

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkte: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und Klinische Chemie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Polymorphismen im Upstream Transcription
Factor-1 (USF-1) Gen:
Assoziation mit antilipolytischer Insulinsensitivität
und Leberfett**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Lena Mareike Wölfle

aus

Ulm

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. N. Stefan

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Jacob

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	5
1.1 Pathogenese des Typ 2 Diabetes	5
1.2 Einfluss der Lipolyse auf die Insulinsensitivität	6
1.2.1 Lipolyse im Fettgewebe	6
1.2.2 Regulation der Lipolyse	7
1.2.3 Lipolyse bei metabolischen Veränderungen	8
1.2.4 Insulinresistenz durch vermehrte Lipolyse	8
1.3 Einfluss des Leberfetts auf die Insulinsensitivität	9
1.3.1 Bedeutung der Leber im Glukose- und Lipidmetabolismus.....	9
1.3.2 Folgen der Insulinresistenz für die Leber	10
1.3.3 Leberfettgehalt und Insulinresistenz	10
1.4 Genetische Determinanten der Lipolyse und des Leberfetts	12
1.4.1 Genetische Determinanten der Lipolyse	12
1.4.2 Genetische Determinanten des Leberfetts.....	14
1.5 USF – Transkriptionsfaktoren.....	14
1.5.1 Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren	14
1.5.2 USF-1 und USF-2	16
1.5.3 USF-1 und USF-2 – Rolle im Lipid- und Glukosemetabolismus..	16
1.6 Fragestellung	19
2. Probanden, Studienaufbau, Materialien und Methoden.....	21
2.1 Probanden	21
2.1.1 Probandenkollektiv.....	21
2.1.2 Teilnahmevoraussetzungen	21
2.1.3 Ausschlusskriterien	22
2.2 Studienaufbau	22
2.3 Methoden und Material	23
2.3.1 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)	23

Inhaltsverzeichnis

2.3.2	Dreistufen- und Standard-euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp.....	24
2.3.3	Bestimmung des Körperfettgehaltes	26
2.3.4	Bestimmung von BMI und Körperfettverteilung.....	27
2.3.5	¹ H-Magnetresonanzspektroskopie (¹ H-MRS) zur Bestimmung hepatischer Lipide	28
2.4	Analytik	29
2.4.1	Bestimmung der Plasmaglukose.....	29
2.4.2	Bestimmung des Plasmainsulins	29
2.4.3	Bestimmung des Serumspiegels der freien Fettsäuren	29
2.4.4	Bestimmung des Serumspiegels der Lipoproteine.....	29
2.4.5	Genotypisierung.....	30
2.4.6	Körperfett	30
2.5	Berechnungen.....	31
2.5.1	Insulinsensitivitätsindex ISI	31
2.5.2	Matsuda Index	31
2.5.3	Änderung der Freien Fettsäuren - Δ FFS.....	32
2.5.4	EC ₅₀	32
2.5.5	Statistische Auswertung.....	32
3.	Ergebnisse.....	34
3.1	Assoziation des USF1 SNP mit den anthropometrischen Daten sowie Kohlenhydratstoffwechseldaten in der Gesamtpopulation	34
3.1.1	Probanden	34
3.1.2	Kohlenhydratstoffwechsel	34
3.1.2.1	Nüchternglukose.....	34
3.1.2.2	Nüchterninsulin	34
3.1.2.3	Freie Fettsäuren im Nüchternzustand	35
3.1.3	Lipoproteine, Triglyceride und Cholesterin.....	35
3.1.4	Parameter der Insulinsensitivität.....	35

3.1.5	Körperfett und Fettverteilung	35
3.1.5.1	BMI	35
3.1.5.2	Taillenumfang	36
3.1.5.3	Körperfettgehalt	36
3.1.6	Übersicht.....	36
3.1.7	Genetischer Effekt des usf1s2 SNP auf Plasmaglukose und – insulin	38
3.2	Genetischer Effekt des usf1s2 SNP auf die Lipolyse in der Gesamtpopulation.....	38
3.2.1	Freie Fettsäuren.....	38
3.3	Genetischer Effekt des usf1s1 Polymorphismus auf die Lipolyse im Antilipolyse-Clamp	39
3.3.1	Alter und Geschlecht.....	39
3.3.2	BMI und Körperfett.....	39
3.3.3	EC ₅₀	40
3.4	Effekt des SNP -60C>G der Hormon Sensitiven Lipase (HSL) auf die antilipolytische Insulinsensitivität und Interaktionen dieses Polymorphismus mit dem usf1s2 SNP.....	42
3.5	Effekt des usf1s2 SNP und des -514 C>T LIPC SNP auf den Leberfettgehalt und die Insulinsensitivität	42
3.5.1	Parameter der Insulinsensitivität.....	42
3.5.2	Körperfett und Fettverteilung	43
3.5.2.1	BMI	43
3.5.2.2	Körperfettgehalt	43
3.5.2.3	FFS im Nüchternzustand	43
3.5.2.4	¹ H-Magnetresonanzspektroskopie (¹ H-MRS) zur Bestimmung des Leberfettgehalts	45
3.5.2.4.1	Leberfett und Insulinsensitivität	45
3.5.2.4.2	Polymorphismen und Leberfett.....	46
3.5.2.5	Interaktion usf1s2 und LIPC SNP	46

Inhaltsverzeichnis

3.5.2.5.1	Leberfett	46
3.5.2.5.2	Insulinsensitivität	48
4.	Diskussion	49
4.1	USF-1 – Kandidatengen für Insulinresistenz und Diabetes Typ 2, Dyslipidämie und Atherosklerose	49
4.2	USF-1 Polymorphismen usf1s1, usf1s2 und antilipolytische Insulinsensitivität.....	50
4.3	USF-1 Polymorphismen usf1s1, usf1s2, Lipidprofil und basale Lipolyse	51
4.4	USF-1 Polymorphismen usf1s1 und usf1s2 und Leberfett... 	54
4.5	Schlussfolgerung.....	55
5.	Zusammenfassung.....	56
6.	Anhang.....	58
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	58
6.2	Tabellenverzeichnis	59
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	60
7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Danksagung.....	69
9.	Lebenslauf	70

1. Einleitung

1.1 Pathogenese des Typ 2 Diabetes

Die chronische Glukose-Stoffwechselstörung des Diabetes mellitus Typ 2 ist mit einer heute weltweiten Prävalenz von 125 Millionen Erkrankten, die Prognosen zufolge in den nächsten 10 Jahren noch einmal um 50% anwachsen wird, von enormer Bedeutung für unsere Gesellschaft. Entscheidend hierbei: neben einer gesicherten genetischen Disposition [96] bei polygenetischem Erbgang sind es vor allen Dingen sekundär erworbene und damit beeinflussbare Umweltfaktoren, die bei der Entwicklung dieser multifaktoriellen Erkrankung die entscheidende Rolle spielen. Adipositas, Bewegungsmangel, fettreiche Ernährung, Rauchen und niedriges Geburtsgewicht seien als wichtigste pathogenetische Umwelteinflüsse genannt. Die große Bedeutung der Adipozyten als Ort endokriner Stoffwechselaktivität mit Einfluss auf die Diabetesentstehung steht außer Frage. In 80% der Krankheitsfälle ist der Diabetes mellitus Typ 2 mit Adipositas, in 60-70% mit Dyslipidämie und mit etwas gleicher Häufigkeit mit arterieller Hypertonie assoziiert [52].

