zum Zeitpunkt der 6MNK eine Gewichtsreduktion von ca. 28% zum präoperativen Gewicht (ca. -44,71 kg) ($p < 0,0001$). 6 Monate nach Anlage eines Schlauchmagens oder eines RYGB zeigte sich eine Reduktion des Gewichtes von ca. 27% (SG: $n = 11$; RYGB: $n = 6$) und nach OLAG von ca. 37% ($n = 1$). Die operativen Verfahren unterschieden sich in der durchgeführten Studie nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

Zur 12MNK konnte der BMI und das Gewicht meist weiter reduziert werden, wie Abbildung 5 zu entnehmen ist ($n = 17$). Nach einem Jahr konnte ein mittleres Gewicht von ca. 108 kg und ein BMI um ca. 37 kg/m² erreicht werden ($p < 0,0001$), siehe Abbildung 5. Somit zeigte sich im Mittel eine Reduktion des Gewichtes um mehr als 32% ein Jahr nach dem bariatrischen Eingriff (-51,97 kg) ($p < 0,0001$). Nach RYGB zeigte sich tendenziell eine stärkere Gewichtsreduktion (ca. 32%; $n = 10$) im Vergleich zur Schlauchmagenanlage (ca. 30%; $n = 6$), wenn auch nicht signifikant nachweisbar.

In Abbildung 6 lässt sich der postoperative BMI-Verlauf mit einer signifikanten Reduktion des mittleren BMI um 21,22% drei Monate postoperativ ($p < 0,0001$) erkennen. Im Weiteren zeigte sich eine Abnahme des BMI von ungefähr 28% nach sechs Monaten, sowie von mehr als 32% ein Jahr nach dem bariatrischen Eingriff ($p < 0,0001$).

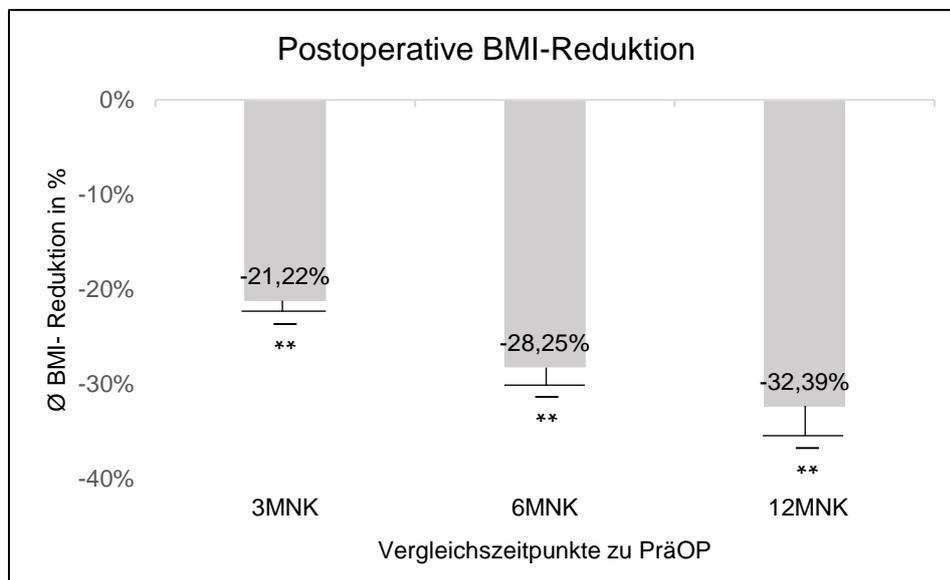


Abbildung 6: Postoperative BMI-Reduktion

** entspricht $p < 0,0001$. Dargestellt sind außerdem die Standardfehler des Mittelwertes.

Um den Erfolg einer bariatrischen Operation standardisiert zu messen, erfolgt die Quantifizierung mittels Berechnung des EWL in %. Dabei wird von einem BMI = 25 kg/m² als Idealgewicht

ausgegangen. Im Adipositas Kollektiv ließ sich im Mittel ein Idealgewicht von ungefähr 72 kg errechnen bei einer mittleren Körpergröße von 1,70 m. Präoperativ zeigte sich ein Übergewicht von mehr als 120% (87,64 kg). Postoperativ ließ sich im Verlauf ein signifikanter Anstieg ($p < 0,0001$) des EWL auf ca. 57% nach 12 Monaten erkennen (Abbildung 7). Bei einem EWL von mehr als 50% wird eine bariatrische Operation als erfolgreich angesehen.

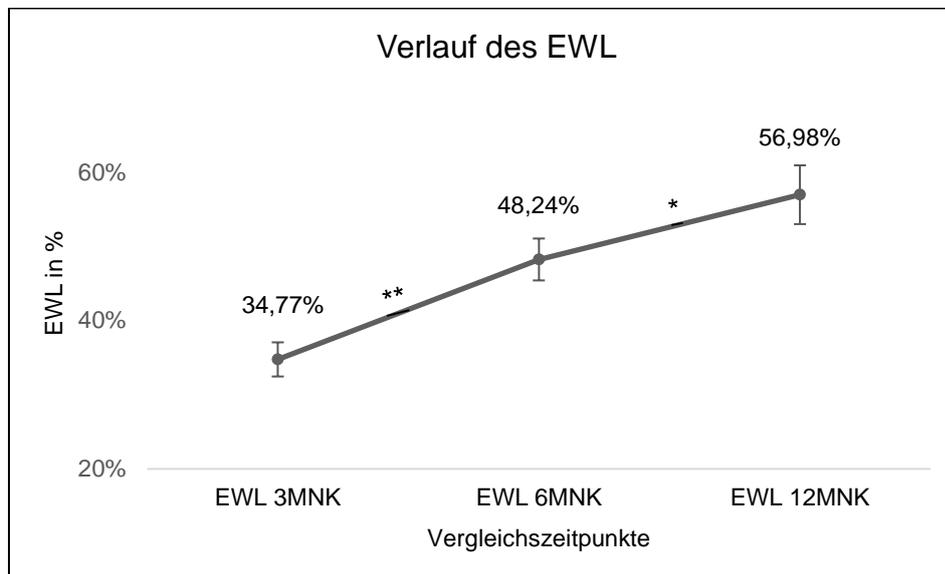


Abbildung 7: Postoperativer EWL-Verlauf

* entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,0001$. Signifikanz bestimmt zwischen EWL 3MNK und 6MNK ($p = 0,0000002$), zwischen 6MNK und 12MNK ($p = 0,00019$) und zwischen 3MNK und 12MNK ($p < 0,0001$). Dargestellt sind außerdem die Standardfehler des Mittelwertes.

4.1.2 Komorbiditäten und deren postoperative Veränderung

Neben der Adipositas zeigten sich bei fast allen Patienten weitere Komorbiditäten, siehe Abbildung 8. Mehr als ein Drittel der Patienten aus dem Adipositaskollektiv stellte sich mit mindestens drei Komorbiditäten und mehr als ein Fünftel mit bis zu vier Komorbiditäten vor.

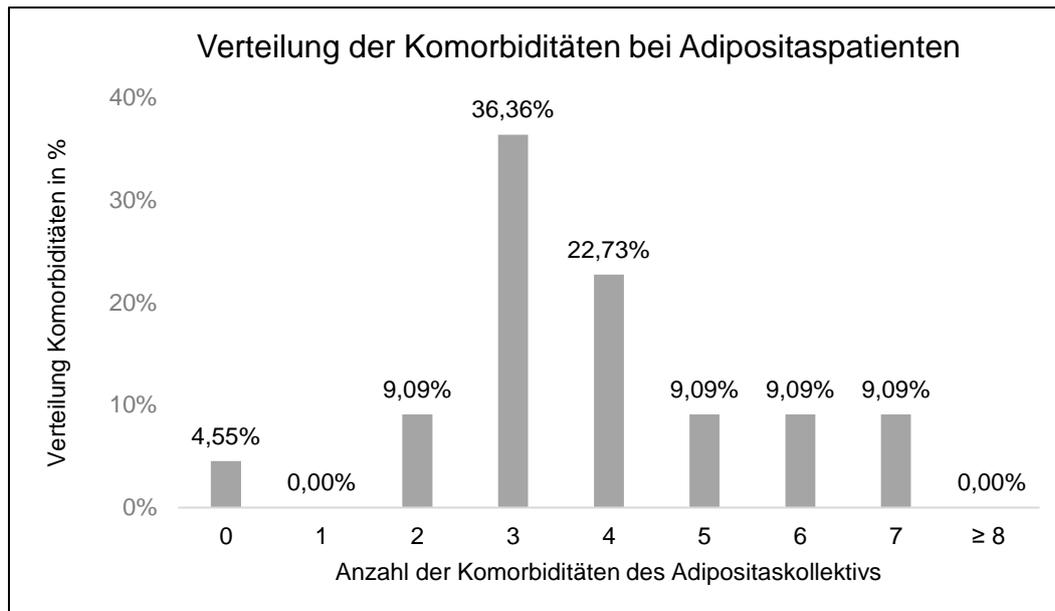


Abbildung 8: Verteilung der Komorbiditäten bei Adipositaspatienten

Die Komorbiditäten wurden jeweils einfach gezählt, sodass beispielsweise Probanden mit drei Komorbiditäten nicht in die Gruppe von einer oder zwei Komorbiditäten gezählt wurden

Die häufigste Komorbidität bei mehr als 60% der Patienten stellte die arterielle Hypertonie (aH) dar, gefolgt vom T2DM und dem Halswirbelsäulen/ Lendenwirbelsäulen- (HWS/LWS-) Schmerzsyndrom (Abbildung 9). 10 von 22 Patienten litten sowohl unter T2DM und als auch einem erhöhten Blutdruck. Sechs Patienten stellten sich entweder mit T2DM oder arterieller Hypertonie vor. Weitere sechs Probanden wiesen weder einen T2DM noch eine arterielle Hypertonie auf.

Ungefähr die Hälfte der Patienten präsentierte eine Hypothyreose, eine Cox-/ Gonarthrose sowie pulmonale Einschränkungen (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und Asthma) (Abbildung 9). Bei ungefähr einem Drittel der Patienten kamen Gastritiden bzw. Refluxbeschwerden (GERD) sowie Depressionen und psychiatrische Erkrankungen hinzu (Abbildung 9). Fettstoffwechselstörungen wie Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie, Varikosis und Tiefe Beinvenenthrombose (TVT) sowie Gallenblasenbeschwerden zeigten sich bei ca. 20% der Adipositaspatienten. Drei der 22 Probanden wiesen eine Krebserkrankung in der Anamnese auf (Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT)-Lymphom, Malignes Melanom, Rektumkarzinom).

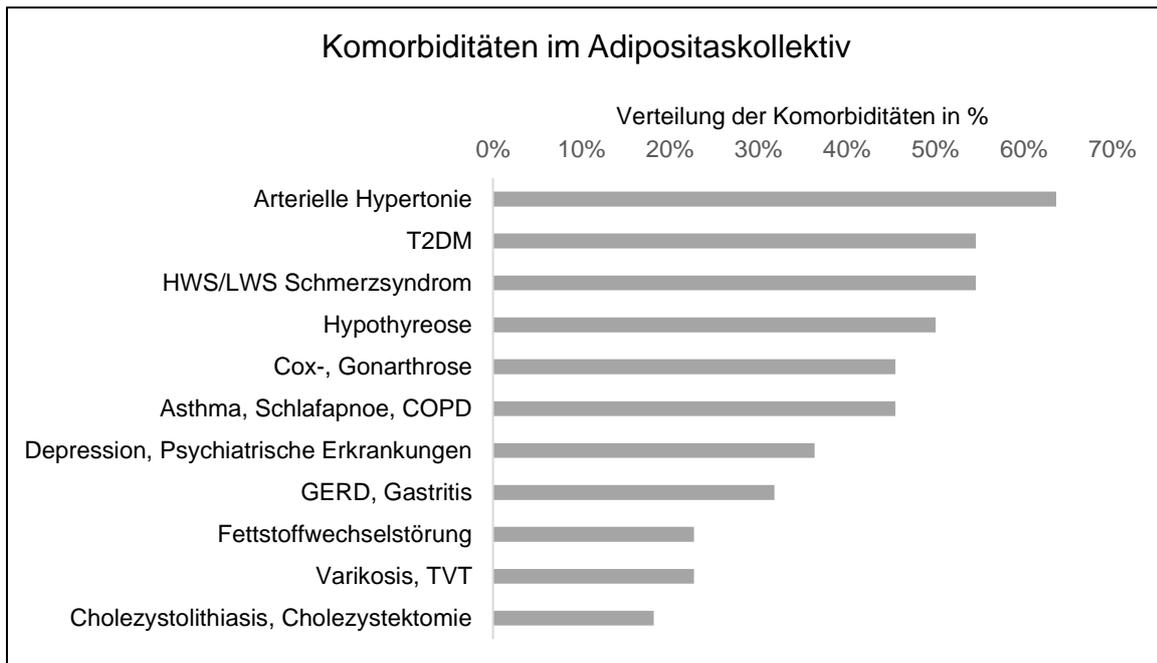


Abbildung 9: Untersuchte Komorbiditäten im Adipositaskollektiv

Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, wiesen 12 der 22 Patienten sowohl vor der Crash-Diät als auch präoperativ einen T2DM auf. Durch die Crash-Diät zeigte sich hier keinen Einfluss auf den T2DM. Postoperativ zeigte sich ein deutlicher Rückgang der T2DM-Patienten, verdeutlicht in Abbildung 10. Nach drei Monaten erwies sich die Reduktion als noch nicht signifikant in der Diabetes-Gruppe ($p = 0,0829$), jedoch konnte nach sechs ($p = 0,0423$) sowie nach 12 Monaten ($p = 0,0043$) ein deutlicher Rückgang an Diabetikern verzeichnet werden.

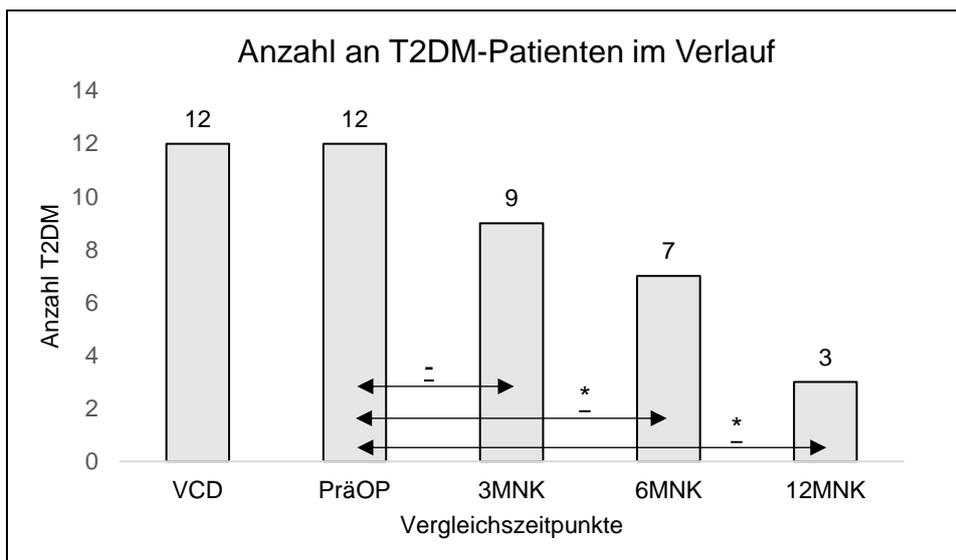


Abbildung 10: Anzahl an T2DM-Patienten im Verlauf

- entspricht nicht signifikant; * entspricht $p < 0,05$

In den Nachkontrollen konnten alle T2DM-Patienten ($n = 12$) ihre Medikation, sowohl orale Antidiabetika als auch Insulin reduzieren. Ferner konnte die Medikation aller Bluthochdruckpatienten ($n = 14$) postoperativ gesenkt werden.

4.2 Vergleichende mRNA-Expression von *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* im prä- und postoperativen Verlauf mit den Kontrollen

Im Vergleich zum normalgewichtigen Kontrollkollektiv zeigten die bariatrischen Patienten präoperativ eine deutlich erhöhte mRNA-Expression von *mTOR*, *p70S6K* und *AKT*, siehe Abbildung 11. Vor der Crash-Diät wiesen *p70S6K* und *AKT* eine 1,6-1,8-fach höhere Expression ($p = 0,066$; $p = 0,0004$) auf, während *mTOR* eine bis zu 2,8-fach verstärkte Expression aufzeigte ($p < 0,0001$). Durch die folgende Diät zeigte sich keine Reduktion der mRNA-Expression. *mTOR* und *p70S6K* verfügten sogar über leicht erhöhte Expressionen (Abbildung 11).

Postoperativ verringerte sich die mRNA-Expression aller drei Gene, jedoch zeigte nur *p70S6K* eine signifikante Abnahme auf ca. 40-60% in den ersten fünf postoperativen Tagen ($p < 0,0001$) im Vergleich zur Expression des Kontrollkollektivs. Die monatlichen Nachkontrollen zeigten einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expressionen im Vergleich zum Kontrollkollektiv auf das bis zu 1,3-Fache bei *p70S6K* ($p = 0,003$) und das 2,3-2,7-Fache bei *AKT* ($p = 0,0002$) und *mTOR* ($p < 0,0001$) (Abbildung 11).

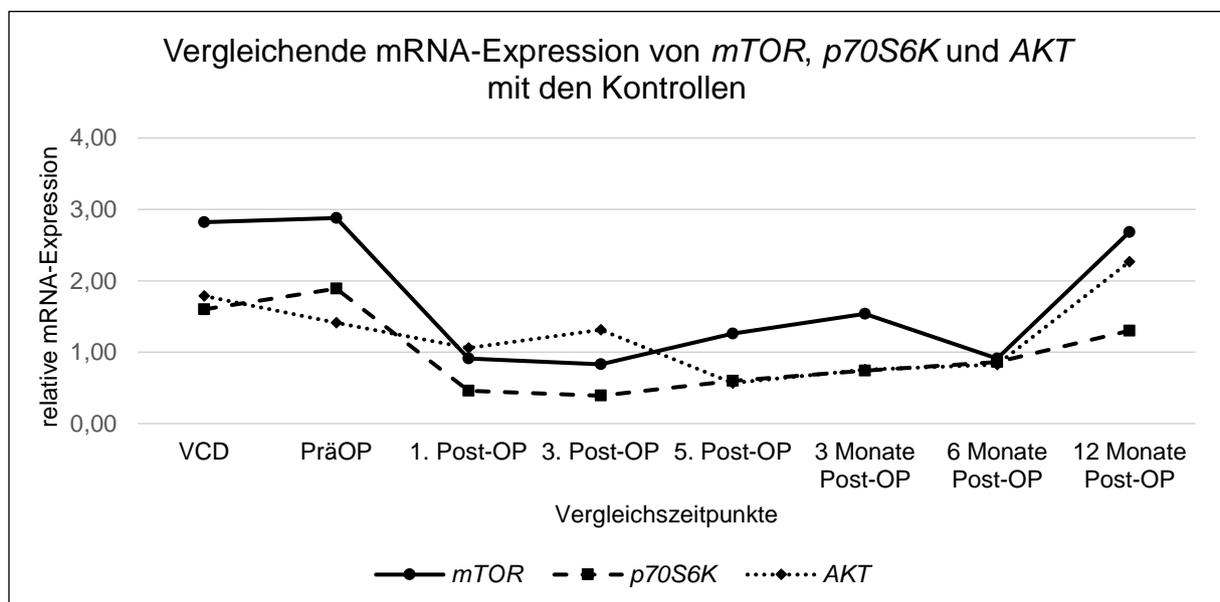


Abbildung 11: Vergleichende mRNA-Expression von *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* mit den Kontrollen

4.3 Veränderung der Genexpression einzelner Gene auf mRNA-Ebene

Die Veränderung der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde nach den drei zu untersuchenden Genen aufgeteilt und ausgewertet.

