

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Auswirkungen des  
Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen und des  
Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen auf die  
Insulinsensitivität**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

MESUT ÖZEKER  
aus Böblingen

2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. A. Fritsche

Professor Dr. S. Jacob

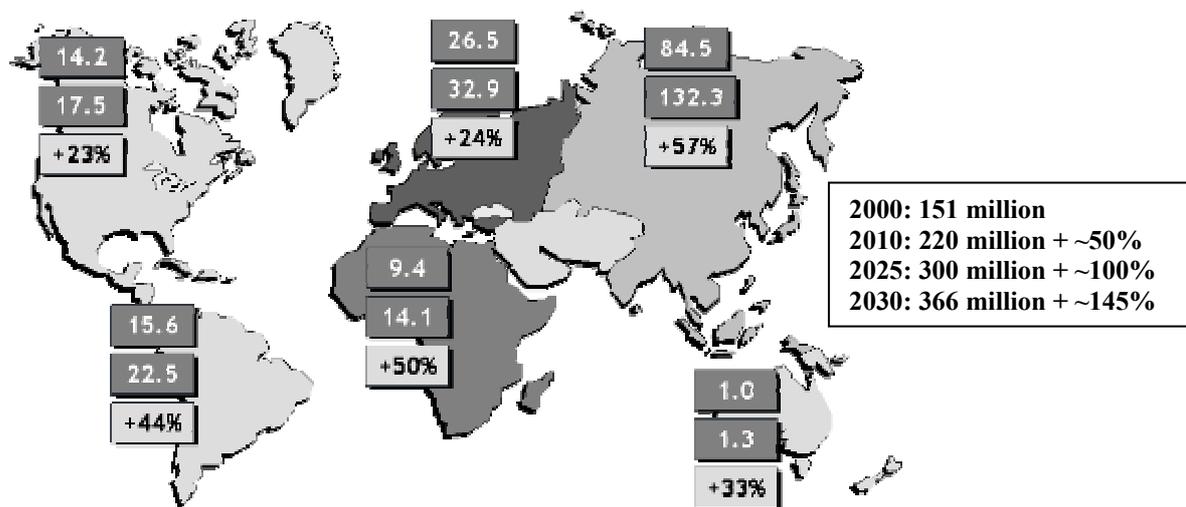
Meiner Frau Sandra und meinen Kindern Enisa und Malik  
gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>2</b>
1.1 Prädiktoren für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes.....	4
1.1.1 Insulinresistenz.....	5
1.1.2 Gestörte Insulinsekretion.....	6
1.1.3 Übergewicht.....	6
1.2 Molekulargenetische Interaktionen bei Typ-2-Diabetes.....	7
1.2.1 PPAR.....	7
1.2.2 PPAR $\gamma$ -2 Pro 12 Ala Polymorphismus.....	8
1.2.3 Insulin Rezeptor Substrate (IRS).....	9
1.2.4 IRS-1 Polymorphismus.....	10
1.3 Ziel der Arbeit.....	12
<b>2 Methodik</b> .....	<b>13</b>
2.1 TÜFF-Projekt und Studienteilnehmer.....	13
2.2 Studienablauf.....	14
2.2.1 Oraler Glukosetoleranztest.....	15
2.2.2 Hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp.....	16
2.3 Berechnungen sowie statistische Auswertungen.....	17
2.3.1 Berechnung der Insulinsensitivität aus dem OGTT.....	17
2.3.2 Genetische Analyse.....	18
2.3.3 Berechnung der Insulinsensitivität aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp.....	19
2.3.4 Statistische Analyse.....	19
2.4 Apparaturen.....	20
2.5 Parameterbestimmung.....	21
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
3.1 Verteilung der Genotypen.....	22
3.2 Ergebnisse bei PPAR $\gamma$ 2.....	23
3.3 Ergebnisse bei IRS-1.....	24
3.4 Ergebnisse in den Kombinationsgruppen.....	25
3.5 Insulinsensitivität bei PPAR $\gamma$ 2.....	26
3.6 Insulinsensitivität bei IRS-1.....	28
3.7 Insulinsensitivität in den Kombinationsgruppen.....	30
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>32</b>
4.1 Genetische Prädisposition.....	32
4.2 PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala Polymorphismus.....	34
4.3 IRS-1 Gly972Arg Polymorphismus.....	36
4.4 Kombination des PPAR $\gamma$ 2 (Pro12Ala) und IRS-1 (Gly972Arg) Polymorphismus.....	37
4.5 Limitation.....	38
4.6 Schlussfolgerung.....	39
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>40</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>42</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>43</b>
<b>8 Danksagung</b> .....	<b>53</b>
<b>9 Lebenslauf</b> .....	<b>54</b>

# 1 Einleitung

Der Typ-2-Diabetes ist weltweit die häufigste metabolische Erkrankung. Es ist hinreichend bekannt, dass die Zahl der Diabetiker, vor allem der Typ-2-Diabetiker, enorm im Ansteigen begriffen ist. Während die Zahl der Diabetiker im Jahre 2000 weltweit noch bei etwa 177 Millionen lag, rechnet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit einem Anstieg auf 366 Millionen bis zum Jahre 2030. Dies bedeutet einen Anstieg der Prävalenz von 2,8 % auf 4,4 % über alle Altersgruppen (1,2,3).



**Abbildung 1.1:** Entwicklung des Typ-2-Diabetes von 2000 bis 2010 und erwartete Entwicklung bis in Jahr 2030 (nach Wild S, et al. Diabetes Care 2004; 27; 1047-1053. Adapted from Zimmet P, et al. Nature 2001; 414; 782-787.)

Für Deutschland war nach Datenlage des Diabetesregisters der ehemaligen DDR (4) sowie der Krankenkassendaten der AOK Dortmund (5) die Prävalenz Ende der 80er Jahre bezogen auf die Gesamtbevölkerung 4,8 %. Dies entspricht einem Diabetikerbestand von 3,84 Millionen. Neuere epidemiologische Studien (16,6,7) lassen den Schluss zu, dass in den letzten Jahren die Diabetesprävalenz weiterhin angestiegen ist und zurzeit mit einem Bestand von 4,6 Millionen (entsprechend 5,6 % der

Bevölkerung) zu rechnen ist. Unter Berücksichtigung der Zunahme der Lebenserwartung, der Adipositasfrequenz, Anwendung neuer diagnostischer Möglichkeiten sowie Etablierung der Vorsorgemaßnahmen zur Erfassung des Typ-2-Diabetes ist zu prognostizieren, dass in wenigen Jahren die Prävalenzgrenze von 7 % in Deutschland erreicht wird. (8,9)

Erschreckend ist auch die Tatsache, dass weltweit besonders in Industrieländern die Anzahl der Jugendlichen, die an Typ-2-Diabetes erkranken infolge von Bewegungsmangel und „falscher“ Ernährung stetig zunimmt. Zahlen zur Häufigkeit des Typ-2-Diabetes wurden in einer Studie in Südbayern angesammelt. In einer Gruppe von 520 stark übergewichtigen Kindern und Jugendlichen im Alter zwischen 9 und 20 Jahren fand sich bei 6,7 Prozent ein Hinweis für eine Störung des Zuckerstoffwechsels, bei 1,5 Prozent lag definitionsgemäß bereits ein Typ-2-Diabetes vor (13). Auch wenn die Gesamtzahl der Kinder und Jugendlichen mit Typ-2-Diabetes noch deutlich unter der mit Typ-1-Diabetes liegen dürfte, ist wegen der besorgniserregenden Zunahme der Zahl übergewichtiger Kinder und Jugendlicher mit einem weiteren Anstieg zu rechnen.

Dies bekräftigt jedoch auch die Untersuchungen zum familiären Auftreten von Typ-2-Diabetes. Erbliche Faktoren haben nachweislich ebenfalls eine Relevanz in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes. Es ist bekannt, dass ein homozygoter Zwilling eines an Typ-2-Diabetes erkrankten Zwillingsbruders ebenfalls ein 80%iges Risiko hat einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln. Eine monogenetische Ursache wurde zwar nicht gefunden, man weiß jedoch bereits um polygenetische Variationen im Insulinrezeptor-System oder der in das Insulinsignalsystem wirkenden Rezeptoren der Zellkerne und des dadurch darstellbaren unterschiedlichen Risikos einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln.

Die Langzeitprognose der Erkrankung wird neben den mikrovaskulären Komplikationen, wie Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie, im besonderen Maße durch die hohe Anzahl der makrovaskulären Komplikationen wie Arteriosklerose bestimmt. Koronare Herzerkrankungen nehmen in

der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik bei an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Personen die führende Rolle ein (10,11). Die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen wird jedoch schon in der prädiabetischen Phase vermutet, da bei ca. 50% der Typ-2-Diabetiker bei Diagnosestellung eine KHK vorliegt. In dieser Phase, in der noch eine gewisse Normoglykämie vorliegt, sind erhöhte Insulinkonzentrationen im Serum nachweisbar, welche als Hauptfaktor für die Entwicklung der Makroangiopathie in der prädiabetischen Phase vermutet wird (12).

Mit der vorliegenden Arbeit soll dem Verständnis der metabolischen Vorgänge in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 sowie Veränderungen im Zusammenhang mit molekulargenetischen Ursachen ein Beitrag geleistet werden. Dabei wird die Insulinsensitivität als Marker für das Risiko einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln in Gegenüberstellungen verschiedener Polymorphismen untersucht und somit eine mögliche Interaktion dieser Polymorphismen miteinander dargestellt.

## **1.1 Prädiktoren für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes**

In der Pathogenese für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes spielen drei Störungen von metabolischen Vorgängen eine wichtige Rolle: Erhöhte Insulinresistenz, gestörte Insulinsekretion sowie Übergewicht (18). Viele Studien haben bewiesen, dass diese drei metabolischen Funktionsstörungen bei den meisten Betroffenen vor dem Auftreten eines Typ-2-Diabetes schon nachweisbar sind. In einer Langzeitstudie an PIMA-Indianern, eine Population mit der höchsten dokumentierten Prävalenz an Typ-2-Diabetes, zeigte sich dass die Entwicklung von normaler Glukosetoleranz zur Glukosetoleranzstörung bis hin zum Diabetes assoziiert war mit der Zunahme von Körpergewicht, Abnahme des Insulinstimulierten Glukosegehalts sowie Abnahme der akuten Insulinsekretion auf intravenöse Glukosegabe (15). Diese

einzelnen Faktoren wirken in ihrer Rolle als Prädiktoren unabhängig voneinander.

### **1.1.1 Insulinresistenz**

Die Insulinresistenz spielt nach heutigen Erkenntnissen die zentrale Rolle in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes. Insulinresistenz wird definiert als subnormale biologische Antwort auf eine gegebene Insulinkonzentration (17). Es ist davon auszugehen, dass die Insulinresistenz multifaktoriell und polygenetisch determiniert ist (21). Im Gegensatz zu großen Unterschieden in der interindividuellen Insulinsensitivität zeigte sich in Untersuchungen von Familien nur eine geringe Schwankung der Insulinsensitivität, was auf eine hereditäre Komponente hinweist (19, 20). Neben der Genetik und der Lebensart spielen vermutlich auch endotheliale Faktoren eine Rolle (22). Ursache in der Störung der insulinstimulierten Glucoseaufnahme im Muskel scheint eine ineffektive Aktivierung des Enzyms Glykogensynthetase zu sein. Vermutlich ist der zugrunde liegende Defekt nicht am Enzym selbst, sondern vielmehr an der Signaltransduktionskaskade, die stimulierende Signale vom Insulinrezeptor zur Glykogensynthetase überträgt. Funktionell relevante Mutationen des Rezeptors und der Signaltransduktionselemente wurden jedoch bisher bei Personen mit Typ-2-Diabetes nur vereinzelt gefunden. Während der genetisch determinierte primäre Defekt in der Signaltransduktionskette bisher nicht identifiziert ist, ließen sich sowohl Effekte auf die Expression spezifischer Signaltransduktionselemente als auch Funktionsstörungen auf Rezeptorebene charakterisieren, die als regulatorische Mechanismen den vermuteten primären Defekt sowohl kompensieren als auch sekundär weiter verstärken können. Die wichtigsten resistenzverstärkenden Faktoren, wie mangelndes Muskeltraining, Adipositas sowie metabolische Entgleisung können offensichtlich eine Signalhemmung auf Rezeptor- und Postrezeptorebene induzieren (23).

## 1.1.2 Gestörte Insulinsekretion

Dem Typ-2-Diabetes liegt jedoch nicht nur eine Insulinresistenz sondern auch eine gestörte Insulinsekretion zugrunde. Es handelt sich vor allem um quantitative Veränderungen der Insulinsekretion. Anfangs kommt es bei erhöhter Insulinresistenz zur kompensatorischen Erhöhung der Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Bei gesteigerter Insulinresistenz kommt es jedoch zur Dekompensation des Systems und damit zur Manifestation des Typ-2-Diabetes. In der Physiologie der Insulinsekretion kann man zwei Phasen unterscheiden. In der ersten Phase wird kurzfristig und schnell Insulin sezerniert, das vor allem für die Regulation der hepatischen Glukoseproduktion verantwortlich ist. In der zweiten Phase wird in größeren Mengen und lang anhaltend Insulin sezerniert, welches hauptsächlich für die Glukoseaufnahme in der Peripherie benötigt wird. Bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes kommt es erst zur Abnahme der Insulinsekretion in der ersten Phase. Die Sekretion in der zweiten Phase nimmt mit zunehmender Insulinresistenz in der Entwicklung der gestörten Glukosetoleranz zunächst zu. In der weiteren Entwicklung des Diabetes nimmt schließlich auch in der zweiten Phase die Insulinsekretion ab, so dass es schließlich bei Manifestation des Typ-2-Diabetes zum deutlichen Insulinmangel kommt (15, 21, 23).