Die eher schleichend verlaufende klinische Manifestation der Erkrankung resultiert aus der Trias von hepatischer Insulinresistenz, peripherer Insulinresistenz und gestörter Insulinsekretion der auch quantitativ reduzierten pankreatischen β -Zellen [21]. Der manifeste Diabetes mellitus Typ 2 mit Nüchtern-Hyperglykämie (BZ > 126 mg/dl) ist somit gemeinsamer Endpunkt der Dysbalance einer nicht mehr ausreichenden Suppression der hepatischen Glukoneogenese durch Insulin, einer inadäquat niedrigen Antwort der peripheren Zielgewebe Fett und Skelettmuskulatur auf Insulin und einer Dysfunktion der β -Zellen des Pankreas [21], das heißt einer inadäquat niedrigen Insulinsekretion auf einen Glukosereiz hin.

Die zeitliche Abfolge der gestörten Stoffwechselfvorgänge bis hin zur Manifestation des Typ 2 Diabetes wird auf der Grundlage von Studien mit Personengruppen, die eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit aufweisen [22, 39, 96, 97], wie folgt angenommen: Schon Jahrzehnte vor dem klinischen Auftreten der Glukosestoffwechselstörung besteht häufig eine Insulinresistenz, also eine verminderte Empfindlichkeit des Körpergewebes gegenüber der Insulinwirkung. Diese wird initial jedoch durch pankreatische Hypersekretion von Insulin kompensiert. Nächster Schritt bei Prä-Diabetikern ist eine zunehmende Insulinresistenz mit der Konsequenz postprandialer Hyperglykämien bei zunächst noch erhöhten Insulinspiegeln. Normale Nüchtern-Blutzuckerwerte können nur so lange gewährleistet werden, bis die Fähigkeit der β -Zellen zur Hypersekretion verloren geht; sobald dies geschieht wird der Diabetes mellitus Typ 2 manifest [61].

Sowohl primäre genetische als auch die im vorangehenden Textabschnitt erläuterten sekundären Resistenzmechanismen sind für die Insulinresistenz verantwortlich. Auch wenn bisher noch keine praxisrelevanten genetischen Marker für die erbliche Belastung gefunden wurden, konnte in Familienstudien eine genetische Komponente des Diabetes mellitus Typ 2 aufgezeigt werden [13, 57]. Die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge liegt bei nahezu 100 % [21]. Von besonderer Bedeutung ist weiterhin, dass Typ 2 Diabetes und die Insulinresistenz stark mit den Komponenten des metabolischen Syndroms und mit Atherosklerose assoziiert sind [42, 44].

1.2 Einfluss der Lipolyse auf die Insulinsensitivität

1.2.1 Lipolyse im Fettgewebe

Der Abbau von Triglyceriden und die anschließende Freisetzung von Glycerin und unveresterten Fettsäuren (FS) aus dem Fettgewebe ist von großer Bedeutung für die Regulation der Homöostase des menschlichen Energiehaushalts [25]. Fettsäuren fungieren als Energiesubstrate und

erfüllen andere wichtige Aufgaben [4, 24, 92]. So werden sie albumingebunden zu anderen Organen transportiert, beeinflussen dort die Insulinwirkung und den Glukosestoffwechsel von Leber und Muskel, verändern als Transkriptionsfaktoren Genfunktionen in verschiedensten Geweben, werden zur Apolipoproteinsynthese der Leber verwendet und regulieren die Insulinproduktion des Pankreas.

Der stufenweise Triglyceridabbau über Diglyceride und Monoglyceride zu Glycerin und FS wird von mindestens 3 fettgewebsspezifischen Enzymen katalysiert. Davon stellt die Hormonsensitive Lipase (HSL), welche die Hydrolyse von Triglyceriden zu Diglyceriden und weiter zu Monoglyceriden katalysiert und als einziges Enzym in diesem Prozess hormonreguliert ist, das wichtigste, Rate-Limitierende Enzym dar [32].

1.2.2 Regulation der Lipolyse

Die Lipolyse unterliegt strengen Regulationsmechanismen, was sich unter anderem an den starken tageszeitlichen Schwankungen der Spiegel an freien Fettsäuren (FFS) und Glycerin im Blut erkennen lässt [16, 25, 41, 43, 45, 95]. Bedeutsame unmittelbare Effekte auf die Lipolyse haben im menschlichen Organismus vor allem Katecholamine, Insulin und natriuretische Peptide. Durch von den Adipozyten oder dem Fettgewebstroma selbst produzierte Substanzen wie Prostaglandine, Adenosin und Zytokine (Adipokine), insbesondere TNF- α und Adiponektin, kommt es zudem zu autokriner Lipolyseregulation. Des Weiteren beeinflussen wichtige Faktoren wie Alter, Geschlecht, körperliche Aktivität, Ernährung, Fettgewebslokalisation und -verteilung sowie genetische Unterschiede die Regulation der Lipolyse.

1.2.3 Lipolyse bei metabolischen Veränderungen

Bei Insulinresistenz ist das Ausmaß des Ansprechens körpereigener Gewebe auf die Insulinwirkung herabgesetzt. Dies hat eine verminderte Glukoseaufnahme insulinabhängiger Gewebe sowie eine nicht mehr ausreichende Hemmung der Enzyme der Glukoneogenese und Glykogenolyse mit der Konsequenz von Hyperglykämien zur Folge. Außerdem kommt es zur Verminderung des antilipolytischen Insulineffektes und damit zu erhöhten Plasmaspiegeln an FFS [30, 48].

Adipositas kann beim Menschen zu einer, relativ zum Bedarf gesehen exzessiven Lipolyse mit vermehrter Freisetzung von FFS führen. Als zugrundeliegende Mechanismen gelten hierbei eine verminderte Insulinwirkung auf die Antilipolyse und eine vermehrte katecholaminduzierte Lipolyse durch Überaktivität des sympathischen Nervensystems [12]. Die vermehrte Freisetzung von Fettsäuren (FS) wirkt sich wiederum negativ auf sowohl die Insulinsensitivität und –sekretion aus.

1.2.4 Insulinresistenz durch vermehrte Lipolyse

FFS induzieren Insulinresistenz in der Leber [66] und im Skelettmuskel [37] derart, dass sie durch Hemmung der Insulinwirkung in diesen Geweben zu reduzierter muskulärer Glukoseaufnahme und gesteigerter hepatischer Glukoneogenese führen. Dies scheint durch eine FFS-vermittelte gesteigerte Acetyl-CoA Produktion sowie Hemmung der Glukoseoxidation [12] bedingt. Neuere Daten zeigen, dass FFS auch über Rezeptoren wie den toll-like Rezeptor 4 (TLR4) auf die Myozyten und Hepatozyten wirken und somit Insulinresistenz hervorrufen [38].

Es besteht eine körperregionenbezogene Heterogenität des Fettgewebes im Hinblick auf Lipolyseaktivität und resultierende Verfügbarkeit von FFS [82]. Man unterscheidet viszerales von subkutanem Fett und differenziert des Weiteren am Stamm gelegenes Fettgewebe und Fett an Extremitäten. Besonders das viszerale Fett steht im Verdacht, zur Entwicklung von Insulinresistenz zu führen [11, 47]. Allerdings weiß man heute, dass die subkutan im Körperstamm lokalisierten Fettdepots den größten Anteil an FFS (75%) zum systemischen Kreislauf sowohl im Nüchtern- als auch im postprandialen Zustand liefern [6, 7, 28, 55, 56, 67, 70]. Im Ruhezustand läuft Lipolyse vermehrt im subkutan gelegenen Fett ab, unter Stimulation (Nahrung/ neural) hingegen vor allem im viszeralen Fett [90]. Sicher ist, dass eine inadäquate Suppression der Lipolyse in allen Fettgewebsuntergruppen mit konsekutiver exzessiver Verfügbarkeit von FFS, zur Pathogenese von verminderter Glukoseaufnahme und verminderter Antilipolyse, im Sinne einer Insulinresistenz, führt. Ein Circulus vitiosus nimmt seinen Lauf.