4.3.1 *mTOR*: Direkte postoperative Reduktion der *mTOR* mRNA-Expression

Die *mTOR* mRNA-Expression präoperativ wurde mit der Expression postoperativ zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen (Abbildung 12). Deutlich erkennbar war die verringerte mRNA-Expression von *mTOR* am 1. Post-OP-Tag ($p < 0,0001$). Die Expression reduzierte sich signifikant um ca. 70% zum Zustand präoperativ, ersichtlich in Abbildung 12. Im Verlauf zeigte sich am 3. Post-OP-Tag eine ähnlich geringe mRNA-Expression von *mTOR* im Vergleich zum präoperativen Zustand ($p < 0,0001$). Eine leichte Zunahme am 5. Post-OP-Tag ($p < 0,0001$) und bei der 3MNK ($p = 0,0014$) auf ungefähr 50-60% der ursprünglichen Expression lässt sich aus Abbildung 12 entnehmen. Die mRNA-Expression verringerte sich signifikant bis zur 6MNK auf ungefähr 41% ($p < 0,0001$). 12 Monate nach der Operation zeigte sich weiterhin eine verringerte mRNA-Expression mit ca. 87% im Vergleich zum präoperativen Zustand ($p > 0,05$).

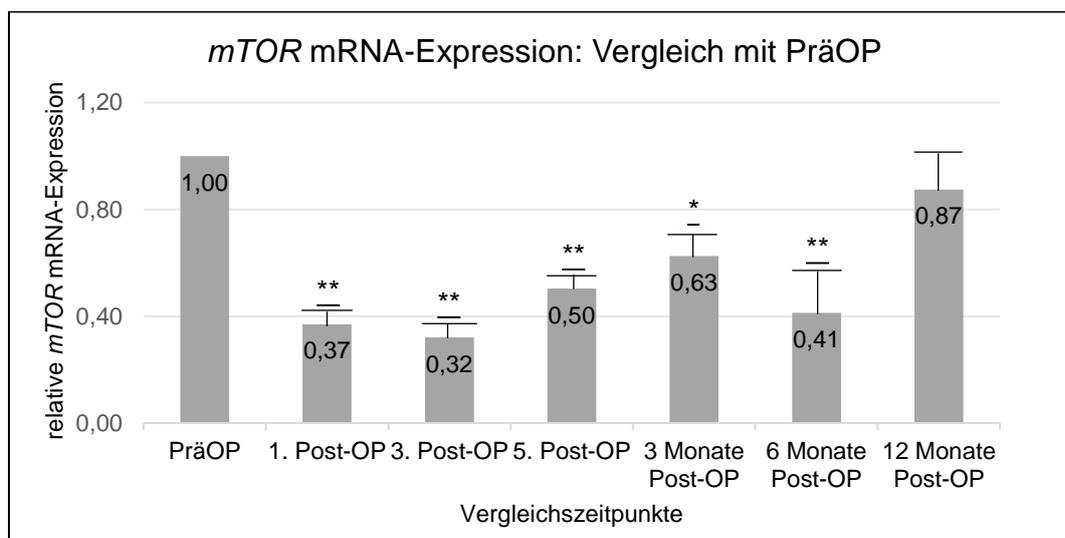


Abbildung 12: *mTOR* mRNA-Expression: Vergleich mit PräOP

* entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,0001$. Dargestellt sind außerdem die Standardfehler des Mittelwertes.

Zur weiteren Examinierung der Daten wurde die *mTOR* mRNA-Expression VCD mit den weiteren nachfolgenden Vergleichszeitpunkten analysiert (Abbildung 13). Die mRNA-Expression von *mTOR* stieg nicht signifikant zum präoperativen Zeitpunkt auf das 1,4-Fache an ($p = 0,9421$). An den postoperativen Tagen zeigte sich ein signifikant starker Abfall der Expression um ca. 60% ($p < 0,0001$) im Vergleich zur Expression VCD. Am 5. Post-OP-Tag und zum

Zeitpunkt der 3MNK stieg die *mTOR* mRNA-Expression leicht auf maximal 70% der ursprünglichen Expression (VCD) an ($p < 0,0001$; $p = 0,0014$). Ähnlich wie im Vergleich des präoperativen Zustands mit der 6MNK (Abbildung 12), stellte sich dies auch im Vergleich mit der VCD dar (siehe Abbildung 13). Die mRNA-Expression von *mTOR* erreichte einen minimalen Wert von ungefähr 29% ($p < 0,0001$). Ein Jahr postoperativ stieg die *mTOR* mRNA-Expression um ca. 32% des Ausgangswertes an und erreichte keine signifikante Änderung zum Zustand VCD (Abbildung 13).

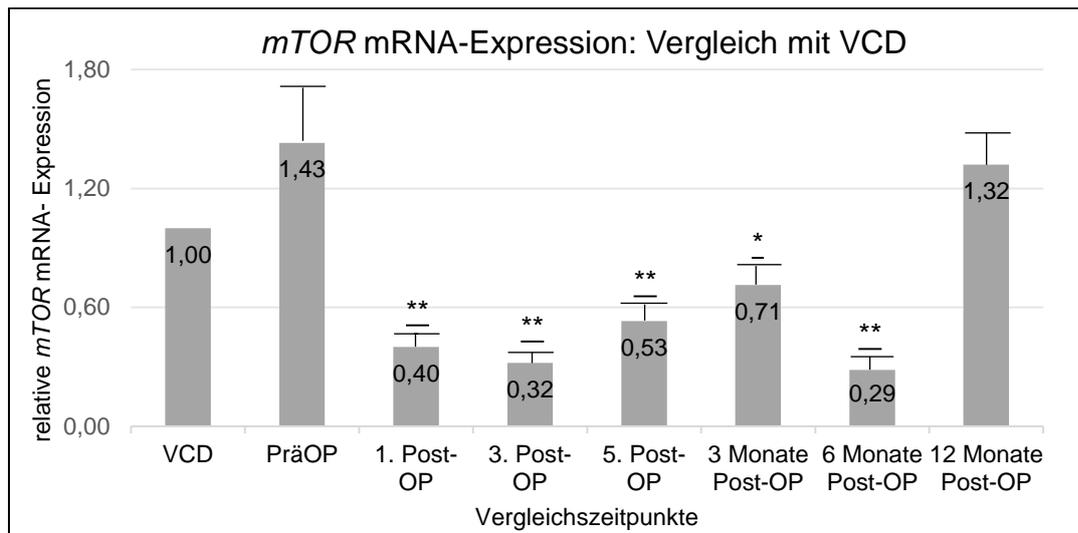


Abbildung 13: *mTOR* mRNA-Expression: Vergleich mit VCD

* entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,0001$. Dargestellt sind außerdem die Standardfehler des Mittelwertes.

4.3.2 *p70S6K*: Konkordante Reduktion der *p70S6K* mRNA-Expression zur *mTOR* mRNA-Expression

Das direkte Downstream-Target des *mTORC1*, *p70S6K* zeigte eine ähnliche Reduktion der mRNA-Expression postoperativ, vergleiche Abbildung 12 und Abbildung 14. Am 1. Post-OP-Tag sank die mRNA-Expression auf ca. 36% im Vergleich zum präoperativen Zustand ($p < 0,0001$). In den folgenden postoperativen Tagen, siehe Abbildung 14, zeigte sich eine verringerte mRNA-Expression ($p < 0,0001$). Bei den späteren Monats-Nachkontrollen ließ sich ein geringer Anstieg der Expression erkennen, jedoch lag diese zwischen 50-78% und zeigte sich damit signifikant reduziert im Vergleich zur präoperativen mRNA-Expression ($p < 0,0001$; $p = 0,0005$; $p = 0,01$) (Abbildung 14).

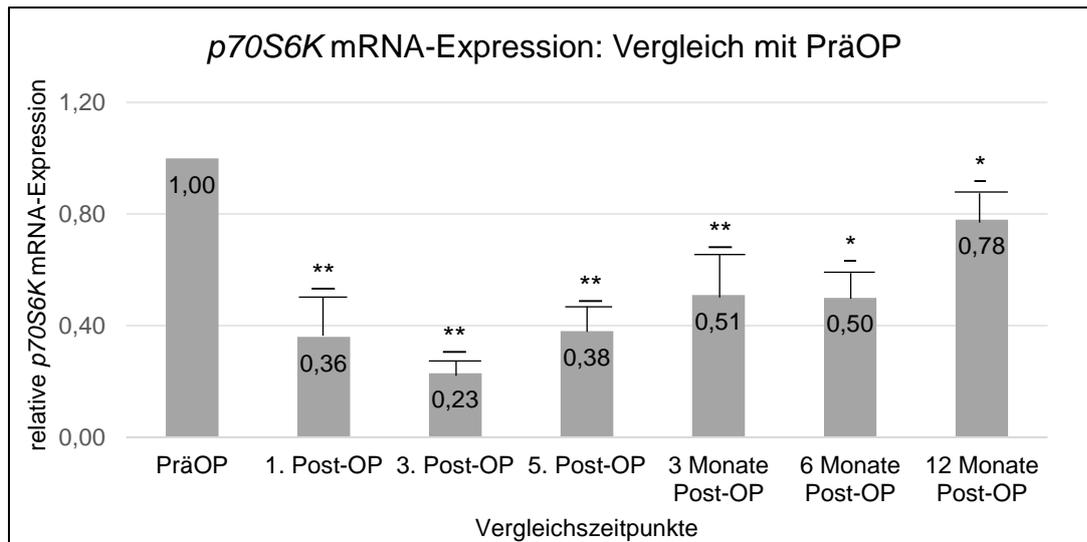


Abbildung 14: p70S6K mRNA-Expression: Vergleich mit PräOP

* entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,0001$. Dargestellt sind außerdem die Standardfehler des Mittelwertes.

4.3.3 AKT: heterogene mRNA-Expression

AKT als Bestandteil des *mTORC2* zeigte in den ersten postoperativen Tagen keine signifikante Reduktion der Genexpression auf mRNA-Ebene, siehe Abbildung 15. Am 5. Post-OP-Tag bis zur 6MNK ließ sich eine Verringerung der Expression um ca. die Hälfte beobachten (5. Post-OP und 3MNK: $p < 0,0001$; 6MNK: $p = 0,009$). Ein Jahr nach dem bariatrischen Eingriff lag die mRNA-Expression von AKT mehr als 75% über der präoperativen Expression ($p = 0,048$) siehe Abbildung 15.

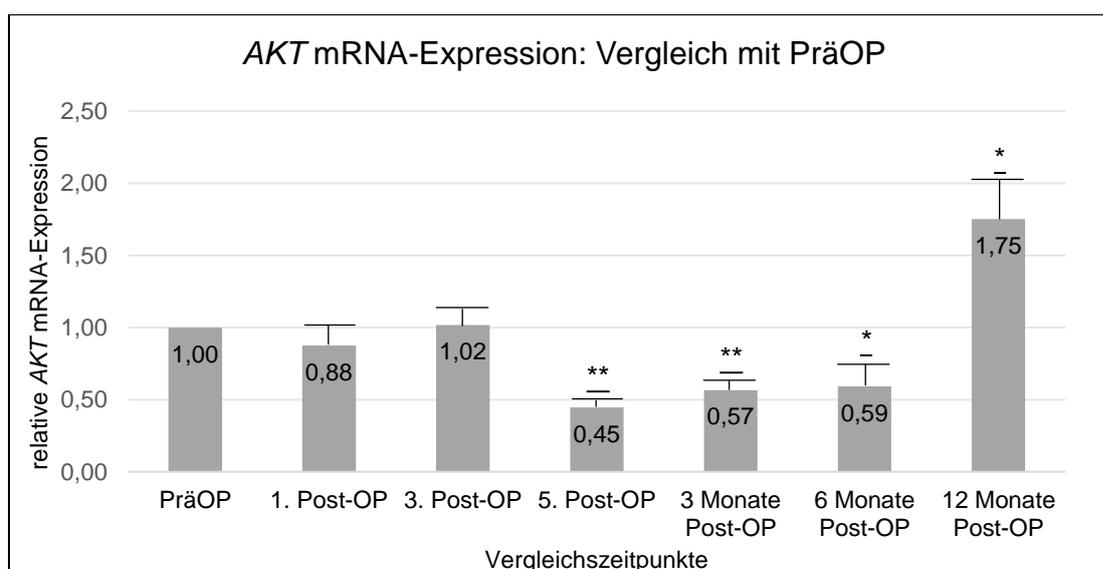


Abbildung 15: AKT mRNA-Expression: Vergleich mit PräOP

* entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,0001$. Dargestellt sind außerdem die Standardfehler des Mittelwertes.

4.4 Vergleich des Verlaufs der mRNA-Expressionen der Zielgene

Die Expressionen auf mRNA-Ebene von *mTOR* und *p70S6K* zeigten eine simultane signifikante Reduktion im postoperativen Verlauf im Vergleich zum Zustand VCD, verdeutlicht in Abbildung 16. *AKT* zeigte im Vergleich zu *mTORC1* ein heterogenes Bild mit einer Reduktion der mRNA-Expression erst am 5. Post-OP-Tag im Vergleich zur direkten signifikanten Reduktion der mRNA-Expression des *mTORC1*. Im Verlauf der 3MNK und 6MNK lag die mRNA-Expression der drei Zielgene signifikant unter der Expression VCD. Ein Jahr postoperativ wiesen *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* eine ähnliche mRNA-Expression auf, welche ungefähr der Expression zum Zeitpunkt VCD entsprach.

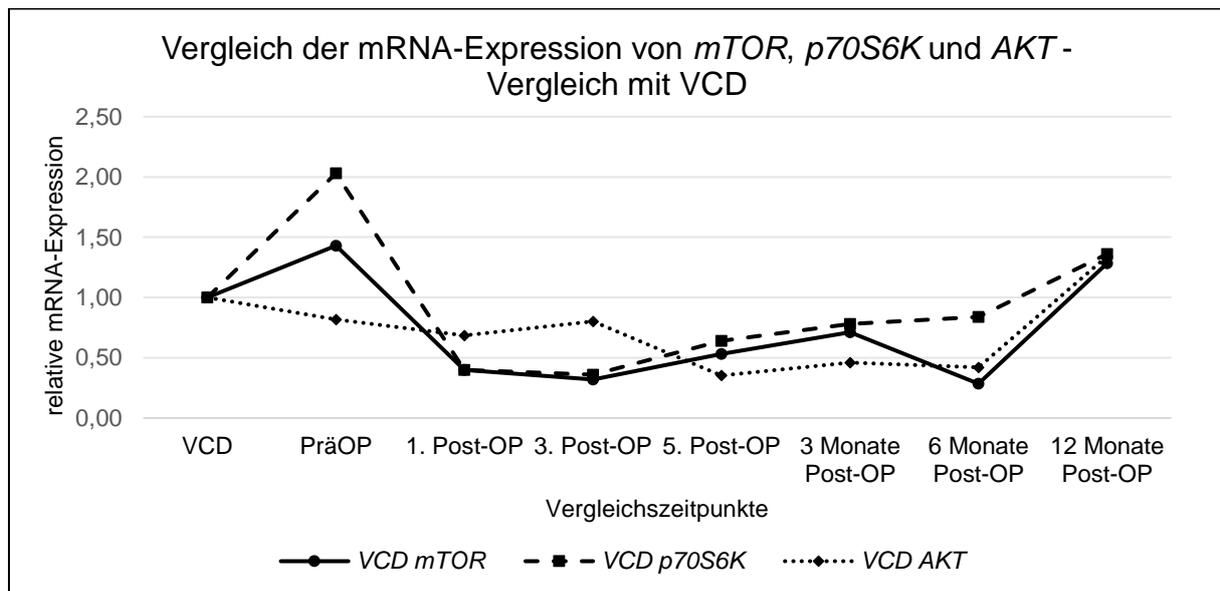


Abbildung 16: Vergleich der mRNA-Expressionen von *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* mit VCD

4.5 Korrelation der postoperativen klinischen Parameter mit der mRNA-Expression

Das Gewicht der Probanden und die mRNA-Expression von *mTOR* zeigten eine signifikante Korrelation von 0,71 ($p = 0,0004$), dargestellt in Abbildung 17. Zu den Zeitpunkten VCD und präoperativ wiesen die Adipositasprobanden sowohl ein hohes Gewicht als auch eine erhöhte *mTOR* mRNA-Expression im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe auf. Im Verlauf ließ sich eine Reduktion des mittleren Gewichts und der relativen *mTOR* mRNA-Expression erkennen (Abbildung 17).