## 1.1.3 Übergewicht

Etwa 85% der Typ-2-Diabetiker sind übergewichtig. Umgekehrt ist Adipositas in hohem Maße mit erhöhter Insulinresistenz assoziiert (26). Deshalb gilt ein hoher Körperfettanteil als eines der stärksten Determinanten der Insulinresistenz. Lange Zeit konnte man lediglich die freien Fettsäuren als Bindeglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz aufzeigen. Freie Fettsäuren entstehen bei der Hydrolyse der Triglyceride im Speicherfett. Bei Adipositas ist die Freisetzung von freien

Fettsäuren gesteigert. Die freien Fettsäuren konkurrieren auf zellulärer Ebene mit der Glukose um die oxidativen Kapazitäten, hemmen den Glukosetransport in die Muskelzelle und stimulieren in der Leber die Glukoneogenese (27). Erkenntnisse aus biotechnologischen, molekularbiologischen und pharmakologischen Studien in den letzten Jahren zeigten jedoch, dass die Fettzellen neben den freien Fettsäuren weitere biologische Funktionen haben. Fettgewebe sezerniert nämlich so genannte Adipokine. Peptidhormone, die auf dem Blutweg zu ihren Zielzellen gelangen und dort spezifische biologische Wirkungen entfalten. Adipozyten sezernieren beispielsweise Komponenten des RAAS-Systems, womit sich eben auch eine Verbindung zum Hypertonus herstellen lässt. Für die Vermittlung der Insulinresistenz werden die Peptide TNF- $\alpha$  (28), Resistin (29), Interleukin-6 (29) und Adiponectin (31) diskutiert. Darüber hinaus wird das Protein Leptin bei der Appetitregulation aus den Adipozyten sezerniert (32).

## **1.2 Molekulargenetische Interaktionen beim Typ-2-Diabetes**

### **1.2.1 PPAR**

Die Peroxisome-Proliferator Activated Receptors (PPARs) gehören zu der Familie der Steroid-Hormonrezeptoren der Transkriptionsfaktoren auf der Zellkernmembran. Nach Bindung an spezielle Liganden und Bildung eines Komplexes mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) werden Signale ins Zellkerninnere weitergeleitet und so die Genexpression reguliert (33).

Es gibt bisher drei bekannte Isoformen: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  und PPAR $\gamma$ .

PPAR $\alpha$  wird stark in Leber, Herz, Muskulatur und Niere wie auch in der Arterienwand exprimiert. Hier reguliert der Rezeptor die Expression von Genen, die bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und beim Metabolismus von Lipoproteinen eine Rolle spielen.

PPAR $\beta$  (auch PPAR $\delta$  genannt) wird ubiquitär exprimiert. Die biologische Funktion dieses Rezeptors ist weniger gut untersucht als die der Subtypen  $\alpha$  und  $\gamma$ .

PPAR $\gamma$  wird vornehmlich im Fettgewebe exprimiert, wo er wesentlich für die Reifung des Präadipozyten zum Adipozyten und für den Glucosestoffwechsel ist (33).

Es werden die Isoformen PPAR $\gamma$ 1, - $\gamma$ 2 und - $\gamma$ 3 unterschieden. PPAR $\gamma$ 1 und - $\gamma$ 3 haben unterschiedliche Promotoren und unterscheiden sich auf Ebene der mRNA, während das fertige Protein identisch ist. PPAR $\gamma$ 2 ist gegenüber den anderen Isoformen am N-Terminus um 31 Aminosäuren verlängert. Die Isoformen entstehen durch alternatives splicing. Die funktionellen Unterschiede sind jedoch noch unklar (34, 36).

Natürliche Liganden dieser Rezeptoren sind Prostaglandin J2 und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure (37).

Aber auch künstliche Liganden wie die Thiazolidinedione setzen ebenfalls an diesen Rezeptoren an und verbessern dadurch die Insulinsensitivität und das Lipidprofil. Thiazolidinedione werden heutzutage als Insulinsensitizer bei der Behandlung des Typ-2-Diabetes eingesetzt.

### 1.2.2 PPAR $\gamma$ -2 Pro 12 Ala Polymorphismus

Ein struktureller Polymorphismus durch einen Nukleotidaustausch auf Exon 12 im PPAR $\gamma$  Gen hat einen Austausch der Aminosäure Prolin (Pro) durch Alanin (Ala) zur Folge (38).

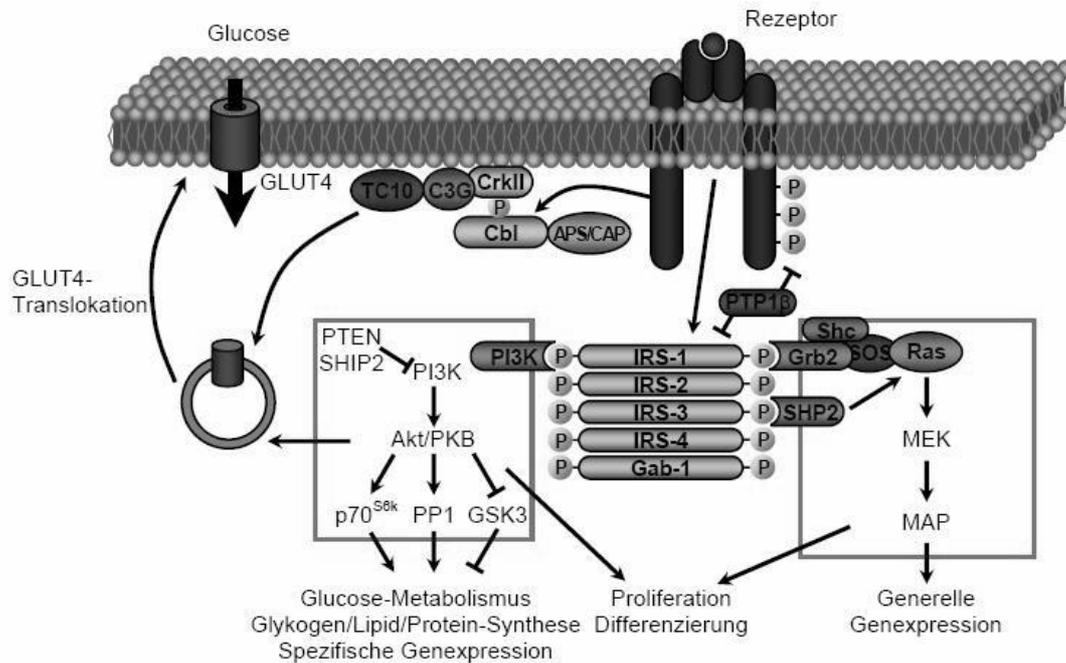
Die Häufigkeit dieses Polymorphismus ist in den verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen unterschiedlich. In einer Studie zeigte sich eine Häufigkeit des Ala-Allels für die weiße Bevölkerung Amerikas und Europas von 12%, für Japaner ca. 2% und ca. 1% für Chinesen (38).

In In-Vitro Untersuchungen konnten verminderte Transkriptionsaktivitäten beim Vorliegen des Ala-Allels nachgewiesen werden (39).

In Vivo zeigten die bisherigen Studien insbesondere in Bezug auf Insulinsensitivität unterschiedliche Ergebnisse. In manchen Studien zeigte die Prävalenz des Ala-Allels ein deutlich reduziertes Risiko für Typ-2-Diabetes (40). Einige Studien konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Polymorphismen zeigen (41) oder es zeigte sich nur eine Signifikanz in ausgewählten Subgruppen (42).

### **1.2.3 Insulin Rezeptor Substrate (IRS)**

Die Interaktion von Insulin mit den Zielzellen findet über den Insulinrezeptor statt. Das Insulinrezeptor-Protein setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die jeweils paarweise angeordnet sind. Extrazellulär liegen die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten, an welchen das Insulin bindet. Übertragen wird das Signal per Konformationsänderung, wodurch die intrazellulär liegenden  $\beta$ -Untereinheiten aktiviert werden (43). Sie haben eine Tyrosinkinasefunktion (44), ihre Substrate sind die Insulinrezeptorsubstrat-Proteine. Die Insulinrezeptor Substrate sind eine Gruppe von Proteinen, die alle durch den Insulinrezeptor phosphoryliert werden. Bisher gefundene Substrate des Insulinrezeptors sind das IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4 und Grb2-associated binding protein (Gab 1) (siehe Abb.1)(45, 46, 47, 48 49).



**Abbildung 1.2:** Signaltransduktion. Die Bindung von Insulin an den Insulin-Rezeptor aktiviert verschiedene Signalkaskaden. Diese koordinieren verschiedene Prozesse in der Zelle (nach Saltiel & Kahn, 2001)

Die Insulinrezeptorsubstrate unterscheiden sich in ihrer Funktion, in ihrer Expression sowie in ihrem Vorkommen in den jeweiligen Zellen. IRS-1 und IRS-2 kommen ubiquitär vor, sind jedoch nicht in ihrer Funktion insbesondere in Glukogenese (Leber), Glukolyse (Skelettmuskulatur und Adipozyten) und Insulinproduktion ( $\beta$ -Zellen Pankreas) austauschbar. Im Gegensatz zu den anderen Insulinrezeptorsubstraten, die eine untergeordnete Rolle im Insulinsignal-System spielen, scheint dass IRS-1 hauptsächlich in der Skelettmuskulatur zu wirken, wahrend IRS-2 in der hepatischen Insulinwirkung sowie der  $\beta$ -Zell Entwicklung im Pankreas hauptsächlich wirkt.

### 1.2.4 IRS-1 Polymorphismus

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Erforschung der Insulinresistenz sind die genetischen Variationen von Komponenten der Insulinrezeptorkaskade. Im Insulinrezeptorgen

finden sich verschiedene Polymorphismen (siehe Tabelle 1.1) (50).

IRS1		IRS2		IRS4	
Codon	Änderung	Codon	Änderung	Codon	Änderung
170	Pro→Arg	647	Leu→Val	34	Leu→Phe
209	Met→Thr	879	Gly→Ser	411	Arg→Gly
513	Ala→Pro	1057	Gly→Asp	584	Gly→Cys
809	Ser→Phe			879	His→Asp
819	Gly→Arg			883	Lys→Thr
893	Ser→Gly				
972	Gly→Arg				
1221	Arg→Cys				

**Tabelle 1.1:** Polymorphismen in den IRS Genen

Manche dieser Änderungen führen zu verschiedenen Syndromen mit teilweise schwerer Insulinresistenz. "Typ-A-Syndrom", Leprechaunismus, Rabson-Mendenhall-Syndrom oder "Lipoatrophic Diabetes" entstehen durch Defekte der Rezeptorexpression, der Ligandenbindung oder der Tyrosinkinaseaktivität (51). Diese Syndrome sind vom Typ-2-Diabetes zu unterscheiden.

Genort für IRS- 1 ist der lange Arm des humanen Chromosom 2 (50). Neben einigen nicht stoffwechselwirksamen Polymorphismen (53) ist vor allem der Aminosäureaustausch von Glycin (Gly) zu Arginin (Arg) in Codon 972 in Bezug auf Typ-2-Diabetes Thema vieler Studien (52). Dieser Polymorphismus tritt bei Typ-2-Diabetikern gehäuft auf (53, 54). Eine Zusammenfassung von Untersuchungen in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen ergab eine Genfrequenz der Gly972Arg-Variante bei Typ-2-Diabetikern von 10,7 % gegenüber 5,8 % bei den Kontrollpersonen (54). Bei übergewichtigen Trägern des Arg-Allels zeigt sich eine Stoffwechsellage, die deutlich durch Insulinresistenz gekennzeichnet ist. Die Insulinsensitivität war um bis zu 50 % reduziert (55, 56). Es scheint als ob dieser Polymorphismus ein erhöhtes Risiko in der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes bewirkt.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bei nicht diabetischen, gesunden Probanden, welche jedoch ein erhöhtes familiäres Diabetesrisiko haben, den Einfluss des Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen und den Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen auf die Insulinsensitivität zu untersuchen. Insbesondere soll der Einfluss der Kombination dieser beiden Polymorphismen auf die Insulinsensitivität untersucht werden.

Diese Studie wurde durchgeführt um die Hypothese zu prüfen, dass die Anwesenheit des Gly972Arg Polymorphismus im Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) bei Trägern des Ala-Allels im PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala Polymorphismus die Insulinsensitivität in besonderer Weise beeinflusst.

## 2 Methodik

### 2.1 TÜFF-Projekt und Studienteilnehmer

Diese Studie erfolgte im Rahmen des TÜFF-Projektes im Universitätsklinikum Tübingen.

Das TÜFF-Projekt (Tübinger Familien Früherkennungsprojekt) ist eine Großangelegte prospektive Studie zur Früherkennung metabolischer Störungen bei Verwandten Ersten Grades an Typ-2-Diabetes erkrankten Personen.

Das primäre Ziel dieser Studie ist dieses Kollektiv, hinsichtlich ihres erhöhten genetischen Risikos und einer gestörten Insulinsensitivität zu untersuchen.

Alle Teilnehmer wurden im Rahmen des TÜFF-Protokolls anthropometrisch, genotypisch, laborchemisch sowie metabolisch charakterisiert.

Die hier untersuchten Personen waren alle körperlich gesund und hatten eine unauffällige Glukosetoleranz.