1.3 Einfluss des Leberfetts auf die Insulinsensitivität

1.3.1 Bedeutung der Leber im Glukose- und Lipidmetabolismus

Die Leber stellt ein bedeutsames Organ im Glukose- und Lipidstoffwechsel dar. In der Leber, dem bedeutenden Wirk- und Abbauort von Insulin, finden Glukoneogenese und Glykogenolyse, Glykolyse, Glykogensynthese ebenso wie Triglyceridsynthese statt.

1.3.2 Folgen der Insulinresistenz für die Leber

Als eines der wichtigsten Zielgewebe der Insulinwirkung kann die Leber in hohem Maße von einer Insulinresistenz und deren Folgen betroffen sein.

Es kommt zur verminderten Unterdrückung der intrahepatischen Glukoneogenese und Glykogenolyse und zum vermehrten Anfluten von FFS aus dem viszeralen Fettgewebe über die Pfortader. Zu den Konsequenzen gehören eine gesteigerte endogene Herstellung von Glukose sowie eine vermehrte Triglycerideinlagerung in die Hepatozyten. Letztere wiederum bewirkt durch eine Verminderung der glukoneogenesehemmenden Insulinwirkung noch eine weitere Steigerung der vermehrten Glukoseproduktion.

1.3.3 Leberfettgehalt und Insulinresistenz

Untersuchungen am Menschen haben gezeigt, dass die Zunahme intrazellulärer Triglycerid-Depots in den nicht für Lipidspeicherung vorgesehenen Geweben Muskel, Leber und Pankreas mit einem durch die Beeinflussung der Insulinsignaltransduktion und –sekretion gestörten Glukosestoffwechsel in Zusammenhang steht. Ebenso ist die beschriebene Triglyceriddepotzunahme mit den Folgen dieses gestörten Glukosemetabolismus in Form von Insulinresistenz und gestörter β -Zellfunktion assoziiert [23]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch andere zum Metabolischen Syndrom gehörige Lipidstoffwechselabnormitäten wie Adipositas und erhöhte FFS-Spiegel mit Insulinresistenz einhergehen [31].

Die Ergebnisse einer Studie von 2004 legen nahe, dass das Leberfett beim Gesunden einen wichtigen auf die systemische Insulinsensitivität Einfluss nehmenden Faktor darstellt. Das Leberfett korrelierte unabhängig vom

Körperfettgehalt mit der Insulinsensitivität [83]. Weiterhin wurde kürzlich Fetuin-A, und damit ein Protein identifiziert, welches bei Verfettung der Leber vermehrt produziert wird und die Insulinwirkung in Leber und Muskel hemmt [75].

Bei Übergewicht findet sich eine Erhöhung des intrahepatischen Fettgehalts. Diese Assoziation ist bei androider Fettverteilung mit stammbetont vermehrter viszeraler Fettmasse verstärkt ausgeprägt [1]. Die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie ermöglicht eine exakte Quantifizierung der Fettverteilung und des Leberfetts ist [49, 76, 80, 84].

Besonders das Krankheitsbild der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) geht mit vermehrtem Leberfettgehalt durch Triglyceridakkumulation einher [1]. Die NAFLD wird als Leberkomponente des Metabolischen Syndroms betrachtet [23] und kommt derzeit bei einem Drittel der Normalbevölkerung und der Mehrzahl der Patienten mit Übergewicht und Diabetes vor [1]. Pathologisches Korrelat der NAFLD ist eine der alkoholischen Leberfetterkrankung ähnliche Hepatose, die das komplette Spektrum von einer einfachen Steatose über eine Steatohepatitis bis hin zu Fibrose und Zirrhose mit Leberzellinsuffizienz abdecken kann [15, 35, 94]. Bei Vorliegen von NAFLD kann jedoch kein zugrunde liegender chronischer Alkoholmissbrauch diagnostiziert werden.

Als Risikofaktoren für die Entstehung der NAFLD gelten Übergewicht (viszerales Fett), Typ 2 Diabetes, ausgedehntes Fasten, schneller Körpergewichtsverlust und Hypertriglyceridämie. Bei diesen Risikofaktoren mobilisierte, in der Leber anflutende FFS scheinen mit auslösend für den Krankheitsprozess zu sein. Bei zu großem Angebot an FFS kommt es zur intrazellulären Anhäufung von Triglyceriden. Hinzu kommt vermehrt auftretender oxidativer Stress durch die hohe Aktivität des Fettstoffwechsels. Dieser führt unter anderem zur Expression multipler Zytokine wie beispielsweise TNF- α und TNF- β . Es kommt zur Verstärkung der Lebersensitivität gegenüber TNF- α mit der Folge einer erhöhten Insulinresistenz. Die Entstehung der Fettlebererkrankung sowie jegliche andere

Erhöhung des Leberfettgehalts an sich scheint signifikant mit einer beginnenden hepatischen Insulinresistenz einherzugehen [50].

1.4 Genetische Determinanten der Lipolyse und des Leberfetts

1.4.1 Genetische Determinanten der Lipolyse

Die Lipolyse in Adipozyten unterliegt, wie schon unter 1.2.2 erläutert, multiplen Regulationsmechanismen. Neben den dort angeführten endokrinen, parakrinen und autokrinen Einflüssen sowie weiteren wichtigen Faktoren wie Alter, Geschlecht, körperliche Aktivität, Ernährung, Fettgewebslokalisierung und –verteilung, spielen Gene bei der Regulation der Lipolyse eine entscheidende Rolle.

Mehrere genetische Faktoren scheinen die Regulation der Lipolyse in Adipozyten zu beeinflussen [3]. Es wurden strukturelle Variationen in lipolyseregulierenden Genen beschrieben, die mit einer veränderten lipolytischen Funktion einhergehen. Diese Polymorphismen sind interessanterweise mit Übergewicht assoziiert. Als genetische Determinanten der Lipolyse gelten heute vor allem ADRB1, 2 und 3, HSL, ACC, PPAR γ ₂, Calpain 10, GPR74 und Adiponutrin.

Auf Ebene der Katecholamine sind die Gene der β -adrenergen Rezeptoren (ADRB) 1, 2 und 3 von Bedeutung. Variationen der Aminosäuresequenz und des Promotors im β_2 -adrenergen Rezeptor (ADRB2) führen zu unterschiedlichen Variationen in der Expression und Signaltransduktion des β_2 -Rezeptors und somit in Abhängigkeit von der Art der genetischen Variation zu erhöhter beziehungsweise verminderter lipolytischer Funktion des Rezeptors. Aminosäureveränderungen im β_3 -adrenergen Rezeptor vermindern die Signaltransduktion durch den Rezeptor und haben die Herabsetzung dessen lipolytischer Funktion zur Folge. Ferner sind strukturelle Variationen in den

Introns des Gens der hormonsensitiven Lipase, der HSL, des Rate-Limitierenden Enzyms der Lipolyse, stark mit einem verminderten katecholamin-induzierten Lipolyse assoziiert [5]. Studien konnten zeigen, dass Variationen im Acetyl-CoA-Carboxylase(ACC)-Gen die Lipolyse beeinflussen [58]. ACC katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA und stellt eines der wesentlichen Regulationsenzyme für den Fettsäurestoffwechsel dar. Des Weiteren zählt heute PPAR γ ₂ (Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor) zu den gesicherten genetischen Determinanten der Lipolyse. Eine veränderte Transkriptionsaktivität des PPAR γ ₂ bei Trägern des Pro12Ala-Polymorphismus, der mit einer erhöhten in vivo Insulinsensitivität im Menschen verbunden ist, führt zu einer effizienteren Lipolysesuppression im Fettgewebe [78].