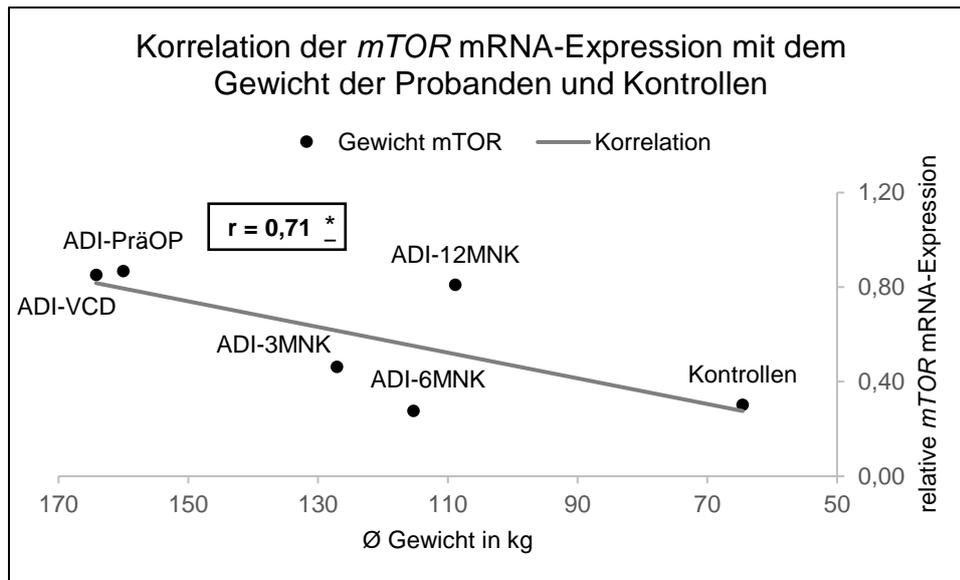


Abbildung 17: Korrelation der *mTOR* mRNA-Expression mit dem Gewicht der Probanden und Kontrollen
 * entspricht $p < 0,05$

Eine ähnliche Korrelation ließ sich beim Verlauf der mRNA-Expression von *p70S6K* und dem Gewicht in Abbildung 18 erkennen. Die signifikante Korrelation von 0,63 ($p = 0,0004$) zeigte den positiven Zusammenhang zwischen erhöhtem Gewicht und verstärkter *p70S6K*-Genexpression auf mRNA-Ebene zum Zeitpunkt VCD und präoperativ. Im Verlauf reduzierte sich sowohl das Gewicht als auch die *p70S6K* mRNA-Expression. Die Kontrollkohorte wies ein deutlich geringeres Gewicht sowie auch eine geringere *p70S6K* mRNA-Expression als die Adipositasgruppe auf (Abbildung 18).

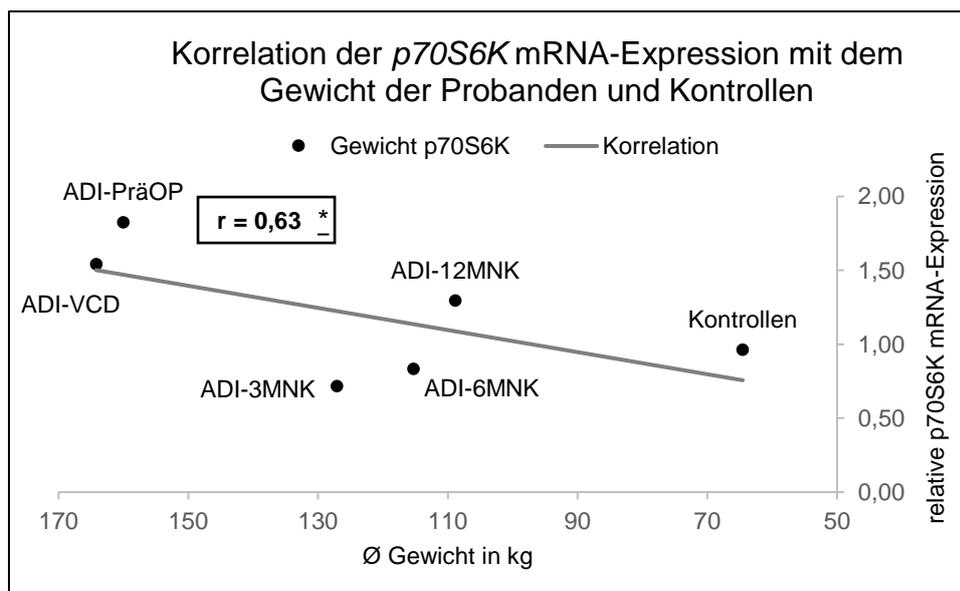


Abbildung 18: Korrelation der *p70S6K* mRNA-Expression mit dem Gewicht der Probanden und Kontrollen

* entspricht $p < 0,05$

Bei *AKT* zeigte sich im Gegensatz zu *mTOR* und *p70S6K* eine geringere Korrelation ($r = 0,27$; $p = 0,0004$).

4.6 Vergleich der Adipositaspatienten mit und ohne T2DM in Bezug auf die *mTOR* mRNA-Expression

Die Untersuchung der *mTOR* mRNA-Expression des Adipositaskollektivs mit T2DM zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kohorte der Nicht-Diabetiker des Adipositaskollektivs im Vergleich zum Zustand VCD ($p > 0,05$), siehe Abbildung 19. Präoperativ zeigte sich bei 12 Patienten ein T2DM mit einer ähnlichen relativen mRNA-Expression wie die der 10 Nicht-Diabetikern. Im Verlauf kam es zu einer Remission des T2DM um ca. 75%, während sich die mRNA-Expressionen der beiden Gruppen im gesamten Verlauf nicht signifikant unterschiedlich präsentierten, siehe Abbildung 19.

Die mRNA-Expressionen von *p70S6K* und *AKT* skizzierten ein ähnliches Bild. Ferner zeigte sich im Vergleich des Gewichtes kein signifikanter Unterschied. Die T2DM-Patienten präsentierten sich präoperativ mit einem durchschnittlichen Gewicht von 159 kg, die Nicht-Diabetiker mit einem mittleren Gewicht von ca. 161 kg. Im Verlauf zeigten beide Gruppen eine ähnliche Gewichtsreduktion mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 109 kg nach 12 Monaten postoperativ.

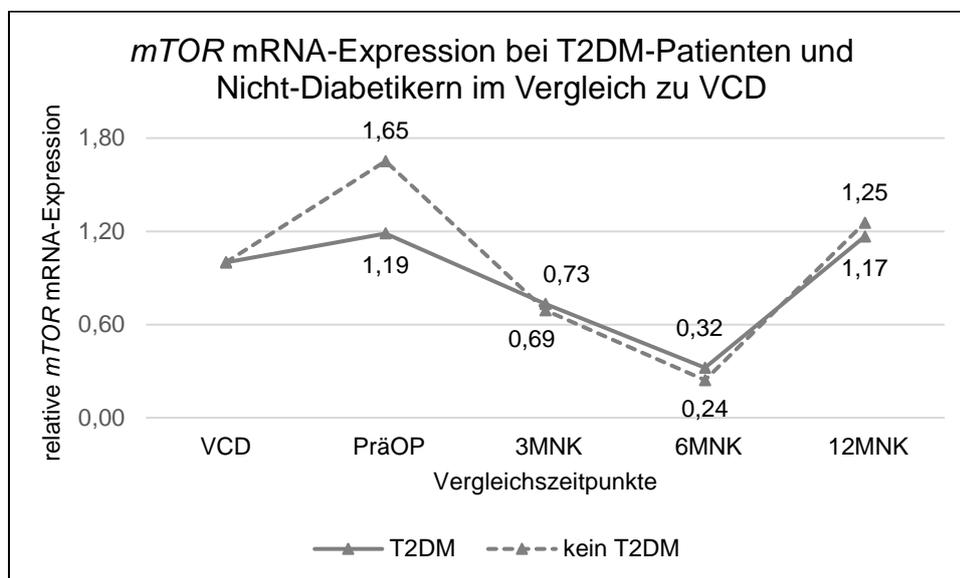


Abbildung 19: *mTOR* mRNA-Expression bei T2DM-Patienten und Nicht-Diabetikern im Vergleich zu VCD

4.7 Vergleich der *mTOR* mRNA-Expression mit den durchgeführten bariatrischen operativen Verfahren

Die *mTOR* mRNA-Expression unterschied sich nicht signifikant nach den unterschiedlichen operativen Verfahren (SG und RYGB) zu den postoperativen Vergleichszeitpunkten im Vergleich zum Zustand VCD.

Nach drei (SG: $p = 0,011$; RYGB: $p = 0,029$) sowie nach sechs Monaten (SG: $p = 0,009$; RYGB: $p = 0,011$) postoperativ ließ sich eine signifikante Reduktion der *mTOR* mRNA-Expression nach SG und RYGB erkennen, siehe Abbildung 20. Jedoch unterschieden sich die *mTOR* mRNA-Expression nach Anlage des Schlauchmagens und nach RYGB nicht signifikant voneinander.

Drei Monate postoperativ zeigte sich nach Schlauchmagenanlage eine Reduktion der *mTOR* mRNA-Expression um 46% zum präoperativen Zeitpunkt. Nach RYGB wurde eine Reduktion um 29% zum präoperativen Zustand erreicht, siehe Abbildung 20. Zur 6MNK reduzierte sich die *mTOR* mRNA-Expression nach RYGB um 86% und somit stärker als nach SG (75%).

Ein Jahr postoperativ glich sich die *mTOR* mRNA-Expression wieder der präoperativen Expression an, unabhängig des verwendeten Operationsverfahrens (SG: $p = 0,464$; RYGB: $p = 0,05$), ersichtlich in Abbildung 20.

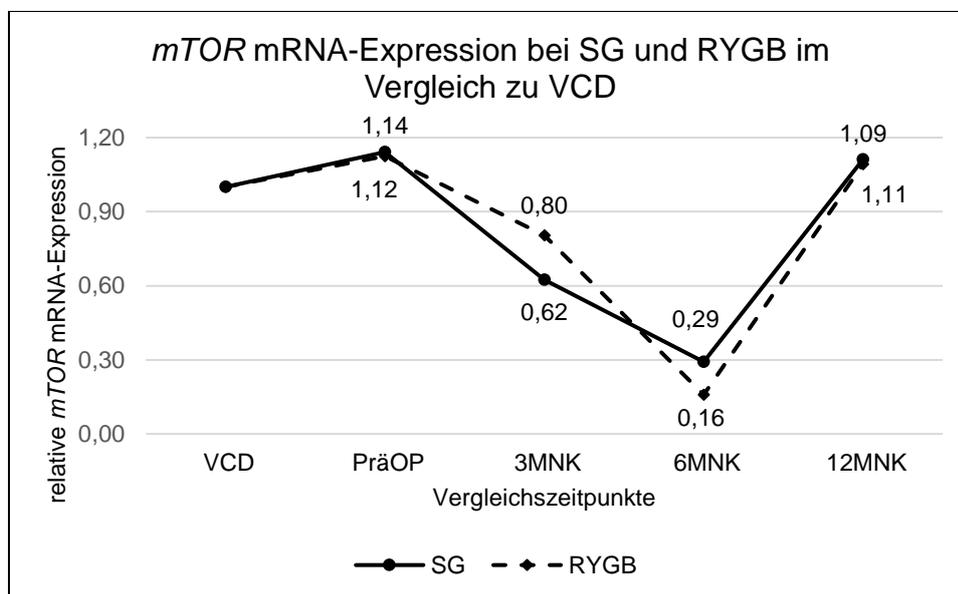


Abbildung 20: *mTOR* mRNA-Expression bei SG und RYGB im Vergleich zu VCD

5. Diskussion

Die Adipositasprobanden stellten sich präoperativ mit zahlreichen Komorbiditäten im Vergleich zur alters- und geschlechtskongruenten Kontrollgruppe vor. Arterielle Hypertonie, T2DM und Schmerzsyndrome konnten vordergründig eruiert werden. Die negativen Auswirkungen der Adipositas ließen sich nicht nur klinisch manifestieren, sondern auch auf molekularbiologischer Ebene im mTOR-Stoffwechselweg.

5.1 Pathologischer Zustand des mTOR-Stoffwechselweges durch Übergewicht

mTOR reguliert den Lipid- und Glucosemetabolismus und spielt somit eine Schlüsselrolle in metabolischen Erkrankungen wie T2DM und Adipositas. Rubie et al. (2019) untersuchten den Zusammenhang zwischen Adipositas, T2DM und dem mTOR-Stoffwechselweg. Die Phospho-mTOR- und p70S6-Kinase-Spiegel sowie die *mTOR* mRNA-Expression zeigten sich deutlich erhöht bei älteren T2DM-Patienten im Vergleich zur alters- und BMI-kongruenten Kontrollgruppe ohne T2DM. Des Weiteren konnte eine Verbindung zwischen T2DM, dem mTOR-Stoffwechselweg sowie ihn regulierenden microRNAs beobachtet werden. Die relative miR-496 RNA-Expression zeigte sich deutlich reduziert bei den Probanden mit T2DM im Vergleich zu einem gesunden alters- und BMI-angepassten Kontrollkollektiv. Ferner wurde eine negative Korrelation zwischen dem BMI und der relativen miR-496 RNA-Expression entdeckt. Je höher der BMI, desto niedriger die relative miR-496 RNA-Expression. miR-496 reguliert möglicherweise die post-transkriptionelle Expression von *mTOR* und *p70S6K* und könnte zu einer Veränderung der mRNA-Translation von mTOR führen (Rubie et al. 2019).

In der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass Adipositas neben massiven Komorbiditäten zu einer verstärkten Expression des mTOR-Stoffwechselweges führte. Anabole Stoffwechselprozesse wie die Glykolyse, die Proteinsynthese sowie die Adipo- und Lipogenese wurden verstärkt aktiviert (Liu und Sabatini 2020). mTOR und p70S6K korrelierten positiv mit dem Gewicht. Rubie et al. (2019) konnten dies ebenfalls im Versuch mit Adipositas- und T2DM-Patienten zeigen. Hier konnte eine verstärkte mTOR Genexpression auf Proteinebene bei Adipositas II° und III° gefunden werden, im Vergleich zu Übergewichtigen und Adipositas I°.

Beim direkten Vergleich der *mTOR* mRNA-Expressionen der Adipositasprobanden mit und ohne T2DM konnte kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit charakterisierten sich die Probanden jedoch durch einen durchschnittlichen BMI von 57 kg/m² (Adipositas ≥ III°) präoperativ. Ab einem gewissen Grad des Übergewichts, stellt sich möglicherweise zunehmend eine diabetische Stoffwechsellage ein.

Die Adipositaspatienten ohne T2DM zeigten somit schon eine ähnlich erhöhte mRNA-Expression von *mTOR* und *p70S6K*, jedoch noch keinen manifesten Diabetes. Möglicherweise verändert sich der mTOR-Stoffwechselweg bei massiver Adipositas in einen präpathologischen bzw. prädiabetischen Zustand, bevor dieser klinisch detektierbar wurde.

Abbildung 21 soll den Übergang vom physiologischen zum prä-pathologischen bis hin zum pathologischen diabetischen Zustand veranschaulichen.

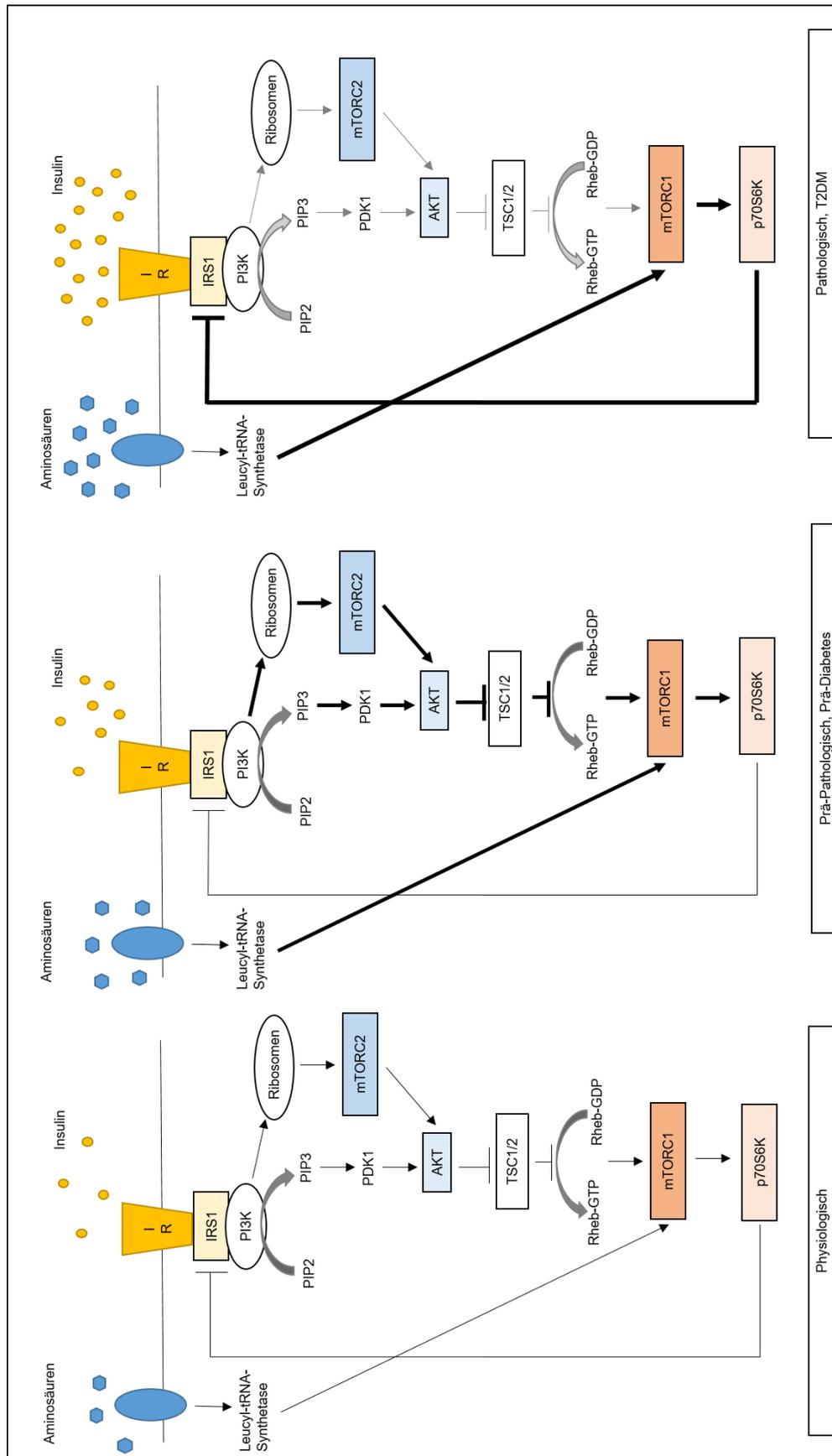


Abbildung 21: Vom physiologischen zum pathologischen Zustand des mTOR-Stoffwechselweges bei Adipositas und T2DM

Quelle: Eigene Darstellung modifiziert nach Um et al. (2006) und Dazert und Hall (2011)

Die verschiedenen Haupteinflüsse auf den mTOR-Stoffwechselweg wie Insulin, Aminosäuren und das Fettgewebe werden im Folgenden genauer beleuchtet.

5.1.1 Einfluss von Insulin

Das Überangebot an Nahrung mit einer simultan verstärkten Insulinausschüttung aktiviert den mTOR-Stoffwechselweg stark (Abbildung 21). Insulin als Wachstumsfaktor bindet an den membranständigen Rezeptor, welcher das intrazelluläre IRS und folgend die PI3-Kinase aktiviert. Folglich wird PIP₃ sowie mTORC2 aktiviert, wodurch AKT vermehrt exprimiert wird. AKT wiederum dient als Upstream-Target von mTORC1 im Insulinstoffwechselweg. mTORC1 wird somit durch verstärktes Insulinangebot vermehrt exprimiert (Yoon 2017; Tremblay et al. 2007).