Die Daten der Probanden die am oralen Glukosetoleranztest und an der hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp Untersuchung teilgenommen haben, sind den Tabellen 2.1 und Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Probanden(=n)	387	
Geschlecht (männlich/weiblich)	148 / 239	
	Mittelwert	Bereich
Alter (Jahre)	34	16 - 69
Größe (cm)	172	153 - 199
Gewicht (kg)	75	49 – 175
BMI (Body Mass Index)	25	17 – 49
WHR (Waist to Hip Ratio)	0,84	0,61 – 1,05

**Tabelle 2.1** Anthropometrische Daten Probanden insgesamt. Bei diesen Probanden wurde ein OGTT durchgeführt

Probanden(=n)	206	
Geschlecht (männlich/weiblich)	101 / 105	
	Mittelwert	Bereich
Alter (Jahre)	31	16 - 58
Größe (cm)	174	154 - 196
Gewicht (kg)	74	49 – 175
BMI (Body Mass Index)	24	17 – 49
WHR (Waist to Hip Ratio)	0,83	0,61 – 1,05

**Tabelle 2.2** Anthropometrische Daten der Probanden bei denen zusätzlich eine hyperinsulinämische euglykämische Clamp Untersuchung durchgeführt wurde

## 2.2 Studienablauf

Zur Ermittlung der Glukosetoleranz wurde ein standardisierter oraler Glukosetoleranztest angewandt.

Um die Insulinresistenz der Probanden zu bestimmen wurde eine hyperinsulinämische euglykämische Clamp Untersuchung angewandt.

Der Ablauf der Untersuchungen gestaltete sich wie folgt:

Nach Aufnahme der Probanden erfolgte eine ausführliche Aufklärung über Durchführung, Risiken, Ziele und Nutzen der Studie. Außerdem wurde eine schriftliche Einverständniserklärung von den Probanden eingeholt.

Daraufhin erfolgte, nach Bestimmung von Größe, Gewicht, Bauch- und Hüftumfang, der orale Glukosetoleranztest. Zusätzlich wurde ein Anamnesefragebogen zur eigener – und familiärer Krankengeschichte, Berufs- und Freizeitaktivitäten und Essgewohnheiten erhoben. Anschließend wurde die Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse gewonnen. Ergänzend erfolgte eine Quantifizierung der körperlichen Leistungsfähigkeit mittels eines Fahrradergometers. Nach Ablauf der Untersuchung wurde ein Termin zur hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp Untersuchung angeboten. Während der Tests verliefen die Abnahmen der Blutproben nach einem festen Schema.

Das Studienkonzept wurde zur Begutachtung der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt und die Zustimmung zur Untersuchung am Menschen eingeholt.

### 2.2.1 Oraler Glukosetoleranztest

Nach den Kriterien der American Diabetes Association (ADA) werden aufgrund der Nüchternblutzuckerwerte die Glukosetoleranz wie in Tabelle 2.3 eingeteilt:

BZ nüchtern	Definition der Glukosetoleranz
< 6,2 mmol/l (=110 mg/dl)	= normale Glukosetoleranz
6,2 mmol/l (=110 mg/dl) – 7,0 mmol/l (=126 mg/dl)	= gestörte Glukosetoleranz
≥ 7,0 mmol/l (=126 mg/dl)	= Diabetes mellitus

**Tabelle 2.3:** Einteilung der Glukosetoleranz nach ADA

Nach Kriterien der World Health Organisation (WHO) erfolgt die Definition der Glukosetoleranzstörung nach den Blutzuckerwerten 120 Minuten nach Aufnahme einer standardisierten Menge einer Glukoselösung im Sinne eines oralen Glukosetoleranztests. Diese Werte sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

BZ 120 Min.	Definition der Glukosetoleranz
< 7,8 mmol/l (=140 mg/dl)	= normale Glukosetoleranz
7,8 mmol/l (=140 mg/dl) – 11,2 mmol/l (=200 mg/dl)	= gestörte Glukosetoleranz
≥ 11,2 mmol/l (=200 mg/dl)	= Diabetes mellitus

**Tabelle 2.4:** Einteilung der Glukosetoleranz nach WHO

Die in dieser Studie untersuchten Patienten hatten nach den Kriterien der ADA und der WHO eine normale Glukosetoleranz.

#### Durchführung:

Nach legen einer Venenverweilkanüle in eine Kubitalvene erfolgt eine Blutentnahme zur Bestimmung von Nüchternblutzuckerwert, Insulin und zur Bestimmung des IRS1 und PPAR $\gamma$ 2 Genotyps. Nach oraler Einnahme einer wässrigen Lösung von 75 g Glukose innerhalb 5 Minuten, erfolgten weitere Blutentnahmen zu den

Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Glukoseeinnahme zur Bestimmung der Glukose und Insulinwerte. (siehe Abbildung 2.1).

Zeit (Min)	Bestimmung von			Genotypisierung
	Glukose	Insulin		
⇒	Legen einer Venenverweilkanüle			
0	x	x		x
⇒	Gabe von 75 g Glukose oral (innerhalb 5 Minuten)			
30	x	x		
60	x	x		
90	x	x		
120	x	x		

**Abbildung 2.1:** Ablaufschema oraler Glukosetoleranztest

### 2.2.2 Hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp

Der hyperinsulinämische euglykämische Clamp erlaubt eine Quantifizierung der durch Insulin stimulierten Glukoseaufnahme unter standardisierten Bedingungen. Die Blutinsulinwerte werden durch Gabe von Insulin auf ein hohes Niveau angehoben und durch eine kontinuierliche Insulininfusion mittels Perfusor mit einer Insulindosis von 1mU/kg/min auf diesem Niveau gehalten. Die Plasmaglukose wird durch eine Glukoseinfusion im euglykämischen Bereich gehalten. (24)

#### Durchführung:

Zur Durchführung der Untersuchung war es erforderlich zwei venöse Zugänge vor Beginn der Untersuchung zu legen. Ein Zugang diente zur regelmäßigen Blutentnahme. Es erfolgten Blutentnahmen alle 5 – 10 Minuten zur Bestimmung der Blutglukose-Konzentration. Dabei wurde zudem durch die Erwärmung der Hand mit einem Lichtbogen und die Platzierung des Zugangs so weit wie möglich distal eine Arterialisierung des Blutes erreicht (25). Die Seruminsulin-Konzentration wurde hier nach 100, 110 und 120 Minuten bestimmt. Der zweite Zugang wurde am anderen Arm des Patienten gelegt, um durch die Infusionen, die durch diesen Zugang dem Patienten zugeführt wurden, die Messungen nicht zu beeinflussen.

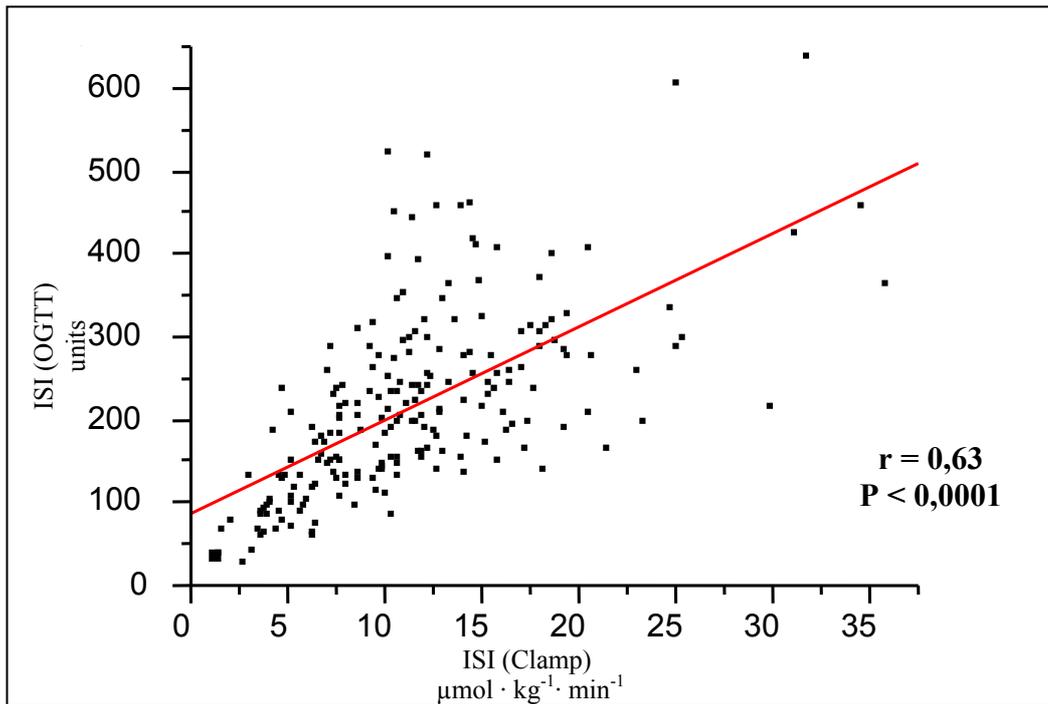
## 2.3 Berechnungen sowie statistische Auswertungen

### 2.3.1 Berechnung der Insulinsensitivität aus dem OGTT

Zur Bekräftigung der Ergebnisse aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp, wurden auch die Patientin in die Berechnungen aufgenommen, welche nur ein OGTT erhalten haben. Anhand des von Matsuda beschriebenen Index erfolgte die Berechnung eines Insulinsensitivitäts-Index anhand der Daten des OGTT (ISI(OGTT)) (57). Dieser Index wird wie folgt berechnet:

$$10000 / \sqrt{\text{Gluc}_0 \times \text{Ins}_0 \times \text{Gluc}_{\text{mean}} \times \text{Ins}_{\text{mean}}}$$

Gluc<sub>0</sub> und Ins<sub>0</sub> sind dabei Glukose- und Insulinkonzentration vor Beginn des OGTT, d.h. bei 0 Minuten. Gluc<sub>mean</sub> und Ins<sub>mean</sub> entsprechen der durchschnittlichen Glukose- bzw. Insulinkonzentration während des OGTT. Dabei wurden die Werte bei 30, 60, 90 und 120 Minuten in die Berechnung übernommen. Bei den 206 Probanden, bei denen ein OGTT und ein hyperinsulinämische euglykämische Clamp Untersuchung durchgeführt wurde, ergab sich eine hohe Korrelation zwischen dem Insulinsensitivitäts-Index aus dem OGTT (ISI(OGTT)) sowie dem Insulinsensitivitäts-Index aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp (ISI(Clamp)) (siehe Abb.2.2)



**Abbildung 2.2:** Lineare Korrelation zwischen Insulinsensitivitäts-Index aus dem OGTT (ISI(OGTT)) und Insulinsensitivitäts-Index aus der hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp Untersuchung (ISI(Clamp))

### 2.3.2 Genetische Analyse

Die genetische Analyse des Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen und des Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion und Enzym Restriktion mittels MvaI (Roche Applied Science, Milan, Italy).

### 2.3.3 Berechnung der Insulinsensitivität aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp

Der Insulinsensitivitäts-Index aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp (ISI(Clamp)) in  $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{pM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  wurde errechnet aus der durchschnittlichen Infusionsrate an exogen zugeführtem Glukose ( $\mu\text{mol}/\text{kg}$  pro Minute), welcher zu Erhaltung der Euglykämie in den letzten 60 Minuten benötigt wurde, dividiert durch die Insulinkonzentration in diesem Zeitintervall.

### 2.3.4 Statistische Analyse

Die folgenden Daten werden, außer wenn anders angegeben, mit Durchschnittswert(Mean)  $\pm$  Standardabweichung(SD) angegeben. Der statistische Vergleich der einzelnen Gruppen erfolgte mittels:

- Student t-Test bei zwei Gruppen
- Varianzanalyse bei vier Gruppen bei normalverteilten Parametern
- Wilcoxon-Test bei unbekannt verteilten Parametern
- Zur Prüfung einer Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk Test angewandt.
- Die Genotypenverteilung wurde mittels Pearson's Chi square Test untersucht

Die Insulinsensitivitäts-Indizes (aus OGTT und hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp) wurden nach Body Mass Index (BMI) bereinigt, da sich hier eine hohe Korrelation zeigte.

Ein P Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur Auswertung wurde die Software JMP 4.0 (SAS Institute, Cary, N.C., USA) angewandt.

## 2.4 Apparaturen

Die Durchführung des oralen Glukosetoleranztests im Rahmen des TÜFF-Projektes erfolgte unter Verwendung folgender Geräte:

Plasmaglukosemessgerät: Ysi®  
Hersteller: Yellow Springs Instruments, USA  
Verwendung: Blutzuckerbestimmung

Zur Durchführung der Glukose-Clamp Untersuchung wurden folgende Geräte verwendet:

Infusionspumpe: Perfusor® Secura FT  
Hersteller: B.Braun Melsungen AG, Melsungen  
Verwendung: Insulininfusion

Infusionspumpe: Infusomat®  
Hersteller: B.Braun Melsungen AG, Melsungen  
Verwendung: Glukoseinfusion

Plasmaglukosemessgerät: Ysi®  
Hersteller: Yellow Springs Instruments, USA  
Verwendung: Blutzuckerbestimmung

## 2.5 Parameterbestimmung

Zur Bestimmung der einzelnen Parameter wurden folgende Verfahren angewandt:

Glukose (beim oralen Glukosetoleranztest):

Ysi®

Hersteller: Yellow Springs Instruments, USA

Prinzip: Glukoseoxidase

Glukose (bei der Glukose Clamp Untersuchung):

HemoCue®

Hersteller: HemoCue AB Ängelholm, Schweden

Prinzip: Enzymatischer Test

Insulin: MEIA ABBOTT®

Hersteller: MEIA ABBOTT, Wiesbaden

Prinzip: Microparticle Enzyme Immunoassay

Genotypisierung:

Hersteller: Applied Biosystems Inc, USA

Prinzip: Polymerasekettenreaktion

MvaI

Hersteller: Roche Applied Science, Milan, Italy

Prinzip: Enzymrestriktion

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Verteilung der Genotypen

Wie aus den folgenden Tabellen 3.1 und 3.2 ersichtlich zeigte sich bei IRS-1 eine Häufigkeit des Arg-Allels von 8,7 % und bei PPAR $\gamma$ 2 eine Häufigkeit des Ala-Allels von 12,3 % im Vergleich zur Gesamtanzahl der Probanden. Die Verteilungen der verschiedenen Genotypen im PPAR $\gamma$ 2 sowie im IRS-1 Gen zeigten sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

PPAR $\gamma$ 2 (Pro12Ala)					
	Pro / Pro	Pro / Ala	Ala / Ala	X/Ala	P <sup>a</sup>
n OGTT	300	79	8	87	0,80
n clamp	156	45	5	50	0,86

<sup>a</sup>Pearson's Chi square test  $\chi^2$

**Tabelle 3.1:** Anzahl der verschiedenen Genotypen im PPAR $\gamma$ 2 Gen bei OGTT und hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp. Zusammengefasster Polymorphismus von Pro/Ala und Ala/Ala zu X/Ala

IRS-1 (Gly972Arg)					
	Gly /Gly	Gly / Arg	Arg / Arg	X/Arg	P <sup>a</sup>
n OGTT	328	55	4	59	0,60
n clamp	179	26	1	27	0,99

<sup>a</sup>Pearson's Chi square test  $\chi^2$

**Tabelle 3.2:** Anzahl der verschiedenen Genotypen im IRS-1.Gen bei OGTT und hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp. Zusammengefasster Polymorphismus von Gly/Arg und Arg/Arg zu X/Arg

Wie in den oben aufgeführten Tabellen wurde auch für die folgenden statistischen Vergleiche die heterozygoten und homozygoten Träger der Polymorphismen als **X/Arg** für IRS-1 Gen und als **X/Ala** für PPAR $\gamma$ 2 Gen zusammengefasst.