In Studien erwiesen sich nicht-kodierende Variationen unbekannter Funktion im Calpain 10 Gen als funktionell relevant für die Lipolyse. Sie gingen mit einer verminderten β ₃-adrenergen Rezeptorfunktion des ADRB3 einher [5]. Der hauptsächlich in Gehirn, Herz und Fettgewebe exprimierte G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR74 stellt einen neuen Kandidaten bezüglich der Regulation des Körpergewichts im Menschen dar. Eine aktuell publizierte Studie zeigte eine starke Assoziation des ATAG Haplotypen im GRP74 Gen mit vermutlich katecholamin-vermittelter gesteigerter Lipolyse in vitro und in vivo [19]. Der Adipozytenlipase Adiponutrin wird eine Rolle in der Lipogenese zugeschrieben. Eine Arbeitsgruppe aus Malmö konnte zeigen, dass zwei Polymorphismen im Adiponutrin (ADPN) -Gen mit Adipositas assoziiert sind. Träger der Adipositas-assoziierten Varianten wiesen eine gesteigerte basale Lipolyse auf [36].

1.4.2 Genetische Determinanten des Leberfetts

Die Untersuchung eineiiger, im Hinblick auf Adipositas diskordanter Zwillinge konnte zeigen, dass erworbene Adipositas unabhängig vom genetischen Hintergrund zu einer Erhöhung des Leberfettgehalts führt [62]. Diese Beobachtung schließt eine Bedeutung genetischer Faktoren für den intrahepatischen Fettgehalt keineswegs aus, jedoch sind derzeit nur wenige Daten dazu verfügbar. Bekannte genetische Determinanten des Leberfetts sind, Adiponektin Rezeptor 1, Hepatische Lipase und TNF- α .

Polymorphismen der Promotor-Region des Adiponektin Rezeptor 1 (ADIPOR1) für das insulin-sensitivierende, anti-inflammatorische und anti-atherogene Adipokin Adiponektin legten in unseren Untersuchungen einen Zusammenhang mit Variationen im Fettgehalt der Leber nahe [77].

Die hepatische Lipase ist ein leberspezifisches Enzym mit regulatorischer Wirkung im hepatischen Lipoproteinstoffwechsel [9, 27, 71]. In Tübingen konnte man in vorangehenden Studien zeigen, dass auch Polymorphismen im Gen der Hepatischen Lipase mit erhöhtem Leberfettgehalt assoziiert sind [74]. In einer Kohorte von 66 japanischen Patienten mit NASH (nicht-alkoholischer Steatohepatitis) fand sich eine positive Korrelation von Polymorphismen im TNF- α Promotor mit NASH [86].

1.5 USF – Transkriptionsfaktoren

1.5.1 Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die in Körperzellen eine zentrale Rolle bei der Transkription als Teilschritt der Genexpression spielen. Bei funktionellen Veränderungen mit Auswirkung auf die Expression von Genen können sie daher von entscheidender klinischer Bedeutung sein.

Sie tragen dazu bei, die RNA-Polymerase am Promotor in die richtige Position zu bringen und bei der Trennung der beiden DNA-Stränge zu helfen, so dass die Transkription starten kann. Sie können an die DNA oder an DNA-Bindende Proteine binden und den Promoter aktivieren oder reprimieren. Es werden allgemeine (basale) und Gewebe- beziehungsweise zell-spezifische Transkriptionsfaktoren unterschieden [91]. Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind für jede Transkription notwendig, sie übernehmen verschiedene Aufgaben und binden dabei entweder direkt an die DNA oder an Proteine des Initiationskomplexes. Durch das Binden an die DNA stellen diese „basalen“ Transkriptionsfaktoren eine Art "Plattform" für die RNA-Polymerase her, nach deren Bindung die Transkription initiiert wird. Derartige Transkriptionsfaktoren sind in ihrer Struktur divers und haben unterschiedliche Aufgaben. Sie sind ubiquitär, d. h. in allen Zellen eines Organismus gleichmäßig vorhanden, und haben an der spezifischen Genregulation meist keinen Anteil [53].

Spezifische Transkriptionsfaktoren hingegen vermitteln der Polymerase, welches Gen aktiviert werden soll. Sie sind daher nur in den Zellen vorhanden, in denen das Gen, das sie regulieren, aktiviert (oder reprimiert) werden soll. Die DNA-Bereiche, an die sie binden, haben eine spezifische Sequenz, die von dem Transkriptionsfaktor erkannt und gebunden wird. Eine komplexe regulierende Funktion kommt durch das netzwerkartige Zusammenspiel der vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren zustande. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren selbst wird durch deren Regulation beispielsweise durch Bindung von Liganden, Phosphorylierungen, DNA-Bindung, Bindung von Co-Faktoren oder Blockade der DNA-Bindungsstelle bestimmt. Funktionelle Veränderungen der Transkriptionsfaktoren verhindern einen regulären Ablauf des Transkriptionsprozesses [53].

1.5.2 USF-1 und USF-2

USF-1 and -2 gehören zu einer evolutionär hoch konservierten Familie an aktivierenden Transkriptionsfaktoren (basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper-Familie). Die ubiquitär im menschlichen Körper exprimierten Proteine USF-1 und USF-2 von ungefähr 43 und 44 kDa Größe zeigen eine hohe Affinität zu regulatorischen im Genom vorkommenden, E-Box-Elementen (CANNTG, CACGTG)[17, 69]. Bei den USF- Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Schlüsselemente bei der Regulation der Transkription, die die Rekrutierung

Chromatin remodellierender Enzyme bewerkstelligen und mit Koaktivatoren und Bestandteilen des Präinitiationskomplexes (PIC) interagieren. Darüber hinaus können DNA-Aktivität und DNA-Bindung durch USF-Proteine auf verschiedenste Art und Weise moduliert werden. Unter anderem durch Phosphorylierung mittels spezifische Kinasen (p38, Proteinkinase A, cdk1 und PI3Kinase) und durch DNA-Veränderung des E-Box-bindenden Motivs (Methylierung, Single nucleotide polymorphism (SNP)). Die Vielzahl der durch die USF-Transkriptoren beeinflussten Parameter erschwert das Verständnis der USF-abhängigen Regulierung der Genexpression. Sicher ist, dass USF-Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle als Regulatoren einer großen Anzahl von für Stoffwechsel, Stress, Immunantwort, Zellzyklus und Proliferation bedeutsamen Genen spielen.