Khamzina et al. (2005) zeigten bei normalgewichtigen Ratten nach Insulininfusion eine 5-fach (mTOR) bis 20-fach (p70S6K) verstärkte Phosphorylierung in Hepatozyten bei zuvor kaum nachweisbarer Phosphorylierung. Das IRS ist vor der Insulingabe kaum phosphoryliert und liegt somit bei den normalgewichtigen Ratten im physiologischen Zustand vor. Durch die Insulingabe wird das IRS verstärkt phosphoryliert, wodurch der Mechanismus der negativen Rückkopplung des mTOR-Stoffwechselweges untermauert wird, siehe Abbildung 21. Bei den übergewichtigen Ratten ließ sich eine basale 4- bis 5-fach erhöhte Phosphorylierung von mTOR und p70S6K schon vor der Insulininfusion erkennen. Dies verdeutlicht die gewonnene Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, dass sich die mRNA-Expressionen von *mTOR* und *p70S6K* der Adipositas kohorte präoperativ deutlich erhöht präsentieren, im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrollprobanden.

Nach Insulingabe stieg die mTOR- und p70S6K-Phosphorylierung der übergewichtigen Ratten in der Studie von Khamzina et al. (2005) auf das ca. 3-fache an. Das IRS wird wenige Minuten nach Insulingabe ebenfalls phosphoryliert, jedoch zeigte sich ein geringerer Anstieg der Phosphorylierungsaktivität im Vergleich zu den normalgewichtigen Ratten. Dies weist darauf hin, dass der Stoffwechselweg durch Übergewicht in eine Dysbalance gerät, indem auf Stoffwechselprodukte wie Insulin verändert reagiert wird.

P70S6K als Downstream-Target von *mTOR* zeigte beim Adipositas kollektiv eine deutlich erhöhte mRNA-Expression präoperativ. Catalán et al. (2015) konnten in ihrer Studie mit normal- und übergewichtigen Patienten eine verstärkte mRNA-Expression von *p70S6K* im Fettgewebe übergewichtiger Patienten nachweisen. Nach Gabe von Insulin in Fettgewebeproben adipöser Patienten zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *p70S6K* in den Adipozyten (Catalán et al. 2015). Somit deutet eine verstärkte Expression von *mTOR* und *p70S6K* in adipösen Ratten und Menschen auf einen pathologischen Zustand hin.

Übergewichtige scheinen zudem an die erhöhten Insulinspiegel gewöhnt zu sein. Durch gesteigerte Nahrungsaufnahme und der folgenden Hyperglykämie wird die Insulinausschüttung aus dem Pankreas verstärkt aktiviert. Insulin dient wiederum als direkter Aktivator des mTOR-Stoffwechselweges, welcher immer stärker aktiviert wird. Abhängig vom Insulinspiegel steigert sich die Expression von *p70S6K* (Catalán et al. 2015).

Im Gegensatz dazu zeigten sich *p70S6K*-Knockout-Mäuse (*p70S6K*^{-/-}-Mäuse) in der Studie von Um et al. (2004) resistent gegen Übergewicht trotz high-fat-diet (HFD). Gleichzeitig wiesen diese Mäuse eine reduzierte β -Zellmasse auf, wodurch sie weniger Insulin produzierten. Jedoch konnten normale bis leicht erhöhte Glukosewerte nach Nahrungsgabe erreicht werden. Um et al. (2004) gehen neben einer gesteigerten β -Oxidation und Lipolyse von einer besseren Insulinsensitivität aus. Unter HFD zeigten die *p70S6K*^{-/-}-Mäuse keine verstärkte Phosphorylierung des IRS, wodurch sich keine Insulinresistenz ausbilden konnte. Um et al. (2004) verdeutlichen, dass *p70S6K* eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des T2DM spielt. Durch die verstärkte mRNA-Expression von *p70S6K* bei den Adipositasprobanden VCD und präoperativ, erhöht sich parallel das Risiko, an einem T2DM und an weiteren Komorbiditäten zu erkranken.

5.1.2 Einfluss von Aminosäuren

Bei Adipositas und T2DM lassen sich neben erhöhten Glukose- und Insulinspiegeln auch vermehrt Aminosäuren, vor allem verzweigtkettige Aminosäuren finden. Valin, Leucin und Isoleucin können vom Körper nicht synthetisiert werden, sodass diese nur durch vermehrte Nahrungszufuhr gehäuft im Körper zu finden sind (Siddik und Shin 2019). Aminosäuren aktivieren verstärkt die Leucyl-transfer-RNA-(tRNA)-Synthetase (RagGTPase), welche direkt mTORC1 aktiviert (Yoon et al. 2016), verdeutlicht in Abbildung 21. Beim Adipositaskollektiv ließ sich neben der 2,8-fach erhöhten *mTOR*-Expression auf mRNA-Ebene, eine 1,6-fach erhöhte mRNA-Expression von *p70S6K* im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen.

Vermehrte Proteineinnahme ist assoziiert mit Insulinresistenz und Glukoseintoleranz (Linn et al. 2000). Tremblay et al. (2005) zeigten in ihrer Studie nach Infusion von Aminosäuren bei gesunden normalgewichtigen Probanden eine verstärkte Phosphorylierung des IRS an Ser312 und Ser633/639 und folglich eine verringerte Aktivität der PI3-Kinase im Insulin-stimulierten Zustand. Die erhöhte Genexpression im mTOR-Stoffwechselweg in Anwesenheit von Proteinen wird möglicherweise hauptsächlich durch die verstärkte Aktivierung der Leucyl-tRNA-Synthetase vermittelt. Bei AKT konnte keine verringerte Phosphorylierung als direkte Reaktion beobachtet werden (Tremblay et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrollen sogar eine erhöhte mRNA-Expression von *AKT* ermittelt werden. Diese logische Diskrepanz könnte durch bisher unbekannt beeinflussende Faktoren

im Insulin- und mTOR-Stoffwechselweg entstehen, welche in den bisher durchgeführten Studien noch nicht erfasst werden konnten.

5.1.3 Einfluss des Fettgewebes

Das Fettgewebe dient nicht nur als Lipidspeicher, sondern fungiert auch als hormonaktives System. Proinflammatorische Faktoren wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) wurden im Fettgewebe adipöser Probanden vermehrt exprimiert (Catalán et al. 2015). Die daraus folgende unterschwellige dauerhafte Entzündung im Körper wurde als weiterer Grund des Übergewicht-assoziierten T2DM angenommen (Lumeng und Saltiel 2011). TNF α hemmt den TSC direkt, welcher mTORC1 durch eine verstärkte Disinhibition aktiviert (Zhang et al. 2008). Dadurch waren die *mTOR* und *p70S6K* mRNA-Expressionen bei Übergewichtigen deutlich höher als bei Normalgewichtigen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Neben der Insulinausschüttung werden auch weitere Wachstumsfaktoren im Körper durch vermehrtes Nahrungsangebot sezerniert, welche über den Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg zu einer Hemmung des TSC führen und somit zu einer verstärkten mTORC1-Genexpression (Dazert und Hall 2011).

Die Aktivität von mTOR führt zu einer Steigerung des Anabolismus bei gleichzeitiger Hemmung des Katabolismus. Durch die stetige exzessive Aktivierung des mTOR-Stoffwechselwegs reagiert der Metabolismus folglich mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus mit einer Hemmung des IRS an der Zellmembran. P70S6K phosphoryliert das IRS an verschiedenen Serin- und Threoninresten, was zu einer Konformationsänderung des IRS und folglich zu einer Insulinresistenz an der Zellmembran führt (Shah und Hunter 2006; Tremblay et al. 2007). Dies könnte ein Erklärungsmodell zur Entstehung des T2DM durch Übergewicht darstellen, verdeutlicht in Abbildung 21.

5.1.4 Inhomogene Reaktion des mTORC2 auf Übergewicht und T2DM

Dem Pathogenesemodell (Abbildung 21) folgend, sollte durch die verstärkte Phosphorylierung und Hemmung des IRS, der PI3K/AKT-Weg verringert aktiviert werden.

Chen et al. (2015) versuchten in einer Studie mit adipösen Patienten prä- und postoperativ des RYGB im Vergleich mit Normalgewichtigen, diesen Mechanismus zu zeigen. Die Genexpression von AKT und die folgende Phosphorylierung an Thr308 waren präoperativ jedoch nicht signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der vorliegenden Studie konnte eine ca. 1,8-fach erhöhte mRNA-Expression von *AKT VCD* im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Khamzina et al. (2005) kamen im Tierversuch zu einem ähnlichen Ergebnis,

indem gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT in übergewichtigen Ratten verstärkt ist, verglichen mit Normalgewichtigen. Nach Insulininfusion wiesen die Normalgewichtigen eine stärkere Phosphorylierung als die Übergewichtigen auf. Im insulinensiblen normalgewichtigen Zustand kann der Organismus auf Insulin reagieren, wohingegen Übergewicht und T2DM zu einer Dysfunktion des mTOR-Stoffwechselweges führen. Der Unterschied der Modellvorstellung und den verschiedenen *in-vivo* Studienergebnissen zeigt, dass möglicherweise noch weitere Mechanismen oder Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren auf die Genexpression und Aktivität von AKT bei Übergewicht und Insulinresistenz einwirken.

Ferner zeigten Studien mit *mTORC2*^{-/-}-Mäusen verschiedene Effekte in den unterschiedlichen Geweben. Leberspezifische *Rictor*^{-/-}-Mäuse präsentierten eine verringerte AKT-Phosphorylierung mit folgender hepatischer Insulinresistenz (Hagiwara et al. 2012). Auch Mäuse mit *Rictor*^{-/-} im Fettgewebe in der Studie von Kumar et al. (2010) wiesen eine verringerte Phosphorylierung von AKT auf, sowie einen metabolischen Zustand ähnlich des T2DM. Skelettmuskel-spezifische *Rictor*^{-/-}-Mäuse von Bentzinger et al. (2008) zeigten keine Veränderung der Insulinsensitivität trotz reduzierter AKT-Phosphorylierung. Des Weiteren zeigten Bentzinger et al. (2008), dass die Aktivierung von AKT durch die PI3K nicht zwangsläufig durch mTORC2 geschehen muss. Dies unterstreicht das inhomogene Aktivierungs- und Phosphorylierungsverhalten von AKT. Durch die Verwendung von PBMC von adipösen Patienten in der vorliegenden Arbeit verhält sich die Genexpression von *AKT* auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig wie in *in-vitro* Studien oder Tierversuchen, somit resultiert hieraus eine eingeschränkte Interpretationsmöglichkeit mit einer eher inhomogenen Auslegung.

Die Untersuchung von mTORC2 zur genaueren Funktion, Regulation und Expression sollte Gegenstand weiterer Grundlagenforschung sein, um der Erklärung pathologischer Zustände wie Diabetes mellitus und Adipositas näher zu kommen.

5.2 Veränderung der *mTOR* mRNA-Expression durch Crash-Diät

Präoperativ führten die Patienten eine proteinreiche hypokalorische Diät durch, um einerseits Gewicht zu verlieren und um andererseits die Operation zu erleichtern. Durch die 14-tägige Eiweißphase verkleinerte und verfestigte sich die Leber, wodurch die peri- und postoperativen Komplikationen reduziert werden sollten (Mechanick et al. 2013).

Eine signifikante Gewichtsreduktion zeigte sich in dieser Phase nicht. Im Mittel nahmen die Probanden 4 kg ab. Diese geringfügige Gewichtsreduktion spiegelte sich nicht im mTOR-Stoffwechselweg wider. Die *mTOR* mRNA-Expression stieg um ca. 40%, die *p70S6K* mRNA-Expression sogar auf das Doppelte des Ausgangswertes. Dies lässt sich durch eine verstärkte Aktivität der Leucyl-tRNA-Synthetase erklären, welche durch ein vermehrtes Aminosäure-

angebot induziert wurde. Folglich wurde mTORC1 noch stärker als VCD direkt und unabhängig des IRS-PIP₃-AKT-TSC-Weges aktiviert, ersichtlich in Abbildung 21. Der pathologische Zustand des mTOR-Stoffwechselweges wurde durch die Diät verschärft. Die zunehmende Hemmung des IRS durch p70S6K wurde noch weiter verstärkt. Folgend wurde die PI3-Kinase verringert aktiviert, wodurch die Genexpression von AKT signifikant auf ca. 80% reduziert wurde.

Die Verschlechterung der Dysbalance des mTOR-Stoffwechselweges durch die proteinreiche Crash-Diät sollte Anlass sein, die Indikation dieser Form der präoperativen Crash-Diät zu überdenken. In Bezug auf die Operabilität bei proteinärmerer präoperativer Diät sollten weitere Studien evaluiert bzw. durchgeführt werden. Vorteilhaft wäre eine präoperative Vorbereitung mit minimalem OP-Risiko und geringstmöglicher negativer Stoffwechselveränderung.

5.3 Signifikante postoperative Veränderungen des mTOR-Stoffwechselweg

Die direkte Reaktion des Metabolismus wurde nach dem bariatrischen Eingriff deutlich.

5.3.1 Frühe postoperative Reaktion

Am 1. postoperativen Tag sank die *mTOR* mRNA-Expression signifikant auf ca. 37% des präoperativen Zustandes. Das Downstream-Target von *mTOR*, *p70S6K* wies eine ähnliche Reduktion der Expression auf ca. 36% auf. Durch die postoperative Nahrungskarenz wurde *mTORC1* geringer aktiviert, da weniger Aminosäuren, Glukose und Insulin zur Verfügung standen. Die signifikante direkte Reduktion der mTORC1-Genexpression zeigten auch Sengupta et al. (2010) im Versuch mit Mäusen, welche 24 h nüchtern waren.

Dieser Vermutung folgend, zeigte sich am 3. postoperativen Tag eine Reduktion der mRNA-Expression des *mTORC1* auf ca. 30% des Ausgangszustandes. Im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrollprobanden sank die Expression von *mTOR* auf ca. 85% und *p70S6K* auf ca. 40% der Expression der Normalgewichtigen. Damit lässt sich die These unterstützen, dass Nahrungsrestriktion wie im postoperativen Zustand zu einer signifikanten Reduktion von *mTORC1* führte, obwohl die Adipositasprobanden direkt postoperativ nur wenig an Gewicht verloren haben. Der entscheidende Faktor der Expressionsänderung scheint somit die Reaktion auf die Einnahme von Nahrung zu sein. Ferner wird auch der Einfluss verringerter intrazellulärer Energie durch Abnahme von ATP nach Glukosereduktion beschrieben. Die AMP/ATP-Ratio steigt und aktiviert die AMPK, welche mTOR direkt hemmt (Gwinn et al. 2008).

Die mRNA-Expression von *AKT* zeigte in den ersten postoperativen Tagen keine signifikante Veränderung. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass durch den pathologischen Zustand

des mTOR-Stoffwechselweges das IRS gehemmt und degradiert wird, wie Harrington et al. (2004) und Um et al. (2004) beschreiben. Dadurch verringert sich die Expression von mTORC2. Der pathologische insulinresistente Zustand entsteht möglicherweise schleichend im Verlauf der Gewichtszunahme und der Entwicklung des T2DM. Schnelle postoperative Veränderungen des mTORC1 mit signifikanter Reduktion der Genexpression scheinen somit keinen Einfluss auf das IRS zu haben, da die Hemmung nicht so schnell abgebaut werden kann. Der pathologische Zustand der Insulinresistenz löst sich möglicherweise deutlich langsamer auf, als die Reaktion des mTORC1 vermuten lässt. Diese These unterstützt die Entwicklung des T2DM, welcher sich nicht direkt postoperativ veränderte, sondern erst im späteren Verlauf ab ca. drei Monaten. Folglich scheinen noch weitere Faktoren neben dem mTOR-Stoffwechselweg an der Auflösung der Insulinresistenz beteiligt zu sein, welche weiter untersucht werden sollten, um ein besseres Verständnis des T2DM zu erlangen.

Am 5. postoperativen Tag begann bei den Adipositaspatienten der Kostaufbau im Krankenhaus, welcher sich in einer direkten Reaktion des mTOR-Stoffwechselweges manifestierte. Die mRNA-Expressionen von *mTOR* und *p70S6K* stiegen leicht an und lagen im Durchschnitt noch bei ca. der Hälfte der Expression vor der Crash-Diät. Die Nahrungswiederaufnahme führte somit direkt zu einer Stimulation des *mTORC1*. Dieses Phänomen zeigten auch Sengupta et al. (2010) an Mäusen bei Nahrungswiederaufnahme nach 24 h Fasten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe stiegen die mRNA-Expressionen von *mTOR* und *p70S6K* ebenfalls an.

AKT zeigte im Vergleich zu *mTOR* und *p70S6K* eine gegensätzliche Entwicklung. Während die mRNA-Expression von *mTORC1* leicht anstieg, jedoch noch deutlich reduziert blieb im Vergleich zu vor der Crash Diät, sank die Genexpression von *AKT* auf ca. 35% zum Zustand VCD ab. Möglicherweise wurde nach ca. fünf Tagen verringerter *mTOR* und *p70S6K* mRNA-Expression das IRS weniger stark gehemmt, wodurch dieses sich kurzzeitig erholen konnte. Durch den leichten Anstieg der mRNA-Expression am 5. postoperativen Tag von *mTORC1* wurde das IRS wieder gehemmt. Es lässt sich vermuten, dass das IRS in den ersten postoperativen Tagen sensibler geworden war, indem die Hemmung leicht nachgelassen hat und sich das ebenfalls degradierte IRS wieder aufbauen konnte. Durch den geringen Anstieg der *mTORC1* mRNA-Expression und die wieder stärkere Hemmung reagierte das IRS vermutlich sofort, da die mRNA-Expression von *mTORC2* reduziert wurde. Im Vergleich mit der Reaktion von *AKT* am 1. und 3. postoperativen Tag lässt sich jedoch kein umfassend schlüssiges Bild der mRNA-Expression zeichnen. Möglicherweise interagiert *AKT* mit weiteren beeinflussenden Faktoren des Metabolismus, welche in der vorliegenden Studie nicht erfasst werden konnten.

5.3.2 Späte postoperative Reaktion

Die direkte postoperative Veränderung der Genexpression des mTOR-Stoffwechselweges zeigte die Reaktion auf Nahrungsbestandteile auf.

Der mTOR-Stoffwechselweg ist bei Adipösen und T2DM massiv im Ungleichgewicht mit einer signifikant erhöhten Expression des mTORC1. Im physiologischen Zustand bei den normalgewichtigen Kontrollprobanden zeigte sich ein ausgeglicheneres Bild der Expressionen der Zielgene. Durch Nahrungsaufnahme und adäquate Insulinseznernierung reagiert der mTOR-Stoffwechselweg physiologisch mit einer Aktivierung von AKT, mTOR und p70S6K im gleichen Maße. Hier lässt sich keine Hemmung des IRS und kein T2DM erkennen (Abbildung 21).