## 3.2 Ergebnisse bei PPAR $\gamma$ 2

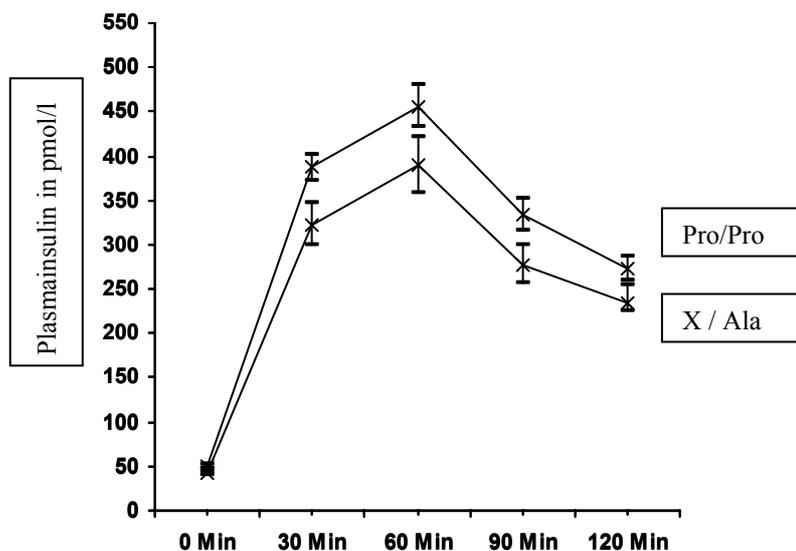
Die folgende Tabelle (Tabelle 3.3) zeigt Mittelwerte und Standardabweichung für Alter, Body Mass Index, Serumglukosewerte für 0 und 120 Minuten und Insulinwerte für 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten bei Pro/Pro oder X/Ala Trägern im PPAR $\gamma$ 2 Gen. In der Darstellung der Plasmainsulinwerte im OGTT über die Zeit zeigt sich bei 30 Minuten ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Pro/Pro Träger zu den X/Ala Trägern im PPAR $\gamma$ 2 Gen.

	Pro/Pro	X/Ala	P
n OGTT (M/F)	300 (111/189)	87 (37/50)	0,80 <sup>a</sup>
n clamp (M/F)	156 (73/83)	50 (28/22)	0,86 <sup>a</sup>
Alter (Jahre)	34 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	0,51 <sup>b</sup>
Body Mass Index	25,6 $\pm$ 0,3	24,4 $\pm$ 0,4	0,04 <sup>b</sup>
Serumglukose nüchtern (mg/dl)	87,4 $\pm$ 0,5	87,8 $\pm$ 0,9	0,77 <sup>b</sup>
Serumglukose 120 Minuten (mg/dl)	96,2 $\pm$ 1,1	94,4 $\pm$ 2,2	0,47 <sup>b</sup>
Plasmainsulin nüchtern (pmol/l)	48,8 $\pm$ 2,1	42,1 $\pm$ 2,5	0,10 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 30 Minuten (pmol/l)	387,2 $\pm$ 15,9	322,9 $\pm$ 24,0	<b>0,03<sup>b</sup></b>
Plasmainsulin 60 Minuten (pmol/l)	456,2 $\pm$ 23,4	389,6 $\pm$ 32,4	0,10 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 90 Minuten (pmol/l)	332,8 $\pm$ 18,2	277,8 $\pm$ 21,7	0,05 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 120 Minuten (pmol/l)	273,4 $\pm$ 12,5	235,5 $\pm$ 19,3	0,14 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Pearson´s Chi square test  $\chi^2$

<sup>b</sup>Students t Test

**Tabelle 3.3:** Messwerte für Pro/Pro und X/Ala Träger im PPAR $\gamma$ 2 Gen.



**Abbildung 3.1:** Plasmainsulin in pmol/l für Pro/Pro vs. X/Ala Träger im PPAR $\gamma$ 2 Gen

### 3.3 Ergebnisse bei IRS-1

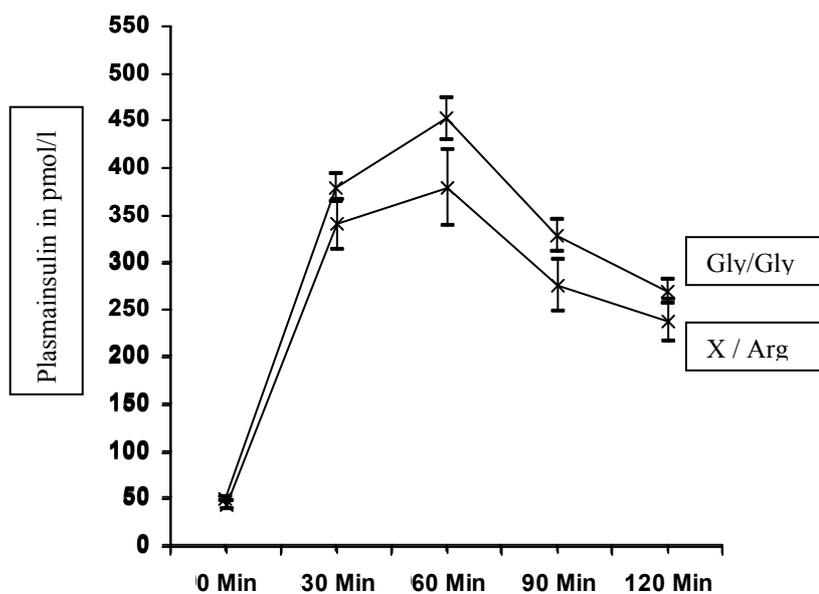
Entsprechend wird in der folgenden Tabelle (Tabelle 3.4) die Daten für Gly/Gly sowie X/Arg Träger im IRS-1 Gen dargestellt. In der Abbildung sind die Plasmainsulinwerte der Gly/Gly dem X/Arg Trägern im IRS-1 Gen gegenüber gestellt. Bei den Plasmainsulinwerten zeigt sich ein geringer jedoch nicht signifikanter Unterschied der jeweiligen Genotypen.

	Gly/Gly	X/Arg	P
n OGTT (M/F)	328 (126/202)	59 (22/37)	0,60 <sup>a</sup>
n clamp (M/F)	179 (88/91)	27 (13/14)	0,99 <sup>a</sup>
Alter (Jahre)	34 ± 1	33 ± 1	0,65 <sup>b</sup>
Body Mass Index	25,5 ± 0,3	24,7 ± 0,6	0,28 <sup>b</sup>
Serumglukose nüchtern (mg/dl)	87,4 ± 0,5	88,1 ± 1,0	0,59 <sup>b</sup>
Serumglukose 120 Minuten (mg/dl)	95,6 ± 1,1	96,9 ± 2,4	0,65 <sup>b</sup>
Plasmainsulin nüchtern (pmol/l)	47,9 ± 1,9	44,0 ± 4,2	0,42 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 30 Minuten (pmol/l)	378,4 ± 15,3	341,4 ± 25,7	0,21 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 60 Minuten (pmol/l)	452,2 ± 21,9	380,2 ± 39,8	0,12 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 90 Minuten (pmol/l)	328,4 ± 16,9	276,0 ± 27,6	0,11 <sup>b</sup>
Plasmainsulin 120 Minuten (pmol/l)	269,5 ± 11,9	239,3 ± 22,4	0,31 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Pearson's Chi square test  $\chi^2$

<sup>b</sup>Students t Test

**Tabelle 3.4:** Messwerte für Gly/Gly und X/Arg Träger im IRS-1 Gen.



**Abbildung 3.2:** Plasmainsulin in pmol/l für Gly/Gly vs. X/Arg Träger im IRS-1 Gen

### 3.4 Ergebnisse in den Kombinationsgruppen

Im folgenden Abschnitt wurden die homozygoten und heterozygoten Träger der jeweiligen Gene zu vier Gruppen kombiniert. Es werden Mittelwerte und Standardabweichung für Alter, Body Mass Index, Serumglukosewerte für 0 und 120 Minuten und Plasmainsulinwerte für 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten dargestellt (Siehe Tabelle 3.5). Es zeigen sich niedrigere Serumglukose- sowie Insulinwerte in der Gruppe D mit Kombination der X/Arg Träger im IRS-1 Gen und X/Ala Träger im PPAR $\gamma$  Gen, diese Unterschiede waren jedoch, außer für nüchtern Serumglukose, in der Varianzanalyse nicht signifikant.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	P
IRS-1	Gly /Gly	Gly/Gly	X/Arg	X/Arg	
PPAR $\gamma$ 2	Pro/Pro	X/Ala	Pro/Pro	X/Ala	
n (OGTT) (M/F)	253 (94/159)	75 (32/43)	47 (17/30)	12(5/7)	0,88 <sup>a</sup>
n (Clamp) (M/F)	136 (64/72)	43 (24/19)	20 (9/11)	7 (4/3)	0,87 <sup>a</sup>
Alter (Jahre)	34 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	32 $\pm$ 2	0,84 <sup>b</sup>
BMI	25,7 $\pm$ 0,3	24,5 $\pm$ 0,4	25,1 $\pm$ 0,7	23,2 $\pm$ 1,0	0,12 <sup>b</sup>
BZ nü. (mg/dl)	87,0 $\pm$ 0,6	88,6 $\pm$ 1,0	89,6 $\pm$ 1,1	82,3 $\pm$ 1,9	<b>0,04</b> <sup>b</sup>
BZ 120 Min (mg/dl)	95,8 $\pm$ 1,3	95,0 $\pm$ 2,4	98,4 $\pm$ 2,5	90,8 $\pm$ 6,4	0,64 <sup>b</sup>
Ins. nü. (pmol/l)	49,0 $\pm$ 2,3	44,2 $\pm$ 2,8	47,9 $\pm$ 5,1	28,8 $\pm$ 2,9	0,18 <sup>b</sup>
Ins. 30Min (pmol/l)	388,5 $\pm$ 18,1	344,2 $\pm$ 26,7	380,2 $\pm$ 29,3	189,7 $\pm$ 21,1	0,06 <sup>b</sup>
Ins. 60 Min (pmol/l)	461,9 $\pm$ 26,3	419,5 $\pm$ 36,2	425,6 $\pm$ 47,5	202,5 $\pm$ 25,3	0,13 <sup>b</sup>
Ins. 90 Min (pmol/l)	336,9 $\pm$ 20,7	299,6 $\pm$ 24,1	310,4 $\pm$ 32,5	141,2 $\pm$ 19,9	0,13 <sup>b</sup>
Ins. 120Min(pmol/l)	274,8 $\pm$ 14,0	251,5 $\pm$ 21,7	265,9 $\pm$ 26,5	135,1 $\pm$ 15,7	0,14 <sup>b</sup>