1.5.3 USF-1 und USF-2 – Rolle im Lipid- und Glukosemetabolismus

Bei den Transkriptionsfaktoren USF-1 und USF-2 handelt es sich um flächendeckend im menschlichen Körper exprimierte Transkriptionsfaktoren,

von denen man weiß, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation und Expression einer Reihe von am Lipid- und Glukosestoffwechsels beteiligten Genen spielen [89]. In den Adipozyten im Fettgewebe regulieren die USFs die Expression der Hormonsensitiven Lipase (HSL) und vermitteln die insulinvermittelte Expression der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) [87]. HSL ist bestimmend für die maximale Umsatzrate des enzymatischen Lipolyseprozesses [73] und die Acetyl-CoA Carboxylase bewerkstelligt Teilschritte der Fettsäuresynthese. Diese Beobachtungen weisen auf eine entscheidende Rolle des USF-1 bei der Koordination der Reaktionen des Fettstoffwechsels auf Veränderungen von Glukose- und Insulinspiegel hin.

Jedoch gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse zur genauen Wirkung und Wirkweise von USFs im menschlichen Körper. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien zeigten einen starken Zusammenhang der Familiären Kombinierten Hyperlipidämie (FCH) mit den Polymorphismen (SNPs, Single nucleotide polymorphisms) *usf1s1* (rs3737787) und *usf1s2* (rs2073658) im USF-1-Gen [18, 59]. In diesen Studien erwies sich der SNP *usf1s2* als funktionell relevant [54]. In einer weiteren Studie wurden 3 weitere SNPs, von denen mindestens zwei in komplettem Kopplungsungleichgewicht zueinander standen, das heißt bei denen keine überzufällig häufige Verbindung des einen Allels mit dem anderen Allel bestand, untersucht. Dabei stellte man fest, dass signifikante Assoziationen von Haplotyp und maximalen Spiegeln an Glukose nach einem OGTT bestanden. Ferner wurden Wechselwirkungen dieser USF-1 SNPs mit einem bedeutenden Polymorphismus der Hormonsensitiven Lipase, dem HSL - 60C>G SNP gefunden [65]. Die Gruppe um Hoffstedt *et al.* stellte in einer Studie fest, dass die SNPs *usf1s1* and *usf1s2* mit einer erhöhten *in vitro* katecholamin-induzierten Lipolyse in subkutan gelegenen Adipozyten in einer Population übergewichtiger Frauen einhergehen [29]. Erst kürzlich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine Assoziation der SNPs in USF1 mit der kardiovaskulären Erkrankung bei Frauen beobachtet [40]. Wie oben erwähnt,

handelt es sich hierbei um ein leberspezifisches Enzym, das den Lipoprotein-Stoffwechsel der Leber kontrolliert [9, 26, 71]. Es steht mit der intrahepatischen Akkumulation von Fett in Zusammenhang. Der SNP -514C>T des Gens der hepatischen Lipase (LIPC) ist bekannterweise mit einer verminderten Aktivität der Hepatischen Lipase im Plasma verbunden und hat Einfluss auf die Konzentrationen an Gesamt- und HDL-Cholesterin [2, 20, 81]. In einer bekannten Finnischen Diabetes Präventionsstudie [72, 85] war die -250G>A Substitution im Promotor des Hepatischen Lipase Gens *LIPC* mit erhöhter Insulinresistenz [63], verminderter Glukosetoleranz [34] und Übergang in Typ II Diabetes verbunden. Die Variante -250G>A stand dabei in fast vollständigem Kopplungsungleichgewicht zur genetischen -514C>T Variante. Untersuchungen unsererseits konnten eine Assoziation des -514C>T SNP von LIPC mit einem hohen Fettgehalt der Leber und einer niedrigen Insulinsensitivität zeigen [74].

1.6 Fragestellung

Studien zur Rolle von USF-1 lassen eine große Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors im Lipid- und Glukosemetabolismus des Menschen mit entscheidendem Einfluss auf die Insulinresistenz vermuten. Bei dem USF-1-Gen handelt es sich um eines der wichtigsten derzeit bekannten Gene für die Familiäre Hypercholesterinämie (FHCL) [54,59,87]. USF-1 ist darüber hinaus stark mit Atherosklerose vergesellschaftet. Sowohl die FHCL als auch die Atherosklerose korrelieren ihrerseits stark mit Lipolyse und Leberfett. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen untersucht, über die USF-1 zur Dyslipidämie und zur Atherosklerose beiträgt. Im Speziellen wurden folgende Fragen bearbeitet.

Erstens: Da die *usf1s1* (rs3737787) C>T und *usf1s2* (rs2073658) G>A Polymorphismen des USF-1 Gens mit einer erhöhten in vitro katecholamin-induzierten Lipolyse in Adipozyten assoziiert sind, wurde untersucht, ob diese Polymorphismen auch einen Effekt auf die in vivo antilipolytische Wirkung des Insulins beim Menschen haben. Dazu bestimmte man die Abnahme der Konzentrationen an freien Fettsäuren während eines oralen Glukosetoleranztests in einer großen Kohorte von Testpersonen ohne Diabetes mellitus. Um die antilipolytische Wirkung des Insulin direkt zu erfassen, bestimmte man zusätzlich im Rahmen eines euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamps den Zusammenhang der Polymorphismen mit der Gesamtkörperinsulinsensitivität. Da USF-1 und USF-2 regulatorisch auf die Genexpression der Hormonsensitiven Lipase in Adipozyten wirken [64], untersuchte man deren SNPs auf eine Wechselwirkung mit dem -60C>G SNP des Gens der Hormonsensitiven Lipase in Hinblick auf die Lipolyse im Fettgewebe.

Einleitung

Zweitens: Da USF-Transkriptionsfaktoren die Expression des Hepatischen Lipase-Gens LIPC in der Leber kontrollieren und da der SNP -514C>T des Gens der Hepatischen Lipase (LIPC) bekannterweise mit der Akkumulation von Fett in der Leber assoziiert ist, untersuchte man die Polymorphismen usf1s1 und usf1s2 und deren Interaktionen mit dem -514 C>T Polymorphismus des LIPC-Genes auf ihren Einfluss auf Leberfettgehalt und Insulinsensitivität.

2. Probanden, Studienaufbau, Materialien und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 Probandenkollektiv

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten stammen von insgesamt 407 Probanden aus der Tübinger Familienstudie für Diabetes mellitus Typ 2 (TÜF-Studie) und dem Tübinger Lebensstilinterventionsprogramm (TULIP). In der TÜF-Studie nehmen seit mehr als 10 Jahren Menschen mit einem erhöhten Diabetesrisiko an Untersuchungen zur Aufklärung der Pathogenese des Typ 2 Diabetes teil. Bei der TULIP-Studie handelt es sich um ein Programm, bei dem mittels Längsschnittuntersuchungen bei Lebensstilintervention die Beeinflussbarkeit der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes bei Risikopersonen vor allem in den Bereichen Ernährung und körperliche Aktivität erforscht wird.

Alle Probanden unterzogen sich einem oralen Glukosetoleranztest. Bei 54 Probanden wurde zusätzlich ein hyperinsulinämischer, euglykämischer Clamp mit direkter Messung der antilipolytischen Insulinsensitivität durchgeführt [74, 78]. Außerdem wurde bei 114 der Probanden der intrahepatische Fettanteil mithilfe der Magnetresonanztomographie bestimmt.