Drei bis sechs Monate postoperativ zeigten sich die *mTOR*- und *p70S6K* mRNA-Expressionen weiterhin signifikant reduziert im Vergleich zum Zustand VCD und präoperativ. Ein leichter Anstieg der mRNA-Expressionen im Vergleich zum direkt sehr starken postoperativen Abfall ist den Grafiken der Ergebnisse zu entnehmen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Probanden nicht mehr in der postoperativen Nahrungskarenz befanden. Der steigende Kostaufbau mehrere Monate postoperativ spiegelte sich in der Reaktion der Genexpression des mTORC1 wider. Jedoch wurde durch die bariatrische Intervention deutlich weniger Nahrung als präoperativ aufgenommen, wodurch die *mTORC1* mRNA-Expression deutlich reduziert wurde.

Unabhängig vom durchgeführten bariatrischen Verfahren (SG und RYGB) reduzierte sich die *mTOR* mRNA-Expression. Nach RYGB ließ sich eine stärkere Reduktion der *mTOR* mRNA-Expression zur 6MNK erkennen, jedoch unterschied sich diese nicht signifikant von der nach SG-Anlage. Diese Erkenntnis beruht jedoch nur auf einer kleinen Probandenanzahl, daher sollten hierfür weitere Studien durchgeführt werden, um das Ergebnis zu prüfen.

Nach ca. sechs Monaten zeigte sich eine deutliche Gewichtsreduktion um ca. 28%. Der EWL betrug fast 50% und zeigte somit einen Erfolg der bariatrischen Intervention an. Zwischen den am häufigsten durchgeführten Verfahren, SG und RYGB, konnte kein signifikanter Unterschied bei der Gewichtsreduktion eruiert werden. Chang et al. (2014) konnten in ihrer Studie den größten Erfolg bariatrischer Interventionen dem RYGB zuweisen. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich auch nach RYGB die größte Gewichtsreduktion. Der nicht signifikante Unterschied ist möglicherweise auf die kleine Stichprobengröße der vorliegenden Arbeit zurückzuführen. Chang et al. (2014) verwendeten für ihre Untersuchungen Daten von mehr als 150.000 Probanden, wodurch eine höhere Aussagekraft getroffen werden kann.

Ferner wurden die verschiedenen Operationsverfahren durch die behandelten Ärzte mit den Patienten ausgesucht, wodurch präoperativ schon eine subjektive Auswahl getroffen wurde. Bei stärker gewünschter Gewichtsreduktion und vorliegendem T2DM wurde möglicherweise

eher ein RYGB durchgeführt. Wohingegen bei erhöhtem OP-Risiko, abdominalen Voroperationen oder minimalem Eingriff eher eine Schlauchmagenanlage bevorzugt wurde. Dies könnten Gründe für die nicht signifikanten Unterschiede der Operationsverfahren bei der Gewichtsreduktion und der mTOR-Genexpression darstellen.

Neben der gewünschten Gewichtsabnahme ging eine deutliche Reduktion des T2DM um 50% nach 6 Monaten einher. Die groß angelegte Swedish Obese Subjects intervention study (SOS-Studie) zeigte ebenso die signifikante Reduktion von T2DM, arterieller Hypertonie und Hypertriglyzeridämie zwei Jahre nach bariatrischer Intervention. Ca. 700 bariatrische Patienten sowie 700 übergewichtige Kontrollprobanden (BMI ca. 40 kg/m², Ø Alter ca. 48 Jahre) wurden miteinander verglichen. Durchschnittlich wurde in der Interventionsgruppe das Gewicht um ca. 30% gesenkt. Die 2-Jahres-Inzidenz des T2DM wurde durch die bariatrische Operation um das 30-Fache im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (Sjöström et al. 1999).

Die Auflösung der Insulinresistenz lässt sich anhand der Entwicklung der mTOR-Genexpression erklären. mTOR und p70S6K wurden deutlich weniger aktiviert als präoperativ, da weniger Nahrung aufgenommen wurde, wodurch der Stoffwechselweg verringert aktiviert wurde. Folglich wurde der pathologische insulinresistente Zustand langsam aufgehoben, sodass das IRS weniger gehemmt wurde. Der Metabolismus begann sich umzustellen, um wieder in den physiologischen Zustand zu gelangen.

Sechs Monate postoperativ zeigten alle drei Zielgene der Adipösen ein fast identisches Expressionsverhalten wie die Kontrollen. Pinhel et al. (2018a) untersuchten an 13 adipösen Probandinnen die prä- und postoperativen (sechs Monate) mRNA-Expressionsmuster des mTORC2-Stoffwechselweges nach RYGB. *RICTOR*, Phosphatidylinositol-3-Kinase regulatorische Einheit 1 (*PI3K-R1*) und *HIF1α* waren sechs Monate postoperativ signifikant hochreguliert, im Gegensatz zum präoperativen Zustand. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten Pinhel et al. (2018b) in der weiterführenden Studie, dass *RICTOR*, *PI3K-R1* und *HIF1α* postoperativ ähnlich wie in der Kontrollgruppe exprimiert waren. Zum gleichen Ergebnis kamen Chen et al. (2015) in ihrer Studie mit adipösen Patienten sechs Monate nach RYGB, welche keinen Unterschied des Expressions- und Phosphorylierungsverhaltens von AKT zu Normalgewichtigen nachweisen konnten. In den aufgeführten Studien reduzierte sich bei allen T2DM-Patienten die Medikation, sowie die absolute Anzahl an T2DM. Hier wird somit deutlich, dass der dysfunktionale Zustand des Metabolismus durch die bariatrische Intervention wieder den physiologischen Zustand von Normalgewichtigen erreichen könnte.

Bei genauerer Betrachtung der mRNA-Expression von *mTOR* zur 6MNK fiel ein starker Abfall auf ca. 30% im Vergleich zum Zustand VCD auf. *P70S6K* hingegen zeigte einen homogenen Anstieg ausgehend von den postoperativen Tagen mit geringster mRNA-Expression im Vergleich zu VCD, jedoch blieb die *p70S6K* mRNA-Expression signifikant reduziert.

Normalerweise verhalten sich *mTOR* und sein Downstream-Target *p70S6K* konkordant, wie zu den anderen Vergleichszeitpunkten auch gezeigt werden konnte. Die starke Reduktion der *mTOR* mRNA-Expression ohne die simultane Reaktion von *p70S6K* weist somit am ehesten auf einen methodischen Fehler zu diesem Zeitpunkt hin. Die Stichprobe enthielt zum Zeitpunkt 6MNK eine geringe Probandenanzahl von $n = 18$, somit könnten Extremwerte die Statistik deutlich beeinflusst haben.

5.3.3 Langfristige Veränderung des Metabolismus nach bariatrischer Intervention

Um die langfristigen Effekte der bariatrischen Intervention auf den mTOR-Stoffwechselweg beurteilen zu können, wurden die Probanden ein Jahr nachbeobachtet.

12 Monate postoperativ zeigte sich im Vergleich zum Zustand vor der Crash-Diät ein Anstieg der mRNA-Expression aller drei Zielgene um ca. 30%. Dies lässt vermuten, dass nach Wiederherstellung des physiologischen Zustandes des mTOR-Stoffwechselweges mit Reduktion der Insulinresistenz dieser Zustand aufrechterhalten blieb. Die Verringerung der T2DM-Patienten auf 25% nach 12 Monaten weist auf einen sensiblen Insulinrezeptor an der Zellmembran hin. Insulin konnte somit den Rezeptor und folglich das intrazelluläre IRS aktivieren, welches postoperativ nicht mehr gehemmt wurde, da die mRNA-Expression von *mTORC1* sechs Monate postoperativ signifikant reduziert blieb. Somit stand der mTOR-Stoffwechselweg nicht mehr nur unter Einfluss der aufgenommenen Nahrung, sondern auch unter Insulin, welches zuvor im Stadium der Insulinresistenz keinen Einfluss mehr auf den mTOR-Stoffwechselweg ausüben konnte.

Der insulinsensible postoperative Zustand wird belegt durch den signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von *AKT* 12 Monate postoperativ, im Vergleich zum präoperativen Zustand. Chen et al. (2015) zeigten, dass nach RYGB und folgender Gewichtsreduktion die Genexpression und Phosphorylierung von *AKT* an Thr308 und Ser473 in Muskelzellen signifikant erhöht war, im Vergleich zum präoperativen Expressionsverhalten.

Der Erfolg der bariatrischen Intervention nach einem Jahr ließ sich anhand des EWL von ca. 57% erkennen. Der mittlere BMI von $> 55 \text{ kg/m}^2$ konnte auf ca. 37 kg/m^2 und somit Adipositasstadium II° gesenkt werden. Dies gibt auch einen Erklärungsansatz für den Anstieg der mRNA-Expressionen im mTOR-Stoffwechselweg. Die Adipositaspatienten reduzierten ihr Gewicht nach einem halben bis ganzen Jahr postoperativ um ca. 1 kg pro Monat und somit deutlich langsamer als in den ersten drei Monaten (2,3 kg pro Woche). Durch die plötzliche Veränderung des Metabolismus durch die bariatrische Intervention kam es ein Jahr danach zu einer Gewöhnung. Die Patienten nahmen wieder mehr Nahrung zu sich als in den ersten Tagen und Monaten. Daher wurde die Insulinproduktion erhöht, wodurch es zu einer Stimulation des

mTOR-Stoffwechselweges kam. Dieser reagierte deutlich sensibler als VCD und präoperativ, da der Stoffwechselweg in den physiologische Ausgangszustand gebracht wurde.

Die erhöhten mRNA-Expressionen von *mTOR*, *p70S6K* und *AKT* nach 12 Monaten könnten einen Hinweis geben, dass der dysfunktionale Zustand des Stoffwechselweges auch postoperativ wieder erreicht werden könnte. Im Vergleich zu den Kontrollen stiegen die Genexpressionen auf das ca. 1,3- bis 2,8-Fache an. Dies deutet auf einen verstärkt aktivierten mTOR-Stoffwechselweg hin. Dies gilt zu bedenken, da möglicherweise hieraus wieder ein insulinresistenter Zustand erreicht werden könnte. In der Studie von Aminian et al. (2020) zeigte die Hälfte der ca. 700 T2DM-Patienten ein Jahr nach RYGB oder SG eine Remission des T2DM. Jedoch ließ sich bei einem Drittel einen Rückfall der Insulinresistenz im Langzeitverlauf erkennen. Trotz des Wiederauftretens des T2DM wiesen die Probanden eine Verbesserung der Blutzucker- und Lipidwerte, der Diabetesmedikation und des Blutdruckes im Vergleich zum präoperativen insulinresistenten Zustand auf. Aminian et al. (2020) präsentierten auch Faktoren, welche mit einem geringen Wiederauftreten des T2DM korrelieren: eine frühe chirurgische Intervention, eine kurze Dauer des T2DM, die Durchführung des RYGB anstatt SG und starker postoperativer Gewichtsverlust.

Hier stellt sich eine offene Frage, wie sich die Genexpression des mTOR-Stoffwechselweges in Verbindung klinischer Parameter im weiteren Verlauf entwickelt. Dies könnte mit einer größeren und länger angelegten Studie noch besser untersucht werden.

Ferner sollten bei weiteren Studien die Proteinexpression bestimmt werden, da hierbei genauere Aussagen getroffen werden können als auf mRNA-Ebene, wie bei der vorliegenden Arbeit.

5.4 Fazit und Ausblick

Der mTOR-Stoffwechselweg zeigt sich in der durchgeführten Studie als elementarer Baustein der metabolischen Erkrankungen Adipositas und T2DM. Veränderungen des mTOR-Stoffwechselweges hin zu einem dysfunktionalen Zustand bei Adipositas und T2DM wurden deutlich. Nach bariatrischer Intervention kommt es zu einer Entfesselung der pathologischen Imbalance hin zum Erreichen einer physiologischen Homöostase. Die weitere Entwicklung des Stoffwechselweges konnte in der Studie nur zum Teil beurteilt werden, da die Probanden nur ein Jahr nachbeobachtet wurden und sich die Anzahl der Studienteilnehmer durch Ausstieg aus der Studie verringert hat. Somit bleibt nur die Spekulation der langfristigen Entwicklung des mTOR-Stoffwechselweges. Ein Jahr postoperativ konnte ein geringfügiger Anstieg der mRNA-Expressionen beobachtet werden, jedoch sind für die genaue Entwicklung weiterführende Studien notwendig, um das Verhalten des mTOR-Stoffwechselweges im Kontext der bariatrischen Chirurgie zu untersuchen.

Die bariatrische Chirurgie führt nicht nur zu einer mechanischen Veränderung des Gastrointestinaltraktes, sondern präsentiert auch Einflüsse auf den gesamten Metabolismus. Dies zeigt die Fähigkeit des Organismus auf veränderte Rahmenbedingungen zu reagieren und sich anzupassen. Diese Anpassungsreaktion konnte anhand des mTOR-Stoffwechselweges detektiert werden.

Neben der chirurgischen Intervention legt der mTOR-Stoffwechselweg auch ein Zielpunkt der pharmakologischen Forschung dar. Durch gezielte Inhibition einzelner Bestandteile des komplexen Stoffwechselweges könnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden, um die häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt zu verstehen und zu behandeln.

Literaturverzeichnis

1. Abeyrathna, Prasanna; Su, Yunchao (2015): The critical role of Akt in cardiovascular function. In: *Vascular pharmacology* 74, S. 38–48. DOI: 10.1016/j.vph.2015.05.008.
2. Abstracts DGAV (2021). In: *Innovative Surgical Sciences* 6 (s1), s1-s80.
3. Alessi, Dario R.; James, Stephen R.; Downes, C.Peter; Holmes, Andrew B.; Gaffney, Piers R.J.; Reese, Colin B.; Cohen, Philip (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . In: *Current Biology* 7 (4), S. 261–269. DOI: 10.1016/S0960-9822(06)00122-9.
4. Aminian, Ali; Vidal, Josep; Salminen, Paulina; Still, Christopher D.; Nor Hanipah, Zubaidah; Sharma, Gautam et al. (2020): Late Relapse of Diabetes After Bariatric Surgery: Not Rare, but Not a Failure. In: *Diabetes care* 43 (3), S. 534–540. DOI: 10.2337/dc19-1057.
5. Andjelković, M.; Jakubowicz, T.; Cron, P.; Ming, X. F.; Han, J. W.; Hemmings, B. A. (1996): Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (12), S. 5699–5704. DOI: 10.1073/pnas.93.12.5699.
6. Banim, Paul J. R.; Luben, Robert N.; Bulluck, Heerajnarain; Sharp, Stephen J.; Wareham, Nicholas J.; Khaw, Kay-Tee; Hart, Andrew R. (2011): The aetiology of symptomatic gallstones quantification of the effects of obesity, alcohol and serum lipids on risk. Epidemiological and biomarker data from a UK prospective cohort study (EPIC-Norfolk). In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 23 (8), S. 733–740. DOI: 10.1097/MEG.0b013e3283477cc9.
7. Ben-Hur, Vered; Denichenko, Polina; Siegfried, Zahava; Maimon, Avi; Krainer, Adrian; Davidson, Ben; Karni, Rotem (2013): S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1. In: *Cell reports* 3 (1), S. 103–115. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.11.020.
8. Ben-Sahra, Issam; Howell, Jessica J.; Asara, John M.; Manning, Brendan D. (2013): Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6125), S. 1323–1328. DOI: 10.1126/science.1228792.

9. Ben-Sahra, Issam; Hoxhaj, Gerta; Ricoult, Stéphane J. H.; Asara, John M.; Manning, Brendan D. (2016): mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6274), S. 728–733. DOI: 10.1126/science.aad0489.
10. Bentzinger, C. Florian; Romanino, Klaas; Cloëtta, Dimitri; Lin, Shuo; Mascarenhas, Joseph B.; Oliveri, Filippo et al. (2008): Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. In: *Cell metabolism* 8 (5), S. 411–424. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.10.002.
11. Billmann, Franck; Keck, Tobias (Hg.) (2017): Facharztwissen Viszeral- und Allgemeinchirurgie. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg.
12. Bio&SELL GmbH (2020): Biocoll Trennlösung. Bio&SELL GmbH. Online verfügbar unter <https://www.bio-sell.de/zellkultur/biocoll-trennloesung-dichte-1-077-g-l-etc.html>, zuletzt geprüft am 12.06.2022.
13. Branca, Francesco (Hg.) (2007): Die Herausforderung Adipositas und Strategien zu ihrer Bekämpfung in der Europäischen Region der WHO. Zusammenfassung. Weltgesundheitsorganisation. Kopenhagen: WHO Regionalbüro für Europa.
14. Bray, George A.; Heisel, William E.; Afshin, Ashkan; Jensen, Michael D.; Dietz, William H.; Long, Michael et al. (2018): The Science of Obesity Management: An Endocrine Society Scientific Statement. In: *Endocrine reviews* 39 (2), S. 79–132. DOI: 10.1210/er.2017-00253.
15. Buchwald, Henry; Avidor, Yoav; Braunwald, Eugene; Jensen, Michael D.; Pories, Walter; Fahrbach, Kyle; Schoelles, Karen (2004): Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. In: *JAMA* 292 (14), S. 1724–1737. DOI: 10.1001/jama.292.14.1724.
16. Buchwald, Henry; Estok, Rhonda; Fahrbach, Kyle; Banel, Deirdre; Jensen, Michael D.; Pories, Walter J. et al. (2009): Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. In: *The American journal of medicine* 122 (3), 248–256.e5. DOI: 10.1016/j.amjmed.2008.09.041.
17. Catalán, Victoria; Gómez-Ambrosi, Javier; Rodríguez, Amaia; Ramírez, Beatriz; Andrada, Patricia; Rotellar, Fernando et al. (2015): Expression of S6K1 in human visceral adipose tissue is upregulated in obesity and related to insulin resistance and inflammation. In: *Acta diabetologica* 52 (2), S. 257–266. DOI: 10.1007/s00592-014-0632-9.