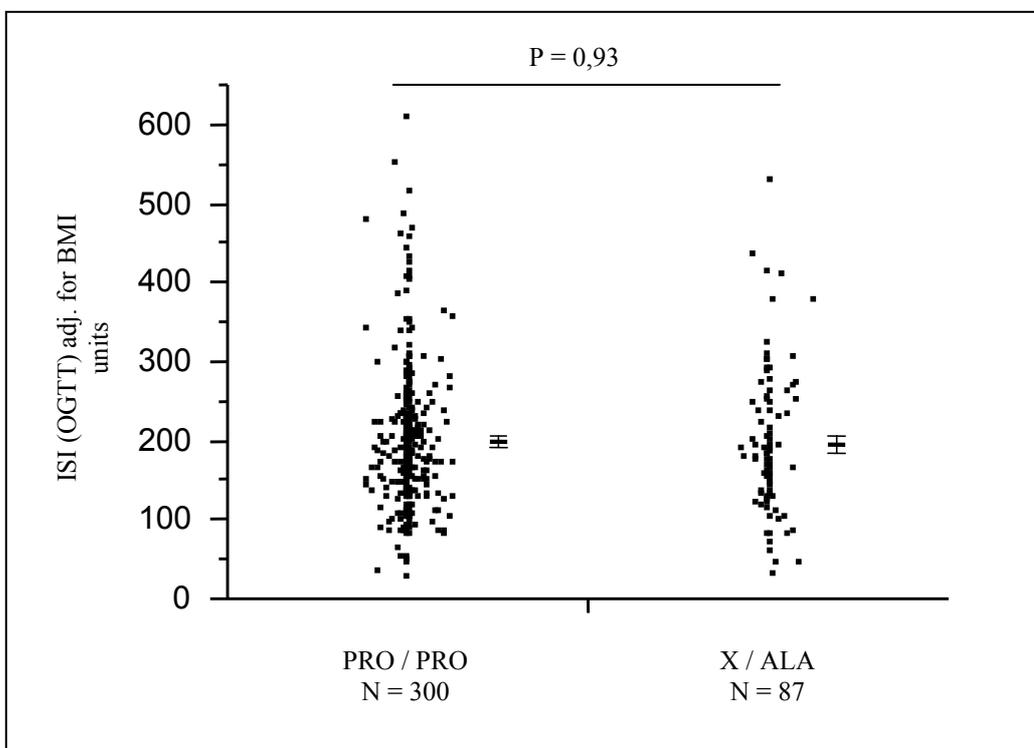
a =  $\chi^2$  test

b = Varianzanalyse

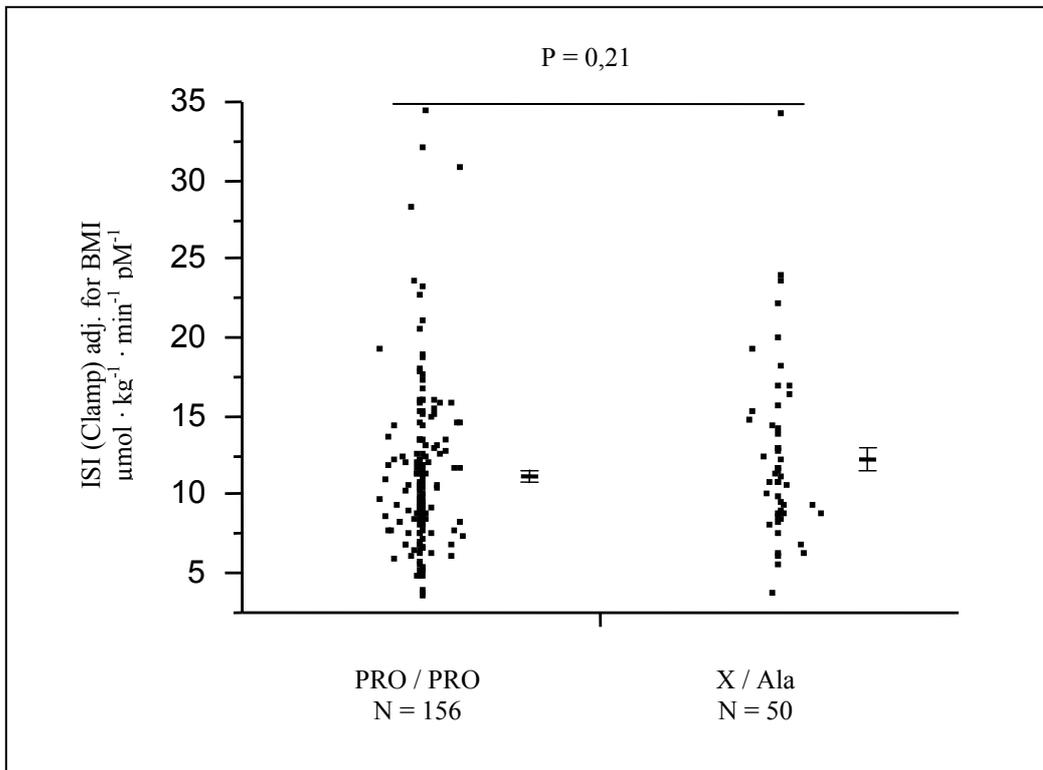
**Tabelle 3.5:** Ergebnisse in den Kombinationsgruppen (Gruppe A bis D) der homozygoten und heterozygoten Träger im PPAR $\gamma$ 2 – und IRS-1 Gen.

### 3.5 Insulinsensitivität bei PPAR $\gamma$ 2

Zwischen der Pro/Pro und X/Ala Trägern im PPAR $\gamma$ 2 Gen, zeigt sich sowohl bei im OGTT als auch im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp gemessener Insulinsensitivität, keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildungen 3.3, 3.4 und Tabelle 3.6)



**Abbildung 3.3:** Insulinsensitivitäts-Index berechnet aus dem OGTT bei Probanden mit Pro/Pro und X/Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen



**Abbildung 3.4:** Insulinsensitivitäts-Index gemessen im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp bei Probanden mit Pro/Pro vs. X/Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen

	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	X/Ala	P
n (OGTT) (M/F)	300 (111/189)	79 (32/47)	8 (5/3)	87 (37/50)	0,88 a
n (Clamp) (M/F)	156 (73/83)	45 (24/21)	5 (4/1)	50 (28/22)	0,87 a
ISI (OGTT) (units)	196 $\pm$ 5,29	197 $\pm$ 10,63	175 $\pm$ 27,79	195 $\pm$ 9,96	0,93 b
ISI (clamp) ( $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	11,20 $\pm$ 0,42	12,01 $\pm$ 0,84	14,84 $\pm$ 2,31	12,30 $\pm$ 0,79	0,21 b

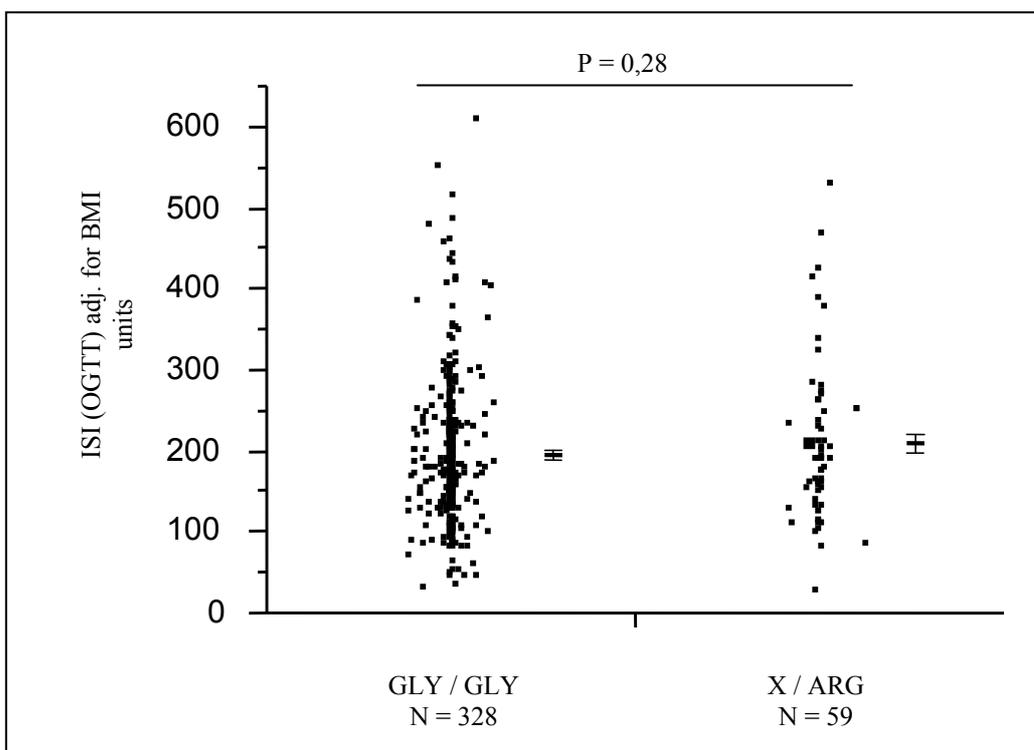
a =  $\chi^2$  test

b = Varianzanalyse gegen X/Ala

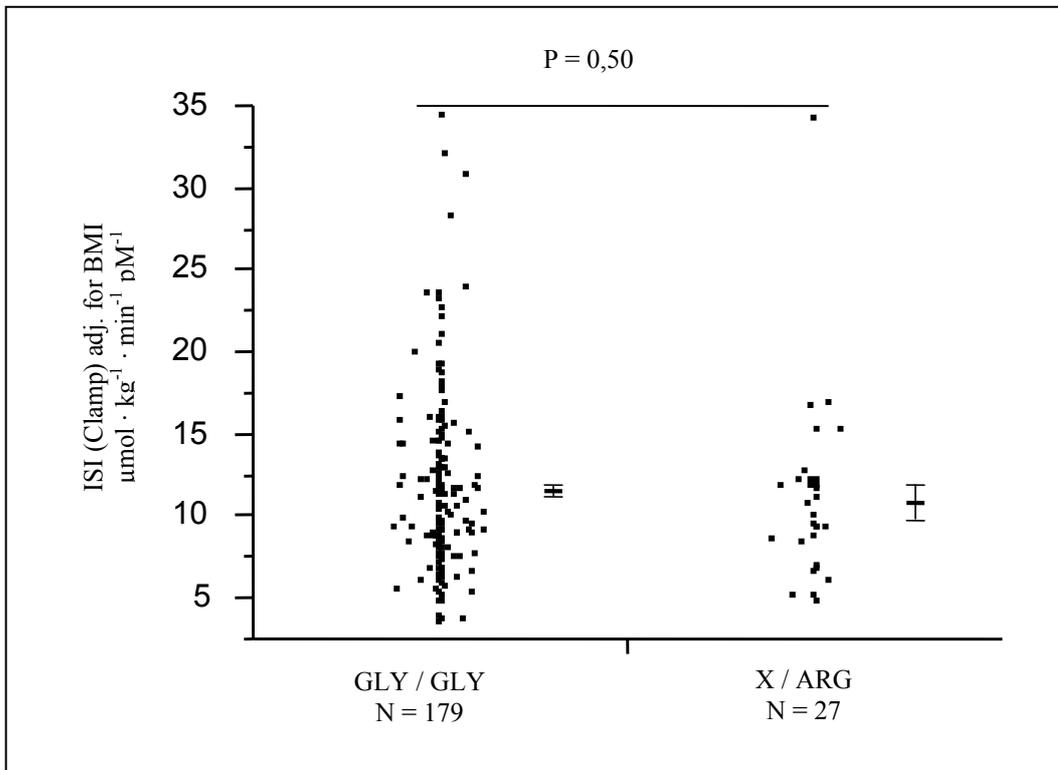
**Tabelle 3.6:** Parameter und Varianzanalyse mit Pro/Pro, Pro/Ala, Ala/Ala und X/Ala im PPAR $\gamma$ 2 Gen

### 3.6 Insulinsensitivität bei IRS-1

In der IRS-1 Patientengruppe zeigte sich bezüglich der Insulinsensitivität zwischen den Gly/Gly und X/Arg Genotypen ebenfalls kein signifikanter Unterschied bei im OGTT oder im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp gemessener Insulinsensitivität. (siehe Abbildungen 3.5, 3.6 ).



**Abbildung 3.5:** Insulinsensitivitäts-Index berechnet aus dem OGTT bei Probanden mit Gly/Gly und X/Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen



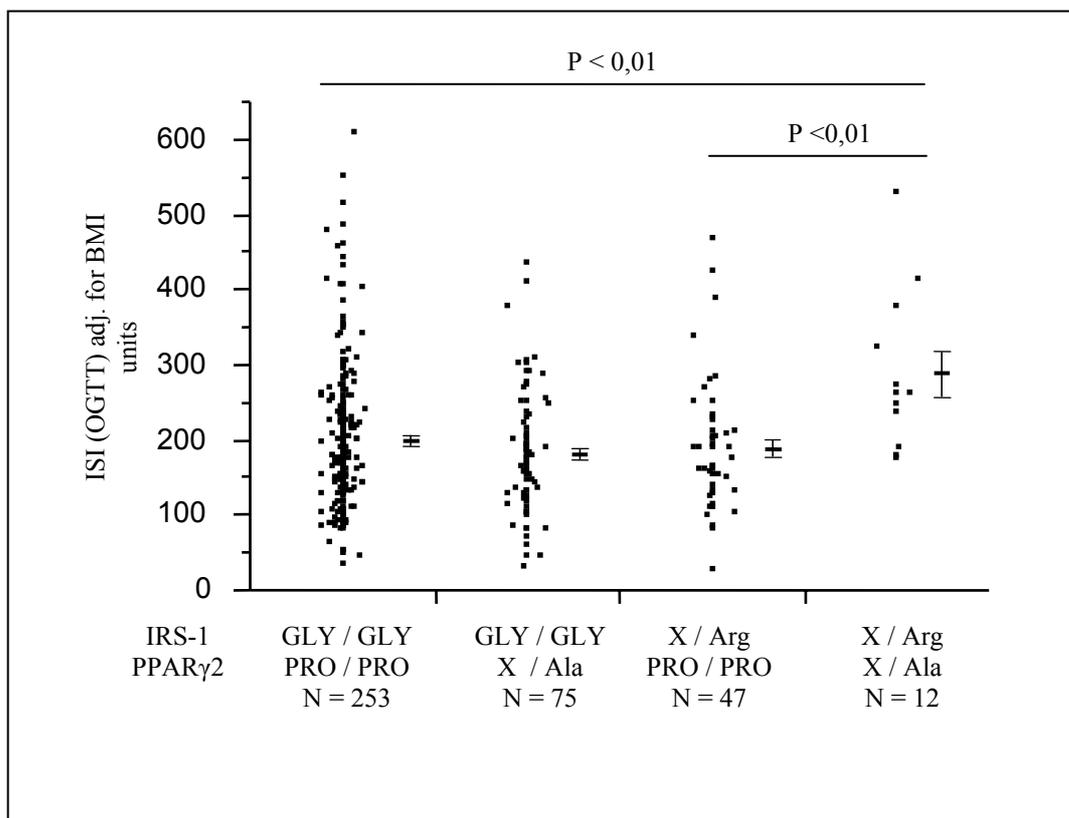
**Abbildung 3.6:** Insulinsensitivitäts-Index gemessen im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp bei Probanden mit Gly/Gly und X/Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen

### 3.7 Insulinsensitivität in den Kombinationsgruppen

Es erfolgte erneut Einteilung in vier Gruppen mit Kombination der homozygoten und heterozygoten Träger in den jeweiligen Genen.