2.1.2 Teilnahmevoraussetzungen

Es wurden Probanden in die Studie aufgenommen, die eines oder mehrere der im Folgenden genannten Kriterien erfüllten:

- positive Familienanamnese für Diabetes mellitus Typ 2
- ein Gestationsdiabetes in der persönlichen Vorgeschichte
- eine eingeschränkte Glukosetoleranz
- ein Body-Mass-Index (BMI) von über 27 kg/m²

2.1.3 Ausschlusskriterien

Ein diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2, eine Schwangerschaft, Stillzeit, akute Entzündungen sowie psychiatrische Erkrankungen schlossen von der Teilnahme an der Studie aus. Instabile Angina pectoris oder manifeste arterielle Hypertonie stellten weitere Ausschlusskriterien dar. Auch ausgeschlossen wurden Probanden, die Medikamente mit bekanntem Einfluss auf die Insulinsensitivität, die Insulinsekretion oder den Glukosestoffwechsel einnahmen.

2.2 Studienaufbau

Alle an den beiden Studien teilnehmenden Probanden wurden im Vorfeld schriftlich sowie mündlich über die jeweilige Untersuchung, deren Durchführung, Ziele und mögliche Risiken aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Sie hatten jederzeit die Möglichkeit, diese Einverständniserklärung zurückzunehmen und die Studie ohne das Nennen von Gründen abzubrechen. Studienaufbau und -verlauf wurden von der Ethikkommission der Eberhard- Karls Universität Tübingen geprüft und genehmigt. Bei allen Probanden wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Außerdem wurden Körpergröße, Körpergewicht, Taillenumfang und Körperfettgehalt bestimmt. Mit Einwilligung der Probanden wurde zusätzlich ein Nachweis verschiedener DNA- Polymorphismen durchgeführt. Alle Testpersonen wurden mittels Spiroergometrie auf Parameter der körperlichen Fitness untersucht. Der Taillenumfang wurde gemessen und der Körperfettgehalt mittels Impedanzmessung festgestellt. Mithilfe der Magnetresonanztomographie wurde bei den Probanden der intrahepatische Fettgehalt bestimmt. Des Weiteren wurde bei einem Teil der Probanden zusätzlich ein euglykämischer, hyperinsulinämischer Clamp durchgeführt. Alle Untersuchungen wurden nach einer nächtlichen Nahrungskarenz und

Zigarettenabstinenz von jeweils 10h durchgeführt.

2.3 Methoden und Material

2.3.1 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)

Bei allen Probanden wurde ein morgendlicher oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Eine zehnstündige Nahrungskarenz ging der Untersuchung voraus, außerdem sollten die Probanden in den vorangehenden Wochen ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten und ihren körperlichen Aktivitätsgrad nicht verändern. Über eine periphere Venenverweilkanüle in der Ellenbeuge des Probanden wurde um 8 Uhr zunächst eine basale Blutentnahme zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin dem Gehalt an freien Fettsäuren, Triglyceriden, Totalcholesterin sowie LDL- und HDL-Cholesterin vorgenommen. Anschließend wurde eine Glukoselösung von 75 g Glukose in 300 ml (Dextro O.G.T. ®, Hoffmann- La Roche AG) oral verabreicht. Es folgten zu den Zeiten $t = 30, 60, 90$ und 120 Minuten (min) weitere Blutentnahmen zur Bestimmung von Plasmaglukose und Plasmasinsulin. Die freien Fettsäuren wurden ein zweites Mal bei $t = 120$ Minuten bestimmt. Während des Versuchs waren den Probanden Rauchen, Nahrungsaufnahme sowie körperliche Anstrengung untersagt. Die Insulinsensitivität wurde nach Matsuda und DeFronzo [51] aus den Plasmaglukose- und Insulinwerten während des OGTTs abschätzend berechnet. Die antilipolytische Insulinsensitivität wurde aus der Suppression der freien Fettsäuren im Serum zwischen $t = 0$ und $t = 120$ Minuten während des OGTTs abgeschätzt [46, 79].

2.3.2 Dreistufen- und Standard-euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

Der euglykämische Clamp dient in der Regel der Bestimmung der Insulinwirkung (Insulinsensitivität). Im Rahmen unserer Clamp-Untersuchung wurde darüber hinaus ein Index der systemischen antilipolytischen Insulinsensitivität (EC_{50} (in pmol/L)) als Funktion derjenigen Seruminsulinkonzentration, welche die Plasmaglycerolrate um 50% der maximalen Suppression unterdrückt, bestimmt. Dieser EC_{50} stellt ein Maß für die Empfindlichkeit des Körpers gegenüber der antilipolytischen Insulinwirkung dar.

Auch die Clamp-Untersuchungen wurden morgens um 8 Uhr am nüchternen Probanden durchgeführt. Erneut waren den Probanden Nahrungsaufnahme, Rauchen und körperliche Anstrengung während der Untersuchung untersagt. Jeder Teilnehmer erhielt 2 periphere Venenzugänge. Dabei wurde zur Blutentnahme eine Vene am Handrücken punktiert. Durch die Erwärmung der Hand wurde eine Erweiterung der arterio-venösen Shunts und dadurch eine Arterialisierung der entnommenen Blutprobe erreicht. Die Infusionslösungen wurden über eine zweite Venenverweilkanüle in der Ellenbeuge des kontralateralen Arms appliziert.

Die Bestimmung der basalen Plasmaglukosekonzentration erfolgte durch Mittelung der zu den Zeitpunkten $t = -20, -10$ und 0 Minuten gemessenen Werte an Plasmaglukose. Der Plasmaglukosespiegel des Probanden sollte im Versuch auf diesen Nüchternblutzuckerwert fixiert (engl.: to clamp = (ein)spannen) werden.

Auf diese Weise wurde in den letzten 60 Minuten der zweistündigen Untersuchung ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem die Glukoseinfusionsrate der vom Körpergewebe aufgenommenen Menge an Glukose entsprach. Die mittlere Glukoseinfusionsrate dient in diesem "steady-state" als Maß für die Insulinsensitivität des Körpers. Wir wandten bei unserem

Probandenkollektiv zwei verschiedene etablierte Clamp-Verfahren, den standardisierten hyperinsulinämischen euglykämischen und den dreistufigen hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp, an.

Standard hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp

Durch eine standardisierte Insulininfusion (Infusionsrate $1,0 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) wurde der Plasmainsulinspiegel des Probanden auf ein hyperinsulinämisches Niveau gebracht. Dabei ermöglichte die gleichzeitige, variabel angepasste Infusion 20%iger Glukose die Aufrechterhaltung der zuvor ermittelten basalen Plasmaglukosekonzentration.

Blutentnahmen alle 5 bis 10 Minuten zur Überprüfung der jeweils aktuellen Plasmaglukosekonzentration ermöglichten eine eventuell erforderliche Anpassung der Glukoseinfusionsrate. Zu den Zeitpunkten $t = 30, 60, 90, 100, 110$ und 120 Minuten erfolgten weitere Blutentnahmen zur Bestimmung der Glycerol-Anreicherung im Plasma und der FFS im Serum sowie zur Bestimmung des Seruminsulins.

Dreistufiger hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp

Die Probanden erhielten sequentielle Insulininfusionen mit den Infusionsraten $0,1, 0,25$ und $1,0 \text{ mU/kg/min}$ für 2 Stunden pro Infusionsrate. Arterialisiertes Blut wurde alle 5-10 Minuten zur Blutglukosebestimmung entnommen und eine Glukoseinfusion in ihrer Rate mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der Nüchternglukosespiegel angepasst. Freie Fettsäuren und Insulin im Serum, die Glycerol-Anreicherung und Glycerolkonzentration im Plasma wurden zusätzlich zu den Minuten $100, 110$ und 120 jeder zweistündigen Insulininfusion bestimmt.