18. Chang, Su-Hsin; Stoll, Carolyn R. T.; Song, Jihyun; Varela, J. Esteban; Eagon, Christopher J.; Colditz, Graham A. (2014): The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. United States.
19. Chauvin, C.; Koka, V.; Nouschi, A.; Mieulet, V.; Hoareau-Aveilla, C.; Dreazen, A. et al. (2014): Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. In: *Oncogene* 33 (4), S. 474–483. DOI: 10.1038/onc.2012.606.
20. Chen, Mimi Z.; Hudson, Claire A.; Vincent, Emma E.; Berker, David A. R. de; May, Margaret T.; Hers, Ingeborg et al. (2015): Bariatric surgery in morbidly obese insulin resistant humans normalises insulin signalling but not insulin-stimulated glucose disposal. In: *PloS one* 10 (4), e0120084. DOI: 10.1371/journal.pone.0120084.
21. Chevallier, Jean-Marc; Zinzindohoué, Franck; Douard, Richard; Blanche, Jean-Philippe; Berta, Jean-Louis; Altman, Jean-Jacques; Cugnenc, Paul-Henri (2004): Complications after laparoscopic adjustable gastric banding for morbid obesity: experience with 1,000 patients over 7 years. In: *Obesity Surgery* 14 (3), S. 407–414. DOI: 10.1381/096089204322917954.
22. Chiappetta, Sonja (2016): Was bedeutet Erfolg in der Adipositaschirurgie? In: *Adipositaspiegel AcSDeV*, S. 16–18. Online verfügbar unter http://adipositaspiegel.de/wp-content/uploads/2017/02/Adipositaspiegel_final_2016_Chiappetta.pdf, zuletzt geprüft am 10.06.2022.
23. Dawes, Aaron J.; Maggard-Gibbons, Melinda; Maher, Alicia R.; Booth, Marika J.; Miakel-Lye, Isomi; Beroes, Jessica M.; Shekelle, Paul G. (2016): Mental Health Conditions Among Patients Seeking and Undergoing Bariatric Surgery: A Meta-analysis. In: *JAMA* 315 (2), S. 150–163. DOI: 10.1001/jama.2015.18118.
24. Dazert, Eva; Hall, Michael N. (2011): mTOR signaling in disease. In: *Current opinion in cell biology* 23 (6), S. 744–755. DOI: 10.1016/j.ceb.2011.09.003.
25. DeMaria, Eric J.; Murr, Michel; Byrne, T. Karl; Blackstone, Robin; Grant, John P.; Budak, Amanda; Wolfe, Luke (2007a): Validation of the obesity surgery mortality risk score in a multicenter study proves it stratifies mortality risk in patients undergoing gastric bypass for morbid obesity. In: *Annals of surgery* 246 (4), 578-82; discussion 583-4. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318157206e.
26. DeMaria, Eric J.; Portenier, Dana; Wolfe, Luke (2007b): Obesity surgery mortality risk score: proposal for a clinically useful score to predict mortality risk in patients undergoing gastric bypass. In: *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery* 3 (2), S. 134–140. DOI: 10.1016/j.soard.2007.01.005.

27. DGAV (2018): S3-Leitlinie: Chirurgie der Adipositas und metabolischer Erkrankungen. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie. AWMF Online (AWMF-Register Nr. 088-001).
28. Dimitriadis, Georgios K.; Randeve, Manpal S.; Miras, Alexander D. (2017): Potential Hormone Mechanisms of Bariatric Surgery. In: *Current Obesity Reports* 6 (3), S. 253–265. DOI: 10.1007/s13679-017-0276-5.
29. Duvel, Katrin; Yecies, Jessica L.; Menon, Suchithra; Raman, Pichai; Lipovsky, Alex I.; Souza, Amanda L. et al. (2010): Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. In: *Molecular cell* 39 (2), S. 171–183. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.06.022.
30. Feng, Zhaohui; Hu, Wenwei; Stanchina, Elisa de; Teresky, Angelika K.; Jin, Shengkan; Lowe, Scott; Levine, Arnold J. (2007): The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. In: *Cancer research* 67 (7), S. 3043–3053. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4149.
31. Fenton, Tim R.; Gout, Ivan T. (2011): Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (1), S. 47–59. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.09.018.
32. Flum, David Reed; Belle, Steven H.; King, Wendy C.; Wahed, Abdus S.; Berk, Paul; Chapman, William et al. (2009): Perioperative safety in the longitudinal assessment of bariatric surgery. In: *The New England journal of medicine* 361 (5), S. 445–454. DOI: 10.1056/NEJMoa0901836.
33. Frias, Maria A.; Thoreen, Carson C.; Jaffe, Jacob D.; Schroder, Wayne; Sculley, Tom; Carr, Steven A.; Sabatini, David M. (2006): mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. In: *Current Biology* 16 (18), S. 1865–1870. DOI: 10.1016/j.cub.2006.08.001.
34. Gao, Tianyan; Furnari, Frank; Newton, Alexandra C. (2005): PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. In: *Molecular cell* 18 (1), S. 13–24. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.008.
35. Gentileschi, P.; Kini, S.; Catarci, M.; Gagner, M. (2002): Evidence-based medicine: open and laparoscopic bariatric surgery. In: *Surgical endoscopy* 16 (5), S. 736–744. DOI: 10.1007/s00464-001-8239-y.
36. Groot, Rolf P. de; Ballou, Lisa M.; Sassone-Corsi, Paolo (1994): Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: An alternative route to

- mitogen-induced gene expression. In: *Cell* 79 (1), S. 81–91. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90402-2.
37. Grove, J. R.; Banerjee, P.; Balasubramanyam, A.; Coffey, P. J.; Price, D. J.; Avruch, J.; Woodgett, J. R. (1991): Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. In: *Molecular and cellular biology* 11 (11), S. 5541–5550. DOI: 10.1128/mcb.11.11.5541-5550.1991.
38. Grundy, Scott M.; Cleeman, James I.; Daniels, Stephen R.; Donato, Karen A.; Eckel, Robert H.; Franklin, Barry A. et al. (2005): Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. In: *Circulation* 112 (17), S. 2735–2752. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404.
39. Gwinn, Dana M.; Shackelford, David B.; Egan, Daniel F.; Mihaylova, Maria M.; Mery, Annabelle; Vasquez, Debbie S. et al. (2008): AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. In: *Molecular cell* 30 (2), S. 214–226. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.
40. Hagiwara, Asami; Cornu, Marion; Cybulski, Nadine; Polak, Pazit; Betz, Charles; Trapani, Francesca et al. (2012): Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. In: *Cell metabolism* 15 (5), S. 725–738. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.03.015.
41. Hampel, Howard; Abraham, Neena S.; El-Serag, Hashem B. (2005): Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. In: *Annals of internal medicine* 143 (3), S. 199–211. DOI: 10.7326/0003-4819-143-3-200508020-00006.
42. Hara, K.; Yonezawa, K.; Weng, Q. P.; Kozlowski, M. T.; Belham, C.; Avruch, J. (1998): Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (23), S. 14484–14494. DOI: 10.1074/jbc.273.23.14484.
43. Harrington, Laura S.; Findlay, Greg M.; Gray, Alex; Tolkacheva, Tatiana; Wigfield, Simon; Rebholz, Heike et al. (2004): The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. In: *The Journal of cell biology* 166 (2), S. 213–223. DOI: 10.1083/jcb.200403069.
44. Holz, Marina K.; Ballif, Bryan A.; Gygi, Steven P.; Blenis, John (2005): mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein

- interchange and ordered phosphorylation events. In: *Cell* 123 (4), S. 569–580. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.024.
45. Holzapfel, Bianca; Wickert, Lucia (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. In: *Biol. Unserer Zeit* 37 (2), S. 120–126. DOI: 10.1002/biuz.200610332.
46. Horton, Jay D.; Goldstein, Joseph L.; Brown, Michael S. (2002): SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. In: *The Journal of clinical investigation* 109 (9), S. 1125–1131. DOI: 10.1172/JCI15593.
47. Hosokawa, Nao; Hara, Taichi; Kaizuka, Takeshi; Kishi, Chieko; Takamura, Akito; Miura, Yutaka et al. (2009): Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. In: *Molecular biology of the cell* 20 (7), S. 1981–1991. DOI: 10.1091/mbc.e08-12-1248.
48. Huang, Xingjun; Liu, Guihua; Guo, Jiao; Su, Zhengquan (2018): The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. In: *International journal of biological sciences* 14 (11), S. 1483–1496. DOI: 10.7150/ijbs.27173.
49. Hüttl, T.; Stauch, P.; Wood, H.; Fruhmann, J. (2015): Barietrische Chirurgie. In: *Aktuel Ernährungsmed* 40 (04), S. 256–274. DOI: 10.1055/s-0035-1552668.
50. International Diabetes Federation (IDF) (2006): The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Online verfügbar unter <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome.html>, zuletzt geprüft am 12.05.2022.
51. Ip, C. K. M.; Cheung, A. N. Y.; Ngan, H. Y. S.; Wong, A. S. T. (2011): p70 S6 kinase in the control of actin cytoskeleton dynamics and directed migration of ovarian cancer cells. In: *Oncogene* 30 (21), S. 2420–2432. DOI: 10.1038/onc.2010.615.
52. Jacinto, Estela; Loewith, Robbie; Schmidt, Anja; Lin, Shuo; Rügge, Markus A.; Hall, Alan; Hall, Michael N. (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In: *Nature cell biology* 6 (11), S. 1122–1128. DOI: 10.1038/ncb1183.
53. Jethwa, Nirmal; Chung, Gary H. C.; Lete, Marta G.; Alonso, Alicia; Byrne, Richard D.; Calleja, Véronique; Larijani, Banafshé (2015): Endomembrane PtdIns(3,4,5)P3 activates the PI3K-Akt pathway. In: *Journal of cell science* 128 (18), S. 3456–3465. DOI: 10.1242/jcs.172775.

54. Keck, Tobias; Germer, Christoph T. (2017): Minimalinvasive Viszeralchirurgie. Operative Expertise und Evidenz. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-53204-1>.
55. Keith, C. T.; Schreiber, S. L. (1995): PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5233), S. 50–51. DOI: 10.1126/science.270.5233.50.
56. Khamzina, Leila; Veilleux, Alain; Bergeron, Sébastien; Marette, André (2005): Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. In: *Endocrinology* 146 (3), S. 1473–1481. DOI: 10.1210/en.2004-0921.
57. Kim, Do-Hyung; Sarbassov, Dos D.; Ali, Siraj M.; King, Jessie E.; Latek, Robert R.; Erdjument-Bromage, Hediye et al. (2002): mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. In: *Cell* 110 (2), S. 163–175. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00808-5.
58. Kim, Young-Mi; Jung, Chang Hwa; Seo, Minchul; Kim, Eun Kyoung; Park, Ji-Man; Bae, Sun Sik; Kim, Do-Hyung (2015): mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. In: *Molecular cell* 57 (2), S. 207–218. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.11.013.
59. Kitahara, Cari M.; Flint, Alan J.; Berrington de Gonzalez, Amy; Bernstein, Leslie; Brotzman, Michelle; MacInnis, Robert J. et al. (2014): Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. In: *PLoS medicine* 11 (7), e1001673. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001673.
60. Klein; Rost (2019): Prinzip des 5'-3' Nuklease-Assays (AB7900HT). Hg. v. Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik. Online verfügbar unter <https://www.medicinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>, zuletzt geprüft am 11.06.2022.
61. Koetsier, Giron; Cantor, Eric (2019): A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers: New England Biolabs. Online verfügbar unter <https://www.bioke.com/support/appnotes/1345/a-practical-guide-to-analyzing-nucleic-acid-concentration-and-purity-with-microvolume-spectrophotometers.html>, zuletzt geprüft am 09.04.2021.
62. Koolman, Jan; Röhm, Klaus-Heinrich (2009): Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4., vollständig überarbeitet und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

63. Krycer, James R.; Sharpe, Laura J.; Luu, Winnie; Brown, Andrew J. (2010): The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21 (5), S. 268–276. DOI: 10.1016/j.tem.2010.01.001.
64. Kumar, Anil; Lawrence, John C.; Jung, Dae Young; Ko, Hwi Jin; Keller, Susanna R.; Kim, Jason K. et al. (2010): Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism. In: *Diabetes* 59 (6), S. 1397–1406. DOI: 10.2337/db09-1061.
65. Lai, Keng Po; Leong, Wai Fook; Chau, Jenny Fung Ling; Jia, Deyong; Zeng, Li; Liu, Huijuan et al. (2010): S6K1 is a multifaceted regulator of Mdm2 that connects nutrient status and DNA damage response. In: *The EMBO journal* 29 (17), S. 2994–3006. DOI: 10.1038/emboj.2010.166.
66. Lamming, Dudley W.; Ye, Lan; Katajisto, Pekka; Goncalves, Marcus D.; Saitoh, Maki; Stevens, Deanna M. et al. (2012): Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. In: *Science (New York, N.Y.)* 335 (6076), S. 1638–1643. DOI: 10.1126/science.1215135.
67. Li, Danjie; Li, Shaojian; Pan, Qinling; Zhai, Hening; Peng, Miao; Wang, Xuanxuan; Xu, Geyang (2018): Gastric Mammalian Target of Rapamycin Signaling Contributes to Inhibition of Ghrelin Expression Induced by Roux-En-Y Gastric Bypass. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 51 (2), S. 664–680. DOI: 10.1159/000495325.
68. Linn, T.; Santosa, B.; Grönemeyer, D.; Aygen, S.; Scholz, N.; Busch, M.; Bretzel, R. G. (2000): Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. In: *Diabetologia* 43 (10), S. 1257–1265. DOI: 10.1007/s001250051521.
69. Liu, Grace Y.; Sabatini, David M. (2020): mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. In: *Nature reviews. Molecular cell biology*. DOI: 10.1038/s41580-019-0199-y.
70. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
71. Lumeng, Carey N.; Saltiel, Alan R. (2011): Inflammatory links between obesity and metabolic disease. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (6), S. 2111–2117. DOI: 10.1172/JCI57132.

72. Magnuson, Brian; Ekim, Bilgen; Fingar, Diane C. (2012): Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. In: *The Biochemical journal* 441 (1), S. 1–21. DOI: 10.1042/BJ20110892.
73. Manning, Brendan D.; Cantley, Lewis C. (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream. In: *Cell* 129 (7), S. 1261–1274. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
74. Manning, Brendan D.; Toker, Alex (2017): AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. In: *Cell* 169 (3), S. 381–405. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
75. Marchi, J.; Berg, M.; Dencker, A.; Olander, E. K.; Begley, C. (2015): Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. In: *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 16 (8), S. 621–638. DOI: 10.1111/obr.12288.
76. Martel, R. R.; Klicius, J.; Galet, S. (1977): Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 55 (1), S. 48–51. DOI: 10.1139/y77-007.
77. Mechanick, Jeffrey I.; Youdim, Adrienne; Jones, Daniel B.; Garvey, W. Timothy; Hurley, Daniel L.; McMahan, M. Molly et al. (2013): Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient--2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21 Suppl 1 (0 1), S1-27. DOI: 10.1002/oby.20461.
78. Menon, Suchithra; Dibble, Christian C.; Talbott, George; Hoxhaj, Gerta; Valvezan, Alexander J.; Takahashi, Hidenori et al. (2014): Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. In: *Cell* 156 (4), S. 771–785. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.049.
79. NCBI- Gene (Hg.) (2020): PSMB6 proteasome 20S subunit beta 6 [Homo sapiens (human)]. Gene ID: 5694. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5694>, zuletzt geprüft am 19.02.2022.
80. Nojima, Hiroki; Tokunaga, Chiharu; Eguchi, Satoshi; Oshiro, Noriko; Hidayat, Sujuti; Yoshino, Ken-ichi et al. (2003): The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (18), S. 15461–15464. DOI: 10.1074/jbc.C200665200.

81. O'Brien, Paul E.; Hindle, Annemarie; Brennan, Leah; Skinner, Stewart; Burton, Paul; Smith, Andrew et al. (2019): Long-Term Outcomes After Bariatric Surgery: a Systematic Review and Meta-analysis of Weight Loss at 10 or More Years for All Bariatric Procedures and a Single-Centre Review of 20-Year Outcomes After Adjustable Gastric Banding. In: *Obesity Surgery* 29 (1), S. 3–14. DOI: 10.1007/s11695-018-3525-0.
82. Ordemann, Jürgen; Elbelt, Ulf (Hg.) (2017): Adipositas- und metabolische Chirurgie. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-48698-6>.
83. Pardo, Olivier E.; Seckl, Michael J. (2013): S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member. In: *Frontiers in oncology* 3, S. 191. DOI: 10.3389/fonc.2013.00191.
84. Passarge, Eberhard (2008): Taschenatlas Humangenetik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
85. Pearce, Laura R.; Huang, Xu; Boudeau, Jérôme; Pawłowski, Rafał; Wullschleger, Stephan; Deak, Maria et al. (2007): Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. In: *The Biochemical journal* 405 (3), S. 513–522. DOI: 10.1042/BJ20070540.
86. Pende, Mario; Um, Sung Hee; Mieulet, Virginie; Sticker, Melanie; Goss, Valerie L.; Mestian, Jurgen et al. (2004): S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. In: *Molecular and cellular biology* 24 (8), S. 3112–3124. DOI: 10.1128/MCB.24.8.3112-3124.2004.
87. Peterson, Timothy R.; Laplante, Mathieu; Thoreen, Carson C.; Sancak, Yasemin; Kang, Seong A.; Kuehl, W. Michael et al. (2009): DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. In: *Cell* 137 (5), S. 873–886. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.046.
88. Peterson, Timothy R.; Sengupta, Shomit S.; Harris, Thurl E.; Carmack, Anne E.; Kang, Seong A.; Balderas, Eric et al. (2011): mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. In: *Cell* 146 (3), S. 408–420. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.034.
89. Pfaffl (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Hg. v. BIOspektrum. BIOspektrum (10. Jahrgang), zuletzt geprüft am 10.03.2022.
90. Pinhel, Marcela Augusta de Souza; Nicoletti, Carolina Ferreira; Noronha, Natalia Yumi; Oliveira, Bruno Affonso Parenti de; Cortes-Oliveira, Cristiana; Salgado, Wilson et al. (2018a): Mammalian target of rapamycin complex 2 signaling in obese women changes