Im Vergleich der Genotyp-Gruppen zeigten sich folgende signifikante Unterschiede für den im OGTT gemessenen Insulinsensitivitätsindizes:

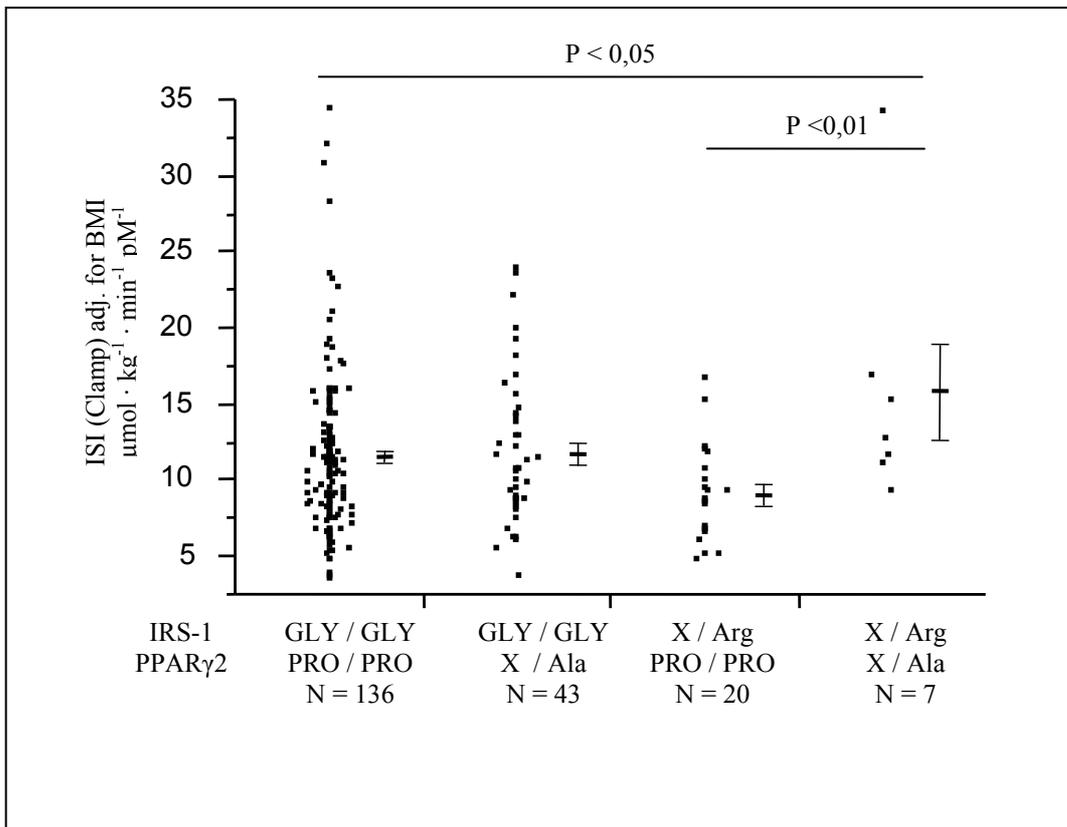
- Gruppe A [Gly/Gly + Pro/Pro] zur Gruppe D [X/Arg + X/Ala] ( $p < 0,01$ )
- Gruppe B [Gly/Gly + X/Ala] zur Gruppe D [X/Arg + X/Ala] ( $p < 0,01$ )
- Gruppe C [X/Arg + Pro/Pro] zur Gruppe D [X/Arg + X/Ala] ( $p < 0,01$ )



**Abbildung 3.7:** Berechneter Insulinsensitivitäts-Index aus dem OGTT in vier Kombinationsgruppen.

Im Vergleich der Genotyp-Gruppen zeigten sich folgende signifikante Unterschiede für den im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp gemessenen Insulinsensitivitätsindizes:

- Gruppe A [Gly/Gly + Pro/Pro] zur Gruppe D [X/Arg + X/Ala] ( $p < 0,05$ )
- Gruppe C [X/Arg + Pro/Pro] zur Gruppe D [X/Arg + X/Ala] ( $p < 0,01$ )



**Abbildung 3.8:** Insulinsensitivitäts-Index gemessen im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp in den vier Kombinationsgruppen

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	P
IRS-1	Gly/Gly	Gly/Gly	X/Arg	X/Arg	ANOVA
PPAR $\gamma$ 2	Pro/Pro	X/Ala	Pro/Pro	X/Ala	
n (OGTT) (M/F)	253 (94/159)	75 (32/43)	47 (17/30)	12(5/7)	
n (Clamp) (M/F)	136 (64/72)	43 (24/19)	20 (9/11)	7 (4/3)	
ISI (OGTT) (units)	198 $\pm$ 5,82	181 $\pm$ 9,52	188 $\pm$ 12,67	287 $\pm$ 30,57	<b>0,002</b>
ISI (clamp) ( $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	11,51 $\pm$ 0,46	11,72 $\pm$ 0,74	9,07 $\pm$ 0,73	15,79 $\pm$ 3,20	<b>0,03</b>

**Tabelle 3.7:** Parameter in den vier Kombinationsgruppen der homozygoten und heterozygoten Träger im PPAR $\gamma$ 2 – und IRS-1 Gen.

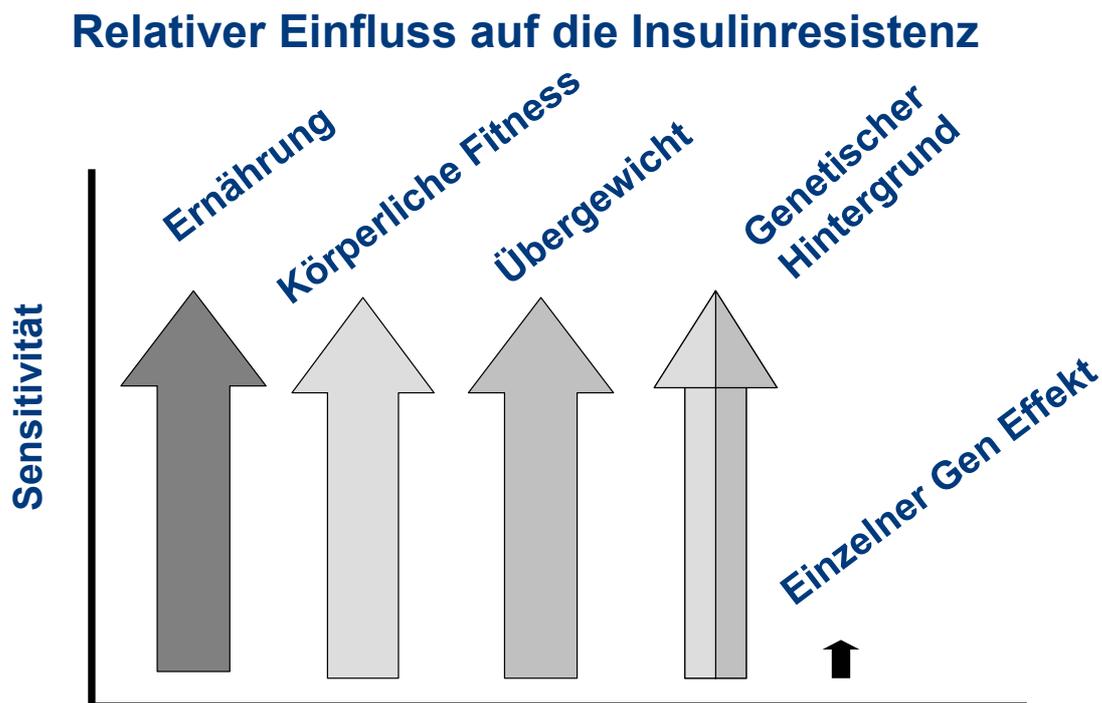
## 4 Diskussion

### 4.1 Genetische Prädisposition

Die Bedeutung der genetischen Prädisposition in der Entstehung des Typ-2-Diabetes ist unumstritten. Eine positive Familienanamnese erhöht das Risiko an Typ-2-Diabetes zu erkranken auf das 2-4 fache. Die Verwandtschaft ersten Grades einer an Typ-2-Diabetes erkrankten Person, entwickeln zu 15-25% eine eingeschränkte Glukosetoleranz oder ebenfalls einen Typ-2-Diabetes. Wenn ein Elternteil an Typ-2-Diabetes erkrankt ist, ist die Wahrscheinlichkeit bis zum 80. Lebensjahr ebenfalls an Typ-2-Diabetes zu erkranken 38%. Bei Erkrankung beider Elternteile an Typ-2-Diabetes erhöht sich die Wahrscheinlichkeit sogar auf 60 % (62). In Zwillingsstudien zeigt sich bei über 60-jährigen eineiigen Zwillingen eine Konkordanzrate von 35-58%. Dagegen bei zweieiigen Zwillingen Konkordanzraten von 17-20%. Wird die pathologische Glukosetoleranz mit einbezogen, erhöhen sich die Konkordanzraten auf bis zu 88% (63, 64, 65). Die Erblichkeit ( $H^2$ ) für Insulinsekretion wird in Familienstudien mit 0,78 geschätzt (66). Für Insulinsensitivität schwanken die Angaben von 0,08 bis 0,46 (65, 66, 67, 68, 69, 70, 71).

Das Problem beim Typ-2-Diabetes ist jedoch, dass die genetische Prädisposition nicht einer monogenen (wie bei MODY) sondern eine polygenen Entstehung zugrunde liegt. Zudem besteht auch eine Interaktion der einzelnen genetischen Effekte miteinander sowie ein Zusammenspiel mit weiteren nicht genetischen Faktoren wie Ernährung, körperliche Aktivität und Übergewicht. Damit handelt es sich beim Typ-2-Diabetes um eine multifaktorielle, polygene Erkrankung die in Interaktion der einzelnen Faktoren in einem schleichenden Prozess zur Manifestation der Erkrankung führt. Die Untersuchung der genetischen Ursachen einer solchen Erkrankung gestaltet sich damit aufgrund der vielen Einflussfaktoren schwierig. Aufgrund dieser großen Heterogenität in der Ätiologie des Typ-2-Diabetes

zeigen bisher durchgeführte genetische Studien sehr unterschiedliche Ergebnisse. Es gibt zwei verschiedenen Ansätze zur Untersuchung von genetischen Faktoren: Die Kandidatengenanalyse und die ganzgenomische Analyse. Die ganzgenomische Analyse dient der Neuentdeckung prädisponierender Gene bzw. Genregionen. In der Strategie der Kandidatengenanalyse, der auch das Prinzip dieser Untersuchung zugrunde liegt, werden spezifische Gene mit plausibler, pathophysiologischer Rolle im Erkrankungsprozess untersucht. Dabei werden signifikante Assoziationen eines Phänotyps zu bestimmten Polymorphismen aufgezeigt. Die Untersuchung einzelner Polymorphismen in Kandidatengen, insbesondere auf die Insulinresistenz, ist jedoch oft nicht zu replizieren. Die Rolle des genetischen Hintergrunds im Einfluss auf die Insulinresistenz soll die folgende Abbildung 4.1 darstellen.



**Abbildung 4.1:** Rolle des genetischen Hintergrundes im Einfluss auf die Insulinresistenz.

Der Genetische Hintergrund hat einen ebenso wichtigen Einfluss auf die Insulinresistenz wie die Ernährung, die körperlichen Fitness oder das Übergewicht. Überdies beeinflusst der genetische Hintergrund auch die körperliche Fitness und das Übergewicht direkt. Die Wirkung eines einzelnen Gen Effektes auf die Insulinresistenz ist jedoch so gering, dass in Studien dies nicht oder nur bei sehr großen Fallzahlen dargestellt werden kann. In der Kombination von Gen Effekten und dadurch Summation der Wirkung einzelner Effekte, kann jedoch manchmal ein signifikanter Unterschied dargestellt werden. Dadurch erst bieten sich manchmal Einblicke in die Prozesse der einzelnen genetischen Gegebenheiten. Mit der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei einem einzelnen Polymorphismus kein signifikanter Effekt auf die Insulinsensitivität. Nach Kombination zweier Polymorphismen konnte jedoch ein deutlicher Effekt auf die Insulinsensitivität dargestellt werden.

## **4.2 PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala Polymorphismus**

Der Pro12Ala Polymorphismus im Codon 12 des Exon 2 des humanen Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) ist der Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchung. Bei den untersuchten 387 Probanden in dieser Studie fanden sich 300 Probanden mit dem Pro/Pro Wildtyp im PPAR $\gamma$ 2 Gen, 79 waren heterozygote (Pro/Ala) und 8 waren homozygote (Ala/Ala) Träger des Ala-Allels. Im Vergleich der Parameter der Wildtyp Träger (Pro/Pro) zu den Ala-Allel Trägern (X/Ala) im PPAR $\gamma$ 2 Gen zeigte sich der Body Mass Index signifikant unterschiedlich ( $p=0,04$ ). Die übrigen Parameter hatten keinen signifikanten Unterschied.

Hinsichtlich des BMI und möglichen Assoziationen mit den Pro12Ala Polymorphismus sind bisherige Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Beamer et al fand bei Kaukasischen Ala-Allel Trägern im PPAR $\gamma$ 2 Gen neben einem niedrigeren HDL Wert auch einen signifikant höheren BMI (72). Auch Cole et al. beschrieb diesen Zusammenhang bei

mexikanischstämmigen Amerikanern (73). Jedoch in den Untersuchungen von Masud et al. an 1170 Kaukasiern mit KHK sowie in deren Meta-Analysen an über 19000 Probanden zeigten sich lediglich bei einem BMI von 27 und mehr eine Assoziation von Ala-Allel Trägern und einem erhöhten BMI. Bei Probanden mit einem BMI kleiner als 27 zeigte sich kein Unterschied bei den Genotypen (74). Es ist unklar in welchem Maße der Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen die Insulinsensitivität direkt oder über den Einfluss auf die Körperfettverteilung (BMI) beeinflusst. Jedoch ist vielleicht durch einen anderen spezifischen Polymorphismus der direkte Effekt des Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 auf die Insulinsensitivität darzustellen.