Nach Ende der Untersuchung und Abschluss der Insulininfusion wurde bei beiden Clamp-Methoden die Rate an venös infundierter Glukose schrittweise reduziert, sowie den Probanden eine Mahlzeit bereitgestellt. Durch diese Maßnahmen und die wiederholte regelmäßige Blutglukosekontrolle sollte eine

Hypoglykämieinduktion durch Insulinnachwirkung vermieden werden. Die Berechnung der Insulinsensitivität erfolgte über den Insulinsensitivitätsindex ISI. Dieser ist ein Maß für die Empfindlichkeit des Gewebes auf Insulin und die dadurch vermittelte systemische Glukoseaufnahme des Körpers. ISI berechnet sich als Quotient aus der mittleren Glukoseinfusionsrate GIR_{mittel} während der letzten 60 min des Clamp und der konstanten Insulinkonzentration im Gleichgewichtszustand $Insulinkonzentration_{\text{Gleichgewicht}}$. Im Folgenden werden der bei der Clamp-Untersuchung ermittelte Insulinsensitivitätsindex als ISI (Clamp) und der ebenfalls ermittelte antilipolytische Insulinsensitivitätsindex als EC_{50} bezeichnet.

Als Index der systemischen antilipolytischen Insulinsensitivität (EC_{50} (in pmol/L)) diene diejenige Insulinkonzentration im Serum, durch welche die Erscheinungsrate an Glycerol im Plasma effektiv um 50% der maximalen Suppression unterdrückt wurde. Dieser Index ist ein Maß für die Empfindlichkeit des Körpers gegenüber der in unserer Studie im Mittelpunkt des Interesses stehenden lipolyse-unterdrückenden Wirkung des Insulins.

2.3.3 Bestimmung des Körperfettgehaltes

Der Körperfettgehalt der Probanden wurde mittels bioelektrischer tetrapolarer Impedanzmessung bestimmt. Mit dem Gerät BIA- 101 wurde über zwei Elektroden, jeweils am Arm und Bein einer Körperseite des Probanden angebracht, je ein Resistance- Wert und Reactance Wert gemessen. Aus diesen beiden Werten wurde, bezogen auf Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht der relative Körperfettgehalt in Prozent, der Körperwassergehalt sowie die fettfreie Körpermasse (= Lean- Body- Mass) bestimmt. Der Normwert für den Körperfettgehalt zeigt eine Abhängigkeit sowohl vom Alter als auch vom Geschlecht.

Tabelle 1: Normwerte des prozentualen Körperfettgehalts in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

Alter	Männer	Frauen
30- 50 Jahre	13 -15 %	19 - 21 %
< 30 Jahre	8 – 15 %	11 - 21 %
> 50 Jahre	15 - 18 %	21 - 25 %

2.3.4 Bestimmung von BMI und Körperfettverteilung

Der Body Mass Index (BMI) aller Probanden wurde bestimmt. Er wurde wie folgt aus Gewicht (kg) und Körpergröße (m) berechnet:

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

Tabelle 2: Norm- und Grenzwerte BMI nach WHO [10]

Klassifikation	BMI
Untergewicht	<18.50
Normalgewicht	18.50 - 24.99
Übergewicht	≥25.00
Adipositas	≥30.00
Adipositas Grad I	30.00 - 34.99
Adipositas Grad II	35.00 - 39.99
Adipositas Grad III	≥40.00

Der Taillenumfang wurde gemessen und als Parameter für die Körperfettverteilung herangezogen.

2.3.5 ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (^1H -MRS) zur Bestimmung hepatischer Lipide

Die Möglichkeit, die Lipidanteile des Lebergewebes mittels ^1H -MRS zu bestimmen, wurde unter anderem von unserer Arbeitsgruppe beschrieben und die Methode etabliert [74]. Diese Methode der volumenselektiven Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie ermöglicht es, gering konzentrierte Stoffwechselmetabolite von nur wenigen Volumenprozent aus ausgewählten Gebieten geringen Volumens (wenige cm^3) sensitiv zu bestimmen. Mit bildgebenden MR-Verfahren sind diese Signale nur sehr limitiert beziehungsweise gar nicht darstellbar.

Zur Bestimmung der hepatischen Lipidanteile wurden die Integrale der Lipidsignale (Methylen) und des Wassersignals (Referenz) gemessen. Der Gehalt an hepatischen Lipiden wird folglich als prozentualer Anteil des Methylensignals zum Wassersignal angegeben und in % ausgedrückt.

Die Abbildung 1 zeigt ein typisches Spektrum aus der Leber eines insulinresistenten Probanden.

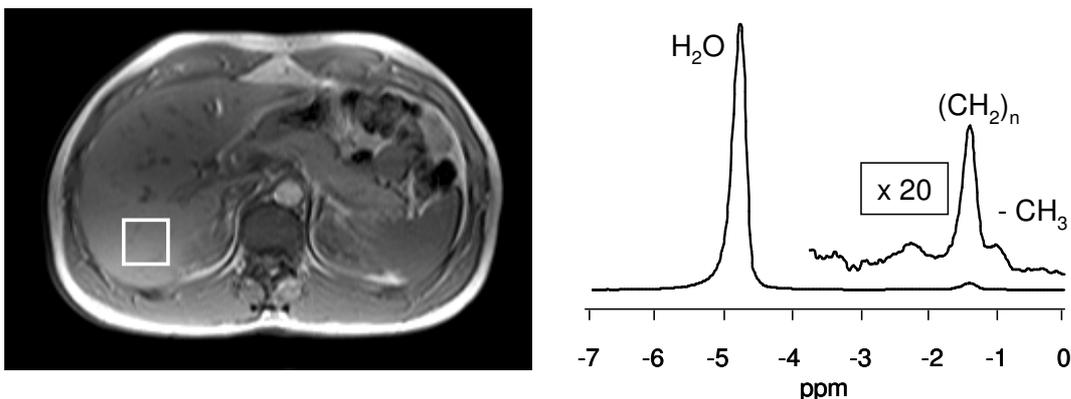


Abbildung 1: Volumenselektives Spektrum aus der Leber. Die Voxelposition ist im T1-gewichteten Turbo-Spin-Echo Tomogramm (links) eingezeichnet.

2.4 Analytik

Sowohl bei den Clamp-Untersuchungen als auch beim OGTT wurde die Blutglukosekonzentration unmittelbar im Anschluss an die jeweiligen Blutentnahmen gemessen. Für die Insulinbestimmung wurden die Proben bei 4 Grad zentrifugiert. Die Werte wurden aus dem abpipettierten Plasma nach Kühlung auf Eis noch am selben Tag bestimmt.

2.4.1 Bestimmung der Plasmaglukose

Die Plasmaglukosemessung wurde mit dem Gerät YSI 2300 STAT plus durchgeführt. Hersteller dieses Gerätes ist Yellow Springs Instruments, Yellow Spring, CO, USA. Als Grundlage der Messung dient die Glukose- Oxidase Methode.

2.4.2 Bestimmung des Plasmainsulins

Gemessen wurde das Plasmainsulin mithilfe des Microparticle Enzyme Immunoassay Verfahrens vom Hersteller Abbott Laboratories, Tokio, Japan.

2.4.3 Bestimmung des Serumspiegels der freien Fettsäuren

Die freien Fettsäuren (FFS) wurden nach einer enzymatischen Methode von WAKO chemicals, Neuss, Germany bestimmt.

2.4.4 Bestimmung des Serumspiegels der Lipoproteine

Die Konzentration an Lipoproteinen wurde mit dem Roche/Hitachi analyzer des Herstellers Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, bestimmt.