- after bariatric surgery. In: *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 54, S. 94–99. DOI: 10.1016/j.nut.2018.02.016.
91. Pinhel, Marcela Augusta de Souza; Noronha, Natalia Yumi; Nicoletti, Carolina Ferreira; Oliveira, Bruno Affonso Parente de; Cortes-Oliveira, Cristiana; Pinhanelli, Vitor Caresato et al. (2018b): Changes in Global Transcriptional Profiling of Women Following Obesity Surgery Bypass. In: *Obesity Surgery* 28 (1), S. 176–186. DOI: 10.1007/s11695-017-2828-x.
92. Porstmann, Thomas; Santos, Claudio R.; Griffiths, Beatrice; Cully, Megan; Wu, Mary; Leever, Sally et al. (2008): SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. In: *Cell metabolism* 8 (3), S. 224–236. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.07.007.
93. Richardson, Celeste J.; Bröenstrup, Mark; Fingar, Diane C.; Jülich, Kristina; Ballif, Bryan A.; Gygi, Steven; Blenis, John (2004): SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. In: *Current Biology* 14 (17), S. 1540–1549. DOI: 10.1016/j.cub.2004.08.061.
94. Rocznik-Ferguson, Agnes; Petit, Constance S.; Froehlich, Florian; Qian, Sharon; Ky, Jennifer; Angarola, Brittany et al. (2012): The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. In: *Science signaling* 5 (228), ra42. DOI: 10.1126/scisignal.2002790.
95. Rubie, Claudia; Kempf, Katja; Hans, Joachim; Su, Tiefen; Tilton, Bettina; Georg, Thomas et al. (2005): Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. In: *Molecular and Cellular Probes* 19 (2), S. 101–109. DOI: 10.1016/j.mcp.2004.10.001.
96. Rubie, Claudia; Kölsch, Kathrin; Halajda, Beata; Eichler, Hermann; Wagenpfeil, Stefan; Roemer, Klaus; Glanemann, Matthias (2016): microRNA-496 - A new, potentially aging-relevant regulator of mTOR. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (8), S. 1108–1116. DOI: 10.1080/15384101.2016.1158360.
97. Rubie, Claudia; Zimmer, Jonas; Lammert, Frank; Gross, Jürgen Christian; Weber, Susanne N.; Kruse, Bianca et al. (2019): MicroRNA-496 and Mechanistic Target of Rapamycin Expression are Associated with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity in Elderly People. In: *Annals of nutrition & metabolism* 74 (4), S. 279–286. DOI: 10.1159/000499576.
98. Rubino, Francesco; Nathan, David M.; Eckel, Robert H.; Schauer, Philip R.; Alberti, K. George M. M.; Zimmet, Paul Z. et al. (2016): Metabolic Surgery in the Treatment

- Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations. In: *Diabetes care* 39 (6), S. 861–877. DOI: 10.2337/dc16-0236.
99. Sabatini, David M.; Erdjument-Bromage, Hediye; Lui, Mary; Tempst, Paul; Snyder, Solomon H. (1994): RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. In: *Cell* 78 (1), S. 35–43. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90570-3.
100. Sancak, Yasemin; Thoreen, Carson C.; Peterson, Timothy R.; Lindquist, Robert A.; Kang, Seong A.; Spooner, Eric et al. (2007): PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. In: *Molecular cell* 25 (6), S. 903–915. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.03.003.
101. Sarbassov, D. D.; Ali, Siraj M.; Kim, Do-Hyung; Guertin, David A.; Latek, Robert R.; Erdjument-Bromage, Hediye et al. (2004): Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. In: *Current Biology* 14 (14), S. 1296–1302. DOI: 10.1016/j.cub.2004.06.054.
102. Sarbassov, D. D.; Guertin, David A.; Ali, Siraj M.; Sabatini, David M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712), S. 1098–1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
103. Saxton, Robert A.; Sabatini, David M. (2017): mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. In: *Cell* 168 (6), S. 960–976. DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
104. Schienkiewitz, Anja; Mensink, Gert B. M.; Kuhnert, Ronny; Lange, Cornelia (2017): Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. Hg. v. Journal of Health Monitoring. RKI.
105. Schmitz, S.; Desel, C. (2018): Der Experimentator Zellbiologie: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=JXVsDwAAQBAJ>.
106. Sengupta, Shomit; Peterson, Timothy R.; Laplante, Mathieu; Oh, Stephanie; Sabatini, David M. (2010): mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. In: *Nature* 468 (7327), S. 1100–1104. DOI: 10.1038/nature09584.
107. Shah, O. Jameel; Hunter, Tony (2006): Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. In: *Molecular and cellular biology* 26 (17), S. 6425–6434. DOI: 10.1128/MCB.01254-05.
108. Shai, Iris; Schwarzfuchs, Dan; Henkin, Yaakov; Shahar, Danit R.; Witkow, Shula; Greenberg, Ilana et al. (2008): Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or

- low-fat diet. In: *The New England journal of medicine* 359 (3), S. 229–241. DOI: 10.1056/NEJMoa0708681.
109. Siddik, Md Abu Bakkar; Shin, Andrew C. (2019): Recent Progress on Branched-Chain Amino Acids in Obesity, Diabetes, and Beyond. In: *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)* 34 (3), S. 234–246. DOI: 10.3803/EnM.2019.34.3.234.
110. Sjöström, C. D.; Lissner, L.; Wedel, H.; Sjöström, L. (1999): Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: the SOS Intervention Study. In: *Obesity research* 7 (5), S. 477–484. DOI: 10.1002/j.1550-8528.1999.tb00436.x.
111. Tavares, Mariana R.; Pavan, Isadora C. B.; Amaral, Camila L.; Meneguello, Letícia; Luchessi, Augusto D.; Simabuco, Fernando M. (2015): The S6K protein family in health and disease. In: *Life sciences* 131, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.03.001.
112. Tomko, Robert J.; Hochstrasser, Mark (2013): Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. In: *Annual review of biochemistry* 82, S. 415–445. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060410-150257.
113. Tremblay, Frédéric; Brûlé, Sophie; Hee Um, Sung; Li, Yu; Masuda, Kohei; Roden, Michael et al. (2007): Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (35), S. 14056–14061. DOI: 10.1073/pnas.0706517104.
114. Tremblay, Frédéric; Krebs, Michael; Dombrowski, Luce; Brehm, Attila; Bernroider, Elisabeth; Roth, Erich et al. (2005): Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. In: *Diabetes* 54 (9), S. 2674–2684. DOI: 10.2337/diabetes.54.9.2674.
115. Um, Sung Hee; D'Alessio, David; Thomas, George (2006): Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. In: *Cell metabolism* 3 (6), S. 393–402. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.05.003.
116. Um, Sung Hee; Frigerio, Francesca; Watanabe, Mitsuhiro; Picard, Frederic; Joaquin, Manel; Sticker, Melanie et al. (2004): Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. In: *Nature* 431 (7005), S. 200–205. DOI: 10.1038/nature02866.
117. van Beek, A. P.; Emous, M.; Laville, M.; Tack, J. (2017): Dumping syndrome after esophageal, gastric or bariatric surgery: pathophysiology, diagnosis, and management. In:

- Obesity reviews* : an official journal of the International Association for the Study of Obesity 18 (1), S. 68–85. DOI: 10.1111/obr.12467.
118. Vézina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. N. (1975): Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. In: *The Journal of antibiotics* 28 (10), S. 721–726. DOI: 10.7164/antibiotics.28.721.
119. Wan, Min; Leavens, Karla F.; Hunter, Roger W.; Koren, Shlomit; Wilamowitz-Moellendorff, Alexander von; Lu, Mingjian et al. (2013): A noncanonical, GSK3-independent pathway controls postprandial hepatic glycogen deposition. In: *Cell metabolism* 18 (1), S. 99–105. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.06.001.
120. Wang, X.; Li, W.; Williams, M.; Terada, N.; Alessi, D. R.; Proud, C. G. (2001): Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. In: *The EMBO journal* 20 (16), S. 4370–4379. DOI: 10.1093/emboj/20.16.4370.
121. Webb, Ashley E.; Brunet, Anne (2014): FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. In: *Trends in biochemical sciences* 39 (4), S. 159–169. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.003.
122. WHO (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. In: *World Health Organization technical report series* 894, i-xii, 1-253.
123. Wirth et al. (2014): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. Hg. v. Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) e.V., Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V., Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) e.V., zuletzt geprüft am 12.06.2022.
124. Wu, T.; Gao, X.; Chen, M.; van Dam, R. M. (2009): Long-term effectiveness of diet-plus-exercise interventions vs. diet-only interventions for weight loss: a meta-analysis. In: *Obesity reviews* : an official journal of the International Association for the Study of Obesity 10 (3), S. 313–323. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2008.00547.x.
125. Yamnik, Rachel L.; Digilova, Alla; Davis, Daphne C.; Brodt, Z. Nilly; Murphy, Christopher J.; Holz, Marina K. (2009): S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (10), S. 6361–6369. DOI: 10.1074/jbc.M807532200.
126. Yang, Haijuan; Rudge, Derek G.; Koos, Joseph D.; Vaidialingam, Bhamini; Yang, Hyo J.; Pavletich, Nikola P. (2013): mTOR kinase structure, mechanism and regulation. In: *Nature* 497 (7448), S. 217–223. DOI: 10.1038/nature12122.

127. Yoon, Mee-Sup (2017): The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. In: *Nutrients* 9 (11). DOI: 10.3390/nu9111176.
128. Yoon, Mee-Sup; Son, Kook; Arauz, Edwin; Han, Jung Min; Kim, Sunghoon; Chen, Jie (2016): Leucyl-tRNA Synthetase Activates Vps34 in Amino Acid-Sensing mTORC1 Signaling. In: *Cell reports* 16 (6), S. 1510–1517. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.008.
129. Yu, Yonghao; Yoon, Sang-Oh; Poulogiannis, George; Yang, Qian; Ma, Xiaojun; Villén, Judit et al. (2011): Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6035), S. 1322–1326. DOI: 10.1126/science.1199484.
130. Zhang, Jin; Gao, Zhanguo; Yin, Jun; Quon, Michael J.; Ye, Jianping (2008): S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (51), S. 35375–35382. DOI: 10.1074/jbc.M806480200.
131. Zoncu, Roberto; Efeyan, Alejo; Sabatini, David M. (2011): mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (1), S. 21–35. DOI: 10.1038/nrm3025.
132. Zwaan, Martina de; Herpertz, Stephan; Zipfel, Stephan (Hg.) (2019): Psychosoziale Aspekte der Adipositas-Chirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-57364-8>.

Anhang

- a. Übersicht der gängigen bariatrischen Operationsverfahren (Ordemann und Elbelt 2017).

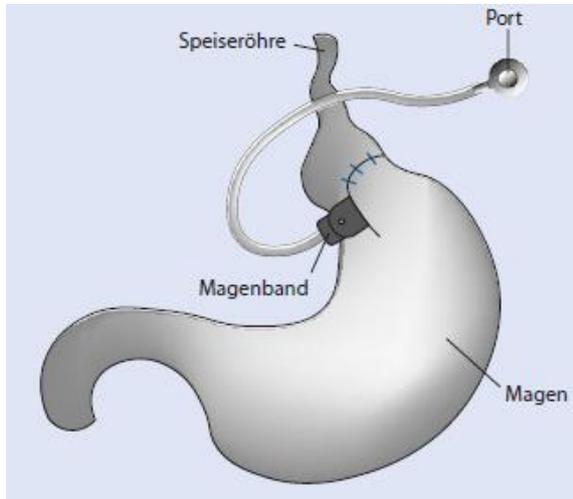


Abbildung 22: Magenband (LAGB)

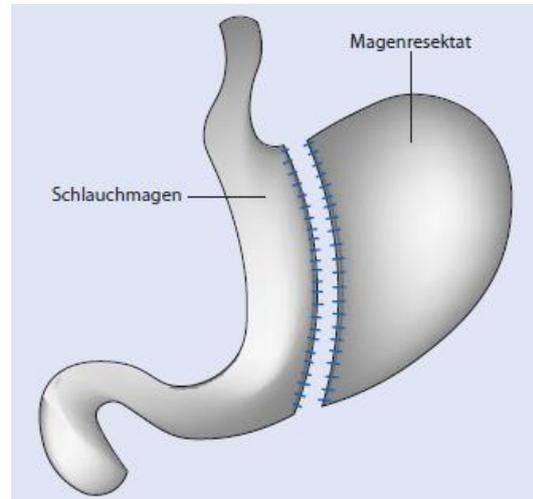


Abbildung 23: Schlauchmagen (SG)

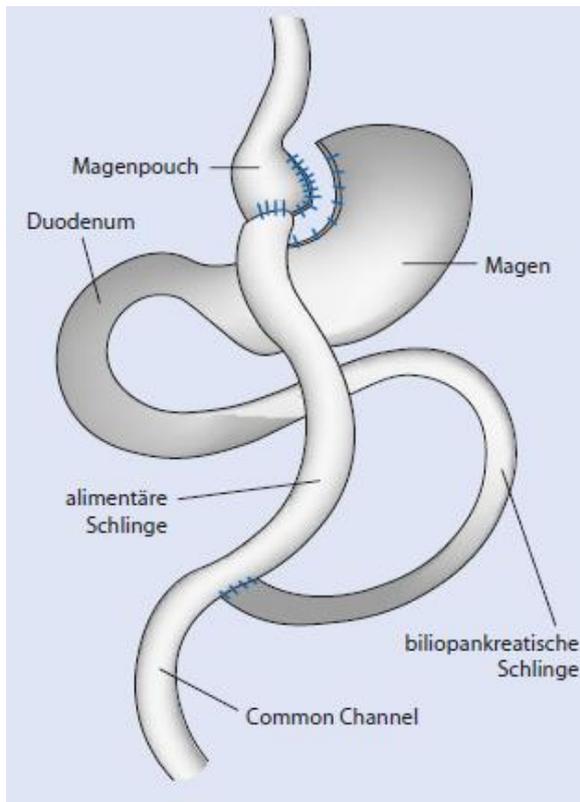


Abbildung 24: Proximaler Roux-en-Y-Magenbypass (pRYGB)

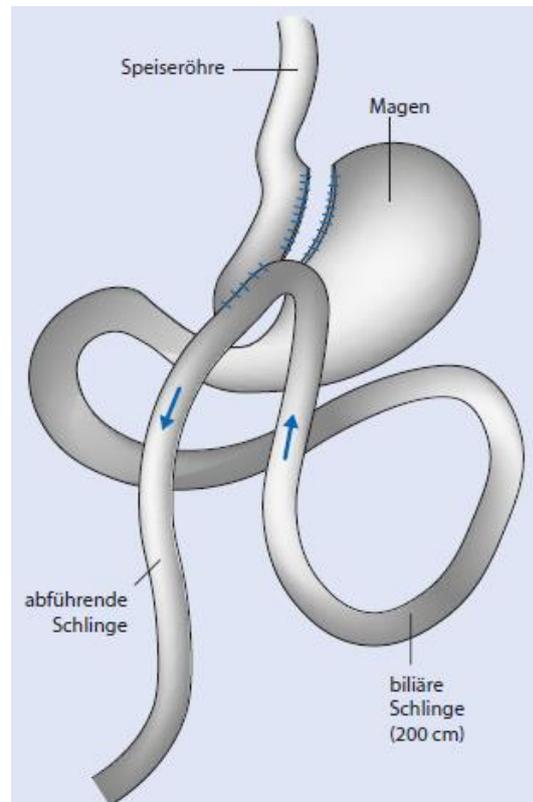


Abbildung 25: Omega-Loop-Magenbypass

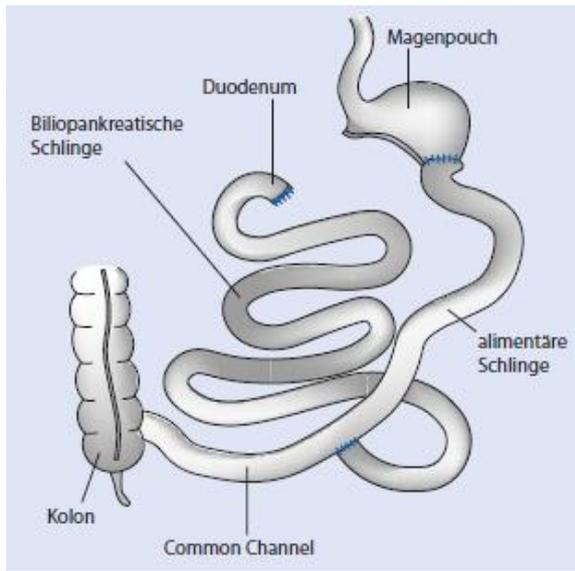


Abbildung 26: Biliopankreatische Diversion nach Scopinaro (BPD)

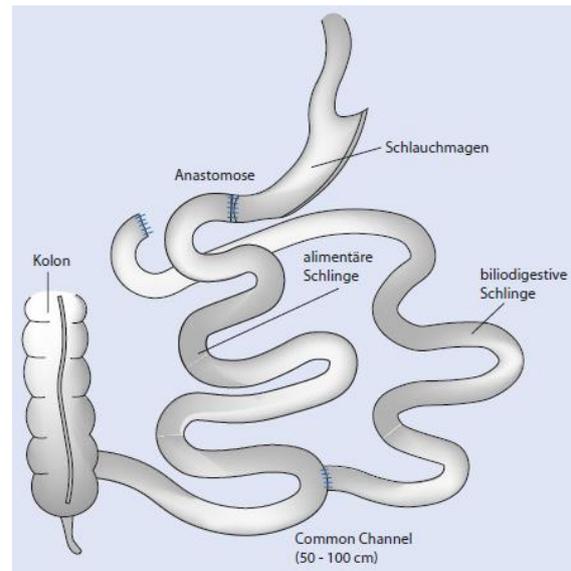


Abbildung 27: Biliopankreatische Diversion mit Duodenalswitch (BPD-DS)

b. Patienteninformation



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

Patienteninformation

Erforschung der Adipositas Erkrankung in Bezug auf den IGF/mTOR Stoffwechselweg und diesen regulierende mikroRNAs sowie auf altersabhängig mit der Erkrankung einhergehende epigenetische Veränderungen

Vollständiger Name des Studienteilnehmers:

Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-,
Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes
D-66421 Homburg / Saar
Tel.: +49 - 6841 - 16 31000
Fax: +49 - 6841 - 16 31002
E-Mail-Adresse: matthias.glanemann@uks.eu



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Sie werden gegenwärtig als Patient* am Universitätsklinikum des Saarlandes in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie ärztlich behandelt. Der Klinik steht ein eigenes Forschungslabor zur Verfügung, in dem Biomaterialien aufbewahrt und bearbeitet werden. Es handelt sich um eine Sammlung von menschlichen Biomaterialien wie Blut oder Gewebe, verknüpft mit ausgewählten medizinischen Daten.

Die Untersuchung von menschlichen Biomaterialien und die Analyse der daraus gewonnenen oder zu gewinnenden Daten sind zu einem wichtigen Instrument medizinischer Forschung geworden. Deshalb fragen wir unsere Patienten und daher auch Sie, ob sie bereit sind, uns bestimmte Körpermaterialien und Daten für die Forschung zur Verfügung zu stellen. Ihre Teilnahme ist völlig freiwillig. Soweit Sie sich nicht beteiligen möchten oder Ihre Zustimmung später widerrufen möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

Im Folgenden informieren wir Sie über die Ziele des Labors der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, die Verfahrensweisen und die Maßnahmen zum Schutz Ihrer personenbezogenen Daten, damit Sie sich auf dieser Grundlage Ihre eigene Meinung bilden und eine Entscheidung treffen können. Sollte Ihnen etwas unklar sein, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt, bevor Sie Ihre Zustimmung erteilen. Sie können sich wegen Rückfragen auch zu einem späteren Zeitpunkt an Herrn Dr. Holländer oder an Herrn Dr. Klingen wenden.