Hinsichtlich der Beeinflussung der Insulinsensitivität durch den Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen, gibt es in bisherigen Studien uneinige Ergebnisse. Ek et al. sowie Deeb et al. zeigten in Ihren Studien eine verbesserte Insulinsensitivität bei Ala-Allel Trägern im PPAR $\gamma$ 2 Gen (75,76). Dies bestätigte sich in weiteren Studien (77,40). Jedoch in der Studie vom Rosmond et al. zeigte sich sogar ein ungünstiger Einfluss des Ala-Allels auf die Insulinresistenz (78). Weitere Studien zeigten keinen Unterschied in der Insulinsensitivität (40,41) In Meta-Analysen wird insgesamt ein geringer positiver Einfluss des Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen auf die Insulinsensitivität angegeben (60,61).

Die untersuchten Probanden in der vorliegenden Studie mit einem Ala-Allel im PPAR $\gamma$ 2 Gen (X/Ala) im Vergleich zum PPAR $\gamma$ 2 Wildtyp (Pro/Pro) zeigten keinen signifikanten Unterschied sowohl in der Insulinsensitivität im OGTT als auch in der Insulinsensitivität aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp.

### 4.3 IRS-1 Gly972Arg Polymorphismus

Der Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) ist das erste Substrat des Insulinrezeptors in der Insulinsignalkaskade. Anhand von gewebsspezifischen Knockout-Experimenten wurde dargestellt, dass der Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) eine wichtige Rolle in der Insulinwirkung in Skelettmuskulatur, Fettzellen und  $\beta$ -Zellen des Pankreas spielt (79). Folglich sind die Polymorphismen im IRS-1 Gen interessant für Kandidatengenanalysen, welche die Insulinsensitivität beeinflussen könnten (52). 1993 wurden zum ersten Mal Polymorphismen im IRS-1 Gen beschrieben (80). Seither wurde der Einfluss des Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen auf den Typ-2-Diabetes in vielen Studien untersucht (81). Es zeigte sich eine schwache negative Assoziation mit dem Typ-2-Diabetes (60, 81) Hinsichtlich der Insulinsensitivität zeigte sich in einigen Studien eine niedrigere Insulinsensitivität bei Arg-Allel Trägern im IRS-1 Gen (82, 83). In anderen Untersuchungen waren wiederum keine Unterschiede in der Insulinsensitivität darzustellen (52, 84, 85). In weiteren Untersuchungen wurde die Assoziation mit Typ-2-Diabetes durch eine hauptsächliche  $\beta$ -Zelldysfunktion im Pankreas erklärt (86, 87). Jedoch in allen Studien konnte dargestellt werden, dass der Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen bei Diabetikern häufiger auftritt als bei Nichtdiabetikern (54, 55, 56, 81).

Dieser eher ungünstigere Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen wird in der vorliegenden Studie mit dem eher günstigen Pro12Ala Polymorphismus im PPAR $\gamma$ 2 Gen kombiniert und der gemeinsame Effekt auf die Insulinsensitivität dargestellt.

Bei den untersuchten 387 Probanden waren 328 Träger des Gly/Gly Wildtyp im IRS-1 Gen. 55 waren heterozygot (Gly/Arg) und 4 waren homozygot (Arg/Arg) für das Arg-Allel im IRS-1 Gen. Das Arg-Allel hatte mit ca. 18% eine relativ hohe Prävalenz in der Probandengesamtheit. Die übrigen Daten hatten keinen signifikanten Unterschied. Hinsichtlich der Insulinsensitivität zeigten sich kein signifikanter Unterschied zwischen Arg-Allel Trägern und Wildtyp-Trägern im IRS-1 Gen sowohl im

Insulinsensitivitätsindex aus dem OGTT als auch im Insulinsensitivitätsindex aus dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp.

#### 4.4 Kombination des PPAR $\gamma$ 2 (Pro12Ala) und IRS-1 (Gly972Arg) Polymorphismus

Für die Vergleiche der einzelnen Genotypen wurden vier Gruppen mit den jeweiligen Polymorphismen gebildet und die Ergebnisse gegenüber gestellt:

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
IRS-1	Gly /Gly	Gly/Gly	X/Arg	X/Arg
PPAR $\gamma$ 2	Pro/Pro	X/Ala	Pro/Pro	X/Ala

**Tabelle 4.1:** Einteilung und Kombination der verschiedenen Genotypen in vier Gruppen

In der Darstellung der Serumglukosewerte war schon für die kombinierten Träger des Ala-Allels im PPAR $\gamma$ 2 Gen und des Arg-Allels im IRS-1 Gen (Gruppe D) ein leicht erniedrigter Blutzuckerwert, vor Beginn des OGTT, aufzuzeigen.

In der Darstellung der Insulinsensitivität zeigten in den Kombinationen des PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala und IRS-1 Gly972Arg Polymorphismen, dass das Ala-Allel im PPAR $\gamma$ 2 Gen mit dem Gly/Gly Genotyp im IRS-1 Gen (Gruppe B) keine Assoziation mit höherer Insulinsensitivität hat. Jedoch war die Insulinsensitivität bei den Probanden mit dem Ala-Allel im PPAR $\gamma$ 2 Gen bei gleichzeitigem Vorliegen eines Arg-Allels im IRS-1 Polymorphismus (Gruppe D) fast zweimal höher als bei den Probanden mit Pro/Pro Genotyp im PPAR $\gamma$ 2 Gen (Gruppe C). Hier scheint es, dass das Ala-Allel im PPAR $\gamma$ 2 Gen im Zusammenhang mit einem zusätzlichem, eher unvorteilhaftem genetischen Polymorphismus (nämlich dem Arg-Allel im IRS-1), eine günstige Wirkung auf die Insulinsensitivität hat.

Es bleibt ungeklärt, durch welchen Mechanismus der IRS-1 Polymorphismus, welcher für sich keinen erkennbaren Einfluss oder eventuell sogar einen negativen Einfluss auf die Insulinsensitivität hat, in den jeweils unterschiedlichen PPAR $\gamma$ 2

Phänotypen einen Effekt auf die Insulinsensitivität zeigt. Ein möglicher Weg der Interaktion zwischen den beiden Genpolymorphismen wäre auf endokriner Ebene denkbar. Eine mögliche Hypothese ist, dass der PPAR $\gamma$ 2 Polymorphismus, der ja fast ausschließlich im Fettgewebe exprimiert ist (59), die Freisetzung von Sekretionsprodukten des Fettgewebes wie freie Fettsäuren oder Fettgewebshormonen wie Adiponektin beeinflusst. Diese Faktoren beeinflussen direkt die Insulinsensitivität im Muskelgewebe oder in der Leber. Hier könnte der IRS-1 Gly972Arg Polymorphismus mit diesen Faktoren interagieren. Diese Hypothese müsste jedoch noch in In-Vitro Studien untersucht werden.

#### 4.5 Limitation

Dieser Typ von Assoziationsstudien, die Gen-Gen Interaktionen aufzeigen sollen, erreicht sehr schnell die Limitation statistischer Aussagekraft. Die Anzahl der Träger der beiden seltenen Allele sind um zwei Größenordnungen geringer als die Gesamtanzahl der Probanden. Es waren letztendlich nur 12 Probanden in der Kombination der X/Arg im IRS-1 Gen und X/Ala im PPAR $\gamma$ 2 Gen (Gruppe D), die mittels OGTT untersucht wurden und lediglich 7 Probanden dieser Gruppe, die zusätzlich eine hyperinsulinämische euglykämische Clamp Untersuchung erhielten. Es könnte durchaus sein, dass die Studienprobanden einer unbekanntem Selektion unterlagen, und dass bei einer größeren Anzahl von Probanden in der Kombinationsgruppe der Polymorphismen der geschilderte Effekt sich nicht mehr zeigen würden. Zudem ist es möglich, dass bei der durchgeführten Gruppierung, dadurch dass zwei Genotypen subselektiert wurden, die Wahrscheinlichkeit eines Falsch-positiven Ergebnisses sich erhöht hat. Jedoch bleibt die Tatsache, dass bei einem primär hypothesengetriggerten Vergleich, der hier angeführt wurde, sich deutlich signifikante Unterschiede in der Insulinsensitivität in 2 unabhängig durchgeführten Tests (hyperinsulinämische euglykämischer Clamp und OGTT) zwischen den X/Arg Trägern

(IRS-1 Gen) und X/Ala Trägern (PPAR $\gamma$ 2 Gen) (Gruppe D) und den Wildtypträgern (Gruppe A) zeigen.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Letztendlich zeigte die Anwesenheit eines X/Arg (IRS-1 972) Polymorphismus im Vergleich zwischen X/Ala und Pro/Pro im PPAR $\gamma$ 2 Polymorphismus bezüglich der Insulinsensitivität eine deutliche Differenz, welche sich nicht in der Gesamtheit der Probanden oder im Vergleich zum Gly/Gly (IRS-1 972) Genotyp zeigte. Dies lässt annehmen, dass das Ala-Allel im PPAR $\gamma$ 2 in Anwesenheit einer die Insulinsensitivität betreffend möglicherweise eher ungünstigen genetischen Disposition, einen gewissen Vorteil hat. Dies zeigt, dass eine sorgfältige genotypische Charakterisierung, eine weitere Spezifizierung und Gegenüberstellung der Genotypen sich auch künftig im Hinblick auf Erforschung neuer, bisher unbedachter Interaktionen als nützlich erweisen könnte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Berücksichtigung von Gen-Gen Interaktionseffekten neue Informationen über metabolische Ereignisse erahnen lassen, die ansonsten unentdeckt geblieben wären. Während Gen-Umwelt Interaktionen unzweifelhaft von Bedeutung sind, bekräftigen die Ergebnisse dieser Studie die These, dass Gen-Gen Interaktionen in der Ätiologie der Insulinresistenz und des Typ-2-Diabetes eine wichtige Rolle spielen können.

## 5 Zusammenfassung

Bezüglich des Pro12Ala Polymorphismus im Peroxisome-Proliferator Activated Rezeptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) Gen wurde bereits in einigen, aber nicht allen Studien eine Assoziation mit erhöhter Insulinsensitivität und damit reduziertem Diabetesrisiko dargestellt. Es ist jedoch möglich, dass diese genetische Variation in Interaktion mit einem bestimmten anderen genetischen Hintergrund einen speziellen Effekt auf die Insulinsensitivität zeigt. Diese Studie wurde durchgeführt um die Hypothese zu prüfen, dass die Anwesenheit des Gly972Arg Polymorphismus im Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) bei Trägern des Ala-Allels im PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala Polymorphismus die Insulinsensitivität in besonderer Weise beeinflusst. Es erfolgte die Bestimmung der Insulinsensitivität an gesunden Probanden und Darstellung dieser in vier Kombinationen von Genotypen, welche durch die An- bzw. Abwesenheit der Polymorphismen im PPAR $\gamma$ 2 und IRS-1 definiert wurden. Die Insulinsensitivität wurde einmal mittels Berechnung aus den Ergebnissen eines oralen Glukosetoleranztests bestimmt und zusätzlich bei einem Teil dieser Probanden anhand einer hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose-Clamp Untersuchung gemessen.

Beide Methoden der Insulinsensitivitätsmessung zeigten, dass zwischen Pro/Pro und X/Ala Trägern im Pro12Ala Polymorphismus des PPAR $\gamma$ 2-Gens kein signifikanter Unterschied in der Insulinsensitivität besteht. In der Gruppe der Ala-Allel Träger im PPAR $\gamma$ 2-Gen Polymorphismus bestand bei gleichzeitigem Vorliegen des Arg-Allels im Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1 Gen eine erhöhte Insulinsensitivität im Vergleich zu den anderen Gruppen. Das Ala-Allel im PPAR $\gamma$ 2 Genpolymorphismus scheint also nur im Zusammenhang mit einem zusätzlichem, eher unvorteilhaftem genetischen Polymorphismus (nämlich dem Arg-Allel im IRS-1), eine günstige Wirkung auf die Insulinsensitivität zu haben. Dies verdeutlicht, dass Gen-Gen Interaktionen in der Ätiologie der

Insulinresistenz und des Typ-2-Diabetes eine wichtige Rolle spielen können.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<b>ADA</b>	<b>American Diabetes Association</b>
<b>Ala</b>	<b>Alanin</b>
<b>Arg</b>	<b>Arginin</b>
<b>BMI</b>	<b>Body Mass Index</b>
<b>BZ</b>	<b>Blutzucker</b>
<b>Gly</b>	<b>Glycin</b>
<b>Gluc</b>	<b>Glukosekonzentration</b>
<b>Ins</b>	<b>Insulinkonzentration</b>
<b>IRS</b>	<b>Insulin Rezeptor Substrat</b>
<b>ISI</b>	<b>Insulinsensitivitätsindex</b>
<b>Mean</b>	<b>Durchschnittswert</b>
<b>Min</b>	<b>Minute</b>
<b>mRNA</b>	<b>mitochondriale Ribonukleinsäure</b>
<b>mU</b>	<b>mikro Unit</b>
<b>n</b>	<b>Anzahl</b>
<b>OGTT</b>	<b>oraler Glukosetoleranztest</b>
<b>PPAR</b>	<b>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</b>
<b>Pro</b>	<b>Prolin</b>
<b>RXR</b>	<b>Retinoid X Rezeptor</b>
<b>SD</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>TÜFF</b>	<b>Tübinger Familien Früherkennungsprojekt</b>
<b>WHO</b>	<b>Weltgesundheitsorganisation</b>

## 7 Literaturverzeichnis

1. White S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* 2004; Vol 27 Nr.4; 1047-1053
2. Wild S, Roglic G, Gree A, Sicree R, King H. Global Prevalenc of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27; 1047-1053.
3. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414; 782-787
4. Michaelis D, Jutzi E. Epidemiologie des Diabetes mellitus in der Bevölkerung der ehemaligen DDR: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz- und Prävalenzrends im Zeitraum 1960 – 1987; *Z. Klin Med* 1991; 46; 59–64
5. Hauner H, v. Ferber L, Köster I; Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten. Sekundärdatenanalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund. *Dtsch med Wschr* 1992; 117; 645–650
6. Palitzsch K-D, Nusser J, Arndt H, et al. Die Prävalenz des Diabetes mellitus wird in Deutschland deutlich unterschätzt – eine bundesweite epidemiologische Studie auf der Basis einer HbA1c-Analyse. *Diab Stoffw* 1999; 8; 189–200
7. Thefeld W. Prävalenz des Diabetes mellitus in der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands. *Gesundheitswesen* 2000; 61, Sonderheft 2; 85–89
8. Hauner H; Occurrence of diabetes mellitus in Germany. *Dtsch med Wschr* 1998; 123; 777–782
9. Janka HU, Redaelli M, Gandjour A, et al. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. *Deutsche Diabetes-Gesellschaft* 2000; 1; 13–30
10. Garcia MJ, McNamara GW, Hutchins GM. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: Sixteen year follow up study. *Diabetes* 1974; 23; 105-111.

11. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16; 434-444.
12. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *JAMA* 1990; 263; 2893-2898
13. Wabitsch M, Hauner H, Hertrampf M, Mach R, Hay B, Mayer H, Debatin K-M, Heinze E. Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose regulation in German children and adolescents with obesity. *J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28; 303-313
14. Kannel WB, McGee GL. Diabetes and cardiovascular risk factors. The Framingham Study. *Circulation* 1979; Jan 59(1); 8-13
15. Weyer C, Bogardus C, Mott D M, Pratley R E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* Sept. 1999; Vol. 104; Nr. 6; 787-794
16. Löwel H, Meisinger C, Schneider A, Trentinaglia I, Heier M, Hörmann A, Kuch B, Thorand B. Diabetiker als Hochrisiko für Herzinfarkt. Ergebnisse der MONICA-Augsburg Studien. *CARDIOVASC* 2001; 1(1): 14-25
17. Rett K, Wicklmayr M, Mehnert H, Jacob S, Dietze G. Diagnostischer Leitfaden zur Früherkennung des Metabolischen Syndroms. *Das Metabolische Syndrom*; 1995; 157-161.
18. Bogardus C. Metabolic abnormalities in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes mellitus* 1996; 459-467
19. Hollenbeck C, Reaven GM. Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*; 64; 1997; 1169-1173.

20. Martin BC, Warram JH, Rosner B, Rich SS, Soeldner JS, Krolewski AS. Familial clustering of insulin sensitivity. *Diabetes* 41; 2002; 850-854.
21. Häring HU. Pathogenesis of type II diabetes: are there common causes for insulin resistance and secretion failure? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107. 17-23.
22. Balletshofer B, Rittig K, Enderle M, Volk A, Maerker E, Jacob S et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive firstdegree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulinresistance. *Circulation* 101 2002; 1780-4.
23. Häring HU. Pathophysiologie der Insulinresistenz. *Herz* 20 1995; 5-15.
24. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R, Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979 237; E214-223
25. McGuire E, Helderman J, Tobin J, Andres R, Berman M Effect of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl. Physiol.* 41 1976; 565-573
26. Gregg EW, Cadwell BL, Cheng YJ, Cowie CC, Williams DE, Geiss L, Engelau MM, Vinicor F. Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S. *Diabetes Care* 27 2004; 2806-2812
27. Boden G. Role of the fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46; 3-10
28. Hube F, Hauner H. The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Metab Res* 1999; 31; 626-631.
29. Steppan CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409; 307-312.
30. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE: Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001; 9; 414-417
31. Weyer C, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulinresistance and

- hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86; 1930-1935.
32. Ahima RS, Flier JS: Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62; 413-437
33. Lenhard, J. M., PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels* 7 2001; 249-258.
34. Spiegelmann BM: PPAR-gamma adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 46 1998; 507-514
35. Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA : Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 2001; 142; 1269-1277
36. Jorge Plutzky, MD, and Robert E. Ratner, MD: The Present and Future of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors <http://www.medscape.com>; November 22, 2005;
37. Spiegelmann BM: PPAR-gamma adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 46; 507-514
38. Yen C-J, Beamer B, Negri C, Silver K, Brown K, Yarnall D, Burns D, Roth J, Shuldiner A : Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gene in diabetic Caucasians: Identification of a Pro 12 Ala PPAR $\gamma$ 2 missense mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 241; 270-274
39. Frederiksen L, Brodback K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer S : Studies of the Pro12Ala Polymorphism of the PPAR- $\gamma$  gene in the Danish MONICA cohort: Homozygosity of the Ala Allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87 (8): 3989-3992
40. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl M-C, et al. The common PPAR gamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000; 26; 76-80

41. Mori Y, Kim Motoyama H, Katakura T, Yasuda K, Kadowaki H, et al. Effect of the Pro12Ala variant of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251; 195–198
42. Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, et al. The PPARgamma2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 1999; 42; 758–762
43. Van Obberghen E., Kasuga M., LeCam A., Itin A., Hedo J.-A., Harrison L. C. Biosynthetic labeling of insulin receptor: studies of subunits in cultured human IM-9 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981; 78:1052-1056
44. Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D. L., Kahn C. R. Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1983; 80(8); 2137-2141
45. White M. F., Maron R., Kahn C. R. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells *Nature* 1985; 318; 183-186
46. Sun X. J., Wang L.-M., Zhang Y., Yenush L., Myers Jr. M. G., Glasheen E., Lane W. S., Pierce J. H., White M. F. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995; 377; 173-177
47. Lavan B. E., Lane W. S., Lienhard G. E. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 11439-11443
48. Lavan B. E., Fantin V. R., Chang E. T., Lane W. S., Keller S. R., Lienhard G. E. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* 1997; 272; 21403-21407

49. Holgado-Madruga M., Emlet D. R., Moscatello D. K., Godwin A. K., Wong A. J. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling *Nature* 1996; 379; 560-563
50. Almind, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S. M., Pedersen, O. Amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342; 828-832
51. Krook A., O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* Jan 1996;10(1); 97-122
52. Sesti G, Massimo F, Hribal LH, Lauro D, Sbraccia P Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 2001; 15; 2099-2111
53. Imai, Y., Fusco, A., Suzuki, Y., Lesniak, M., D'Alfonso, R., Sesti, G., Bertoli, A., Lauro, R., Accili, D., Taylor, S. I. Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79; 1655-1658
54. Hitman, G. A., Hawrami, K., McCarthy, M. I., Viswanathan, M., Snehalatha, C., Ramachandran, A., Tuomilehto, J., Tuomilehto-Wolf, E., Nissinen, A., Pedersen, O. Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. *Diabetologia* 1995; 38; 481-486
55. Clausen J. O., Hansen T., Bjørbaek C.; Echwald S. M., Urhammer S. A., Rasmussen S., Andersen C. B., Hansen L., Almind K., Haralddóttir J., Borch-Johnsen K., Pedersen O. Insulin resistance: Interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1 *Lancet* 1995; 346, 397-402
56. Baroni M. G., Arca M., Sentinelli F., Buzzetti R., Capici F., Lovari S., Vitale M., Di Mario U. The G972R variant of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene, body fat distribution and insulin resistance *Diabetologia* 2001; 44; 367-372

57. Matsuda A, DeFronzo R Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 1999; 22; 1462–1470
58. Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, et al. Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 1995; 346; 397–402
59. Auwerx J. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999 Sep; 42 (9); 1033-49
60. Parikh H, Groop L. Candidate genes for type 2 diabetes. *Rev. Endocr Metab Disord* 5; 2004; 151-176
61. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Metaanalysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33; 2003; 177-182
62. Pierce M, Keen H, Bradley C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* 12; 1995; 6–13
63. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35; 1992; 1060–1067
64. Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30; 1987; 763–768
65. Henkin L, Bergman RN, Bowden DW et al. Genetic epidemiology of insulin resistance and visceral adiposity. The IRAS Family Study design and methods. *Ann Epidemiol* 13; 2003; 211–217
66. Mills GW, Avery PJ, McCarthy MI et al. Heritability estimates for beta cell function and features of the insulin resistance syndrome in UK families with an increased susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetologia* 47; 2004; 732–738

67. Watanabe RM, Valle T, Hauser ER et al. Familiarity of quantitative metabolic traits in Finnish families with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Finland-United States Investigation of NIDDM Genetics (FUSION) Study investigators. *Hum Hered* 49;1999; 159–168
68. Bergman RN, Zaccaro DJ, Watanabe RM et al. Minimal model-based insulin sensitivity has greater heritability and a different genetic basis than homeostasis model assessment or fasting insulin. *Diabetes* 52; 2003; 2168–2174
69. Elbein SC, Hasstedt SJ, Wegner K, Kahn SE Heritability of pancreatic beta-cell function among nondiabetic members of Caucasian familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 84; 1999; 1398–1403
70. Hong Y, Weisnagel SJ, Rice T et al. Familial resemblance for glucose and insulin metabolism indices derived from an intravenous glucose tolerance test in Blacks and Whites of the HERITAGE Family Study. *Clin Genet* 60; 2001; 22–30
71. Sakul H, Pratley R, Cardon L, Ravussin E, Mott D, Bogardus C Familiarity of physical and metabolic characteristics that predict the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians. *Am J Hum Genet* 60; 1997; 651–656
72. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE et al. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998; 47: 1806-1808.
73. Cole SA, Mitchell BD, Hsueh WC et al. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000; 24 (4): 522-524.
74. Masud S, Ye S. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J. Med. Genet.* 2003; 40: 773-780.
75. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M et al. A Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower

- body mass index, and improved insulin sensitivity. *Nat. Gen.* 1998; 20: 284-287.
76. Ek J, Andersen G, Urhammer SA et al. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-G2 (PPAR-G2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diabetologia* 2001; 44: 1170-1176.
77. Li S, Chen W, Srinivasan SR et al. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-G2 Gene Polymorphism (Pro12Ala) Beneficially Influences Insulin Resistance and Its Tracking From Childhood to Adulthood. The Bogalusa Heart Study. *Diabetes* 2003; 52: 1265-1269.
78. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C et al. The Pro12Ala PPARG2 gene missense mutation is associated with obesity and insulin resistance in Swedish middle-aged men. *Diabetes Metab. Res.* 2003; 19: 159-163.
79. Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D: Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 84; 2004; 623– 647
80. Almind K Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993; 342; 828–832
81. Jellema A, Zeegers MPA, Feskens EJM, Dagnelie PC, Mensink RP Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Typ 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia* 2003; 46; 990-995
82. Marini MA, Frontoni S, Mineo D, Bracaglia D, Cardellini M, De Nicolais P, Baroni A, D'Alfonso r, Perna M, Lauro D, Federici M, Gambardella S, Lauro R, Sesti G. The Arg972 Variant in Insulin Receptor Substrate-1 Is Associated with an Atherogenic Profile in Offspring of Type 2 Diabetic Patients. *The Journal of Clinical End and Met* 88; 2003; 7; 3368-3371
83. Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accile D, Lauro R, Sesti G. The Gly3Arg972 Amino Acid Polymorphism in Insulin Receptor Substrate-1 Affects Glucose Metabolism in Skeletal Muscle Cells; *The Journal of Clinical End and Met* 85; 2000; 5; 2004-2013

- 
84. Florez, JC, Sjögren M, Burt N, Orho-Melander M, Schayer S, Sun M, Almgren P, Lindblad U, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly MJ, Ardlie KG, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L. Association testing in 9,000 people fails to confirm the association of the insulin receptor substrate-1 G972R polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes* 53; 2004; 3313-3318
  85. 't Hart LM, Nijpels G, Dekker JM, Maassen JA, Heine RJ, van Haeften TW. Variations in insulin secretion in carriers of gene variants in IRS-1 and -2. *Diabetes* 51; 2002; 884–887
  86. Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 51; 2002; 2341–2347
  87. Porzio O, Federici M, Hribal ML et al. The Gly972→Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 104; 1999; 357–364

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Fritsche danke ich für die Überlassung des Themas und die intensive und geduldige Betreuung bei der Entstehung dieser Arbeit

Dr. Norbert Stefan danke ich für seine Unterstützung und Gedankenanstöße besonders in der Anfangsphase der Arbeit.

Ich danke auch Prof. Dr. Michael Stummvoll, der in seiner Zeit in Tübingen mich mit meinen Fragen immer freundlich empfangen hat und mich in die Thematik eingeführt hat

Für die Unterstützung und auch Bereicherung der Zeit in der ich am TÜFF-Projekt mitgearbeitet habe, danke ich Dr. Otto Tschritter, Dr. Alexander Madaus, Frau Maerker und Frau Teigeler

Ich danke Dr. Yasar Demirdag für seine Unterstützung vor allem in der Endphase.

Mein ganz besonderer Dank geht jedoch an meine Frau Sandra die mich immer und überall unterstützt hat und ohne die ich niemals die Kraft für diese Arbeit gehabt hätte.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Mesut Özeker  
geboren am 20.10.1975 in Böblingen  
Eltern: Necmiye Özeker, geb. Arslan  
Recep Özeker  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### Schulbildung:

1982 – 1986 Wilhelm-Hauff-Grundschule Böblingen  
1986 – 1987 Albert-Schweizer-Realschule Böblingen  
1987 – 1995 Max-Planck-Gymnasium Böblingen  
Abschluss mit Allg. Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

1995 – 2003 Studium der Humanmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen  
31.03.1999 Ärztliche Vorprüfung  
23.03.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
25.03.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
20.05.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufsausbildung:

01.06.03 – 01.10.04 Arzt im Praktikum im Kreiskrankenhaus  
Böblingen  
seit 01.10.04 Assistenzarzt im Klinikum  
Sindelfingen-Böblingen