1. Ziele der Studie

In der vorliegenden Studie soll die Rolle des IGF/mTOR Stoffwechselweges und seiner regulierenden mikroRNAs für die Adipositas Erkrankung und ihren Krankheitsverlauf untersucht werden. Ferner sollen altersabhängige epigenetische Veränderungen, die mit der Entwicklung von Adipositas zusammenhängen, aufgeklärt werden.

2. Um welche Art von Biomaterialien und Daten handelt es sich?

Bei dem Biomaterial, das bei Ihnen gewonnen werden soll, handelt es sich um Blut, das im Rahmen der Blutabnahme abgenommen wird. Hierbei soll zusätzlich eine kleine Menge Blut (ca.20ml) entnommen werden. Die erhobenen Daten umfassen ausgewählte Informationen zu Ihrer Person, insbesondere medizinische Daten: Grunderkrankung (Grund für die Operation), evtl. Vorerkrankungen wie Alter und



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

Geschlecht. In den prä- und postoperativen Blutuntersuchungen werden verschiedene medizinische Parameter bestimmt. Ferner werden molekularbiologische Parameter im Rahmen der Untersuchung des mTOR Stoffwechselweges bestimmt sowie epigenetische Veränderungen, die mit der Entwicklung von Adipositas und/oder Alterungsprozessen zusammenhängen.

3. Wie werden die Biomaterialien und Daten verwendet?

Das von Ihnen zur Verfügung gestellte Blut und die medizinischen/molekularbiologischen Daten werden ausschließlich für folgende Forschungsgebiete verwendet:

Erforschung der Adipositas Erkrankung in Bezug auf den IGF/mTOR Stoffwechselweg und diesen regulierende mikroRNAs sowie auf altersabhängig mit der Erkrankung einhergehende epigenetische Veränderungen.

Das Blut und die Daten werden ausschließlich für diese Fragestellung verwendet. Sie haben das Recht, in Ihrer Einwilligungserklärung individuelle Eingrenzungen (z.B. den Ausschluss bestimmter Forschung, den Ausschluss der Weitergabe der Materialien an Dritte) vorzunehmen.

4. Welche Risiken sind mit Ihrer Spende verbunden?

a. Gesundheitliche Risiken:

Da wir für die Studie lediglich Blut verwenden wollen, das im Rahmen, der bei Ihnen vorgesehenen diagnostischen oder therapeutischen Maßnahmen ohnehin entnommen wird und als Restmaterial normalerweise vernichtet würde, ist die Spende für Sie mit keinem zusätzlichen gesundheitlichen Risiko verbunden.

b. Weitere Risiken:

Bei jeder Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Daten aus Ihren Biomaterialien im Rahmen von Forschungsprojekten bestehen Vertraulichkeitsrisiken (z.B. die Möglichkeit, Sie zu identifizieren), insbesondere im Hinblick auf die Information zu Ihrer Erbsubstanz. Diese Risiken lassen sich nicht völlig ausschließen und steigen, je mehr Daten miteinander verknüpft werden können, insbesondere auch dann, wenn Sie selbst (z.B. zur Ahnenforschung) genetische Daten im Internet veröffentlichen. Wir versichern Ihnen, alles nach dem Stand der Technik Mögliche zum Schutz Ihrer Privatsphäre zu tun und



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

Proben und Daten nur an Projekte weiterzugeben, die ein geeignetes Datenschutzkonzept vorweisen können (siehe Punkt 8: „Wer hat Zugang zu Ihren Biomaterialien und Daten?“).

5. Welcher Nutzen ergibt sich für Sie persönlich?

Persönlich können Sie für Ihre Gesundheit keinen unmittelbaren Vorteil oder Nutzen aus der Spende Ihrer Proben und Daten erwarten. Die Ergebnisse sind ausschließlich zu Forschungszwecken bestimmt. Eine Rückmeldung von Ergebnissen aus der Untersuchung der Biomaterialien ist nicht vorgesehen.

6. Welcher Nutzen ergibt sich für unsere Gesellschaft?

Alle derzeit durchgeführten wie auch künftige medizinisch-wissenschaftliche Forschungsvorhaben zielen auf eine Verbesserung unseres Verständnisses für die Krankheitsentstehung und die Diagnosestellung und auf dieser Basis auf die Neuentwicklung von verbesserten Behandlungsansätzen.

7. Welche Voraussetzungen gelten für die Nutzung Ihrer Biomaterialien und Daten?

- a. Voraussetzung für die Gewinnung und Nutzung Ihrer Biomaterialien samt den zugehörigen personenbezogenen Daten zu Forschungszwecken ist Ihre schriftliche Einwilligung. Ihre Einwilligung ist freiwillig und kann jederzeit widerrufen werden (siehe auch Punkt 11 „Was beinhaltet Ihr Widerrufsrecht?“). In diesem Fall, bitte an Herrn Dr. Holländer oder an Herrn Dr. Klingen wenden.
- b. Ihre Biomaterialien und Daten werden in unserem Forschungslabor unter standardisierten Qualitäts- und Sicherheitsbedingungen aufbewahrt und auf Antrag für Forschungszwecke herausgegeben. Sie werden nach dem Stand der Technik vor unbefugtem Zugriff gesichert.
- c. Voraussetzung für die Verwendung der Biomaterialien und Daten für ein konkretes medizinisches Forschungsprojekt ist, dass das Forschungsvorhaben durch eine Ethikkommission bewertet wurde. Die Ethikkommission prüft die ethischen und rechtlichen Aspekte des Forschungsprojekts.



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

8. Wer hat Zugang zu Ihren Biomaterialien und Daten und wie werden sie geschützt?

a. Alle unmittelbar Ihre Person identifizierenden Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift, Überleben etc.) werden unverzüglich nach ihrer Gewinnung durch einen Code ersetzt (pseudonymisiert, verschlüsselt). Danach wird der Datensatz nochmals neu kodiert und gespeichert. Diese doppelte Kodierung schließt eine Identifizierung Ihrer Person durch Unbefugte nach heutiger Kenntnis weitestgehend aus. Erst in dieser Form werden die Biomaterialien und Daten für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

b. Die Sie unmittelbar identifizierenden Daten bleiben in dem Krankenhaus, in dem die Proben und Daten gewonnen wurden und werden dort getrennt von den Biomaterialien und medizinischen Daten gespeichert. Ein Zugriff auf sie erfolgt nur, um entweder weitere oder fehlende medizinische Daten aus Ihren Krankenunterlagen zu ergänzen oder erneut mit Ihnen in Kontakt zu treten, falls Sie der Kontaktaufnahme zugestimmt haben (s. unten Punkt 10). Eine Weitergabe der personenbezogenen Daten an Forscher oder andere unberechtigte Dritte, etwa Versicherungsunternehmen oder Arbeitgeber, erfolgt nicht.

c. Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Ergebnissen erfolgen ausschließlich anonymisiert, also in einer Form, die keine Rückschlüsse auf Ihre Person zulässt.

9. Erlangen Sie einen finanziellen Vorteil aus der Nutzung Ihrer Biomaterialien und Daten?

Für die Überlassung Ihrer Biomaterialien und Daten erhalten Sie kein Entgelt. Sollte aus der Forschung ein kommerzieller Nutzen erzielt werden, werden Sie daran nicht beteiligt. Mit der Überlassung der Biomaterialien an die Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß und Kinderchirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes werden diese Eigentum der Klinik.

Ferner ermächtigen Sie die Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Ihre Daten zu nutzen. Dabei haben Sie das Recht, fehlerhaft gespeicherte oder bearbeitete Daten jederzeit zu berichtigen.

10. Erfolgt eine erneute Kontaktaufnahme mit Ihnen?

Zur Erhebung von weiteren Verlaufsdaten planen wir im Rahmen einer weiteren Vorstellung bei Patienten mit Gewichtsreduktion eine weitere Blutentnahme 3 bzw. 6 Monate nach OP.



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

11. Was beinhaltet Ihr Widerrufsrecht?

Sie können Ihre Einwilligung zur Verwendung Ihrer Biomaterialien und Daten jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für Sie widerrufen. Im Falle eines Widerrufs können Sie entscheiden, ob Ihre Biomaterialien vernichtet und die dazu gehörenden Daten gelöscht werden sollen, oder ob sie in anonymisierter Form für weitere Forschungsvorhaben verwendet werden dürfen. Sobald der Bezug der Biomaterialien und der übrigen Daten zu Ihrer Person gelöscht wurde, ist eine Vernichtung jedoch nicht mehr möglich. Zudem können Daten aus bereits durchgeführten Analysen nicht mehr entfernt werden.

Wenden Sie sich für einen Widerruf bitte an:

Prof. Dr. med. M. Glanemann

Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes

66421 Homburg

Telefon: 06841 – 163 1000

Telefax: 06841 – 163 1002

Email: allgemeinchirurgie.studien@uks.eu

c. Einverständniserklärung



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

Einverständniserklärung**Adipositas-Studie**

„Erforschung der Adipositas Erkrankung in Bezug auf den IGF/mTOR Stoffwechselweg und diesen regulierende mikroRNAs sowie auf altersabhängig mit der Erkrankung einhergehende epigenetische Veränderungen.“

Name der Patientin/des Patienten:

.....

Prüfärztin/Prüfarzt: Frau/Herr Dr. med.

hat mit mir heute ein ausführliches Aufklärungsgespräch über Art, Umfang und Bedeutung dieser klinischen Studie geführt. Dabei wurden u.a. Studienziel und Studienlänge, studienbedingte Erfordernisse und mögliche Nachteile/Risiken der Studienbehandlung besprochen. Die Patienteninformation sowie ein Exemplar der Einverständniserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden. In diesem Zusammenhang bestehende Fragen wurden besprochen und beantwortet. Ich hatte ausreichend Zeit, mich für oder gegen eine Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden.

Folgende Fragen/ sonstige Aspekte wurden zusätzlich diskutiert:

Mir ist bekannt, dass diese Studie in erster Linie der medizinischen Wissenserweiterung dient und gegebenenfalls auch keinen persönlichen Vorteil für mich bringen kann.

Ich bin darüber unterrichtet worden, dass meine Teilnahme vollkommen freiwillig erfolgen muss und ich meine Einwilligung zur Teilnahme an dieser klinischen Prüfung jederzeit ohne Angabe von Gründen und



Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Leitung: Prof. Dr. Matthias Glanemann

ohne persönlichen Nachteil widerrufen kann. Auch der Arzt kann aufgrund seiner ärztlichen Erfahrung die Prüfung jederzeit beenden. Es gelten die im Aufklärungstext beschriebenen Maßnahmen zur Wahrung des Datenschutzes; eine Weitergabe von Krankheitsdaten erfolgt nicht.

Datenschutz

Ihre personenbezogenen Daten werden in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Die für die Studie wichtigen Daten (siehe oben) werden in pseudonymisierter Form auf einen Dokumentationsbogen übertragen, in elektronischer Form gespeichert und ausgewertet.

Pseudonymisiert bedeutet Verschlüsselung von Daten, das heißt, es werden keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet, sondern nur ein Nummerncode. Die Zuordnung der Daten oder Proben zu einer Person ist nur möglich, wenn hierfür der Schlüssel eingesetzt wird, mit dem die Daten pseudonymisiert wurden. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Bei einer möglichen Veröffentlichung der Studienergebnisse wird Ihre Identität nicht enthüllt. Die ärztliche Schweigepflicht und die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes werden eingehalten.

Ich bin einverstanden, als Patient/in an dieser klinischen Studie teilzunehmen.

Das zugehörige Kapitel "Datenerhebung (auf Seite 4 der Patienteninformation zu dieser Studie) und Datenschutz" (siehe obigen Kasten) habe ich gelesen und stimme dem beschriebenen Vorgehen zu.

Name des Patienten/in

Ort, Datum

Unterschrift Patient/in

Name d. aufklärenden Arztes/Ärztin

Ort, Datum

Unterschrift aufklärende/r. Arzt/Ärztin

d. Übersicht der Adipositasprobanden

Tabelle 17: Übersicht der Adipositasprobanden

Probanden	Geschlecht	Geburtsdatum	BMI VCD (kg/m ²)	BMI 12MNK (kg/m ²)	Komorbiditäten
ADI-8	w	16.06.1972	50,84	37,00	aH, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, GERD, OSAS, Hypothyreose, Depression
ADI-24	m	10.07.1953	46,94	32,78	T2DM, aH, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, OSAS
ADI-26	w	11.10.1994	59,30	40,00	WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, Hypothyreose, CHE
ADI-29	w	24.05.1974	64,46	39,38	Lipödem, Lymphödem, GERD, Asthma/ COPD, Hypothyreose, Varikosis
ADI-32	w	06.09.1978	56,31	34,17	Fettstoffwechselstörung, Lymphödem, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, Hypothyreose, MALT-Lymphom
ADI-33	w	18.03.1982	55,15	31,14	T2DM, aH, Hypothyreose, Depression
ADI-40	w	30.10.1989	54,00	46,19	Fettstoffwechselstörung, WS-Schmerzsyndrom, Asthma/ COPD, Hypothyreose, Depression
ADI-41	w	01.07.1965	58,29	44,30	T2DM, aH, Fettstoffwechselstörung, Lymphödem, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, GERD, Asthma/ COPD, Hypothyreose, Varikosis
ADI-42	m	19.10.1956	50,34	36,61	aH, Hypothyreose
ADI-43	w	07.06.1994	60,94	31,80	T2DM, aH, Lipödem, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, Steatosis hepatis, Asthma/ COPD, Varikosis, Depression
ADI-44	w	12.08.1974	60,24	36,30	T2DM, aH, Arthrose, GERD, Asthma/ COPD, CHE, Malignes Melanom
ADI-45	w	29.06.1974	46,48		-
ADI-48	w	26.05.1977	55,21	34,49	T2DM, aH, Steatosis hepatis, Hypothyreose

ADI-49	m	31.01.1978	61,86		Lipödem, Asthma/ COPD, Hypothyreose, Varikosis
ADI-50	m	15.11.1972	52,05	45,25	T2DM, aH, WS-Schmerzsyndrom, Steatosis hepatis, CHE
ADI-51	m	03.06.1973	40,90		T2DM, aH, Fettstoffwechselstörung, WS-Schmerzsyndrom, Asthma/ COPD, Depression
ADI-52	w	03.12.1976	44,63	33,56	T2DM, Asthma/ COPD, Hypothyreose, Depression
ADI-54	m	30.06.1980	69,94	44,65	T2DM, aH, GERD, Varikosis
ADI-57	w	13.03.1986	85,20		aH, Fettstoffwechselstörung, Gicht, WS-Schmerzsyndrom, Asthma/ COPD, CHE
ADI-59	w	28.11.1966	43,96	27,60	aH, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, Steatosis hepatis, Rektumkarzinom
ADI-62	w	19.12.1979	57,00	40,27	T2DM, aH, Lipödem, WS-Schmerzsyndrom, Arthrose, Steatosis hepatis, GERD, Asthma/ COPD, Depression
ADI-63	w	09.05.1990	77,61		T2DM, Arthrose, Steatosis hepatis, GERD, Depression

e. Übersicht der Kontrollkohorte

Tabelle 18: Übersicht der Kontrollkohorte

Kontrollen	Geburtsdatum	Geschlecht	BMI (kg/m²)
ADI-K-6	14.01.1988	m	24,10
ADI-K-9	15.01.1975	m	24,50
ADI-K-12	20.05.1962	w	23,40
ADI-K-15	08.12.1973	w	23,20
ADI-K-19	21.12.1986	m	22,40
ADI-K-20	03.05.1983	w	22,80
ADI-K-21	26.01.1998	w	22,10
ADI-K-22	06.05.1998	w	18,30
ADI-K-23	25.04.1978	w	23,84
ADI-K-24	05.04.1999	w	19,66
ADI-K-25	24.07.1998	w	20,70
ADI-K-26	11.07.1994	w	22,43
ADI-K-27	20.09.1998	w	21,30
ADI-K-31	20.03.1972	w	24,90
ADI-K-32	24.02.1986	m	22,49
ADI-K-33	12.04.1996	m	20,76
ADI-K-34	18.09.1959	w	24,74
ADI-K-35	26.07.1962	m	24,44
ADI-K-36	28.04.1966	w	20,31
ADI-K-37	12.05.1969	w	20,07

Publikationen

I. Schwörer, C. Rubie, L-K. Feiner, S. Holländer, M. Glanemann: Bariatric surgery counteracts insulin dependency of adipose patients under the simultaneous significant reduction of mTOR gene expression. In *Innovative Surgical Sciences* 6 (Special Suppl 1): S1–S80. DOI: 10.1515/iss-2021-2001, Abstract ID 38 (Abstracts DGAV 2021).

Poster Präsentation im Rahmen des Deutschen Chirurgenkongress 2021 (DGCH Annual Congress 2021): Bariatric surgery counteracts insulin dependency of adipose patients under the simultaneous significant reduction of mTOR gene expression.

Zweitbeste Poster Präsentation der DGAV Rapid Communication - Metabolische Chirurgie

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Glanemann, Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Doktorarbeit. Die Faszination für den Bereich der Allgemein- und Viszeralchirurgie durfte ich in seiner Abteilung am Universitätsklinikum des Saarlandes während meiner Famulatur und meiner Zeit als studentische OP-Assistentin und Tutorin erfahren, wofür ich Herrn Prof. Dr. Glanemann sehr dankbar bin.

Frau PD Dr. Rubie möchte ich herzlichst für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit im Forschungslabor danken. Sie gab mir die Möglichkeit die Promotion im Labor durchzuführen und unterstützte mich währenddessen tatkräftig. Dank ihr erhielt ich die Möglichkeit, mein Wissen im Bereich der Grundlagenforschung aufzubauen und zu erweitern.

Den Mitarbeiterinnen im Labor, Laura-Kim Feiner und Bianca Kruse, gebührt ebenfalls mein größter Dank, da ich ohne ihre ständige Unterstützung diese Promotion nicht hätte durchführen können. Die beiden erläuterten mir die Tätigkeit im Forschungslabor, halfen bei jedem Problem und hatten immer ein offenes Ohr für mich und meine Doktorarbeit.

Ohne meine Familie, insbesondere meine Eltern, hätte ich das Medizinstudium niemals bewältigen können. Sie ermöglichten mir mein Studium, ebenso wie meine Auslandsaufenthalte und unterstützen mich in allen Situationen meines Lebens. Hierfür bin ich ihnen zutiefst dankbar.

Neben meinen Freunden möchte ich mich insbesondere bei meinem Freund bedanken, der mich liebevoll, geduldig und immer tatkräftig während meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützte.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Kolloquiumsvermerk

Tag der Promotion: 19.12.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Glanemann
Prof. Dr. Marcin Jan Krawczyk

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Martin van der Laan