Dieses Gerät arbeitet auf der Basis einer kalorimetrischen Standardmethode.

2.4.5 Genotypisierung

Die genomische DNA wurde mittels eines kommerziellen DNA Isolations- Kits (NucleoSpin; Macherey-Nagel, Düren, Germany) isoliert. Zur Genotypisierung der untersuchten Polymorphismen (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) in *usf1s1* (rs 3737787), *usf1s2*(rs 2073658) und -60C>G in *HSL* fand der TaqMan assay des Herstellers Applied Biosystems Verwendung. Die Amplifizierung der TaqMan Genotypisierungsreaktion wurde mit dem GeneAmp PCR system 7000 (95°C für 10 min, dann 38 Zyklen bei 95°C für je 15 s, 62°C für je 1 min) durchgeführt. Für die Fluoreszenzdetektierung fand der ABI Prism 7000 sequence detector von Applied Biosystems Verwendung. Auch der -514C>T SNP in *LIPC* wurde wie schon beschrieben typisiert [74].

2.4.6 Körperfett

Das Gerät BIA-101A des Herstellers RJL Systems, Detroit, USA zur elektrischen Impedanzmessung fand zur Bestimmung des Körperfettgehalts Verwendung. Die Bestimmung des Körperfettanteils aus den gemessenen Resistance- und Reactance-Werten erfolgte durch das Programm Software Body Composition through Impedance Technology, Beta Test Version 0,9, Copyright RJL Systems 1989 von RJL Systems 9930 Whithier, Detroit M/ 48224, USA.

2.5 Berechnungen

2.5.1 Insulinsensitivitätsindex ISI

Der ISI stellt ein Maß für die insulinabhängige systemische Glukoseaufnahme

des Körpergewebes dar.

Er wird wie folgt berechnet:

$$ISI = \frac{GIR_{\text{mittel}}}{Insulin_{\text{Gleichgewicht}}}$$

GIR_{mittel} steht hierbei für die konstante Glukoseinfusion in den letzten 60 min des Clamps und $Insulin_{\text{Gleichgewicht}}$ für die konstante Insulinkonzentration im Gleichgewichtszustand der letzten 60 min des Clamp-Versuchs.

2.5.2 Matsuda Index

Der Matsuda Index diente zur Abschätzung der Insulinsensitivität (ISI_{est}) aus den OGTT Daten:

$$ISI_{\text{est}} = \frac{10000}{\sqrt{(N\ddot{U}G \cdot N\ddot{U}I)(m_{\text{Glc}} \cdot m_{\text{Ins}})}}$$

wobei $N\ddot{U}G$ für den Nüchternglukosewert, $N\ddot{U}I$ für den Nüchterninsulinwert, m_{Glc} für die mittlere OGTT- Glukose- Konzentration und m_{Ins} für die mittlere OGTT- Insulin- Konzentration steht.

m_{Glc} = Mittelwert (BZ min 0, BZ min 30, BZ min 60, BZ min 90, BZ min 120)

m_{Ins} = Mittelwert (Ins min 0, Ins min 30, Ins min 60, Ins min 90, Ins min 120)

2.5.3 Änderung der Freien Fettsäuren - Δ FFS

Δ FFS gibt den prozentualen Abfall der freien Fettsäuren (FFS) bei Minute 120 im Vergleich zu Minute 0 an und berechnet sich wie folgt:

$$\Delta\text{FFS} = \text{FFS}_{\text{min}0} - \text{FFS}_{\text{min}120}$$

2.5.4 EC_{50}

Der EC_{50} diene als Index der systemischen antilipolytischen Insulinsensitivität. Es handelt sich dabei um diejenige Seruminsulinkonzentration (pmol/L) welche mit 50 % der maximalen Suppression des Auftretens von Glycerol im Serum ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) einhergeht.

2.5.5 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert (M) +/- Standardfehler des Mittelwertes (SFM). Die Parameter wurden mittels χ^2 - Test auf Hardy-Weinberg-Normalverteilung getestet. Nicht normalverteilte Parameter wurden für die statistischen Analysen logarithmisch transformiert, um so annähernd eine Normalverteilung zu erreichen. Multivariate lineare Regressionsanalysen wurden durchgeführt, um Unterschiede zwischen Genotypen bezüglich anthropometrischer und metabolischer Eigenschaften auszugleichen. Bei diesen Analysen fungierte das phänotypische Merkmal als abhängige Variable, wohingegen Parameter wie Alter, Geschlecht und Genotyp unabhängige Variablen darstellten. Die verschiedenen Genotypen wurden unter Einbezug sowohl der Genotypen an sich als auch ihres "Interaktionsterms" in den vorangegangenen Test-Modellen auf Interaktionen getestet. Im Falle einer statistischen Signifikanz dieses "Interaktionsterms" wurden Genotypgruppen gebildet, um diese dann weiter auf Unterschiede zwischen den einzelnen

Varianten zu untersuchen. Aufgrund der relativ kleinen Anzahl an Probanden, die eine Homozygotie hinsichtlich der rezessiven Allele aufwiesen, wurde neben dem additiven Modell noch ein dominantes Modell verwendet, welches die heterozygoten Träger für das rezessive Allel und die homozygoten Träger des selteneren Allels zusammenfasst. Hierbei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Das Vorhandensein eines pair-wise linkage disequilibrium (D') für die USF Gene (eines paarweisen Kopplungsungleichgewichtes) wurde mithilfe des Programms THESIAS detektiert [88].

3. Ergebnisse

3.1 Assoziation des USF1 SNP mit den anthropometrischen Daten sowie Kohlenhydratstoffwechseldaten in der Gesamtpopulation

3.1.1 Probanden

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten stammen aus einem Probandenkollektiv von 407 Personen. Dabei handelt es sich um 218 weibliche und 189 männliche Probanden. Das durchschnittliche Alter lag bei 38 Jahren.

3.1.2 Kohlenhydratstoffwechsel

Es wurden nur Probanden in die Studie aufgenommen, deren Glukosewerte unterhalb der von der WHO vorgegebenen Grenzen zur Diagnose eines Diabetes mellitus lagen.

3.1.2.1 Nüchternglukose

In der untersuchten Population lag der mittlere Wert für die Plasmaglukose im Nüchternzustand bei 4,96 mmol/l (3,00-6,50).

3.1.2.2 Nüchterninsulin

Es fand sich in der Gesamtpopulation ein Nüchterninsulinwert von durchschnittlich 51,9 pmol/L (11,0-313,0) im Plasma.

3.1.2.3 Freie Fettsäuren im Nüchternzustand

Die freien Fettsäuren im Serum lagen nach Nahrungskarenz bei den untersuchten Probanden im Mittel bei 533 $\mu\text{mol/l}$ (74-1452)

3.1.3 Lipoproteine, Triglyceride und Cholesterin

Bei der Erfassung der Konzentration an Lipoproteinen im Serum wurden im Einzelnen Triglyceride, Gesamtcholesterin, HDL und LDL bestimmt. Der Mittelwert für die Triglyceride lag in der Gesamtpopulation bei 116 mg/dl (15-857). Es fand sich ein mittleres Gesamtcholesterin von 190 mg/dl (67-350). Das HDL im Serum lag bei den Probanden im Mittel bei 56 mg/dl (27-138), für das Serum-LDL ergab sich ein Mittelwert von 118 mg/dl (17-222).

3.1.4 Parameter der Insulinsensitivität

Der ISI als Maß für die insulinabhängige systemische Glukoseaufnahme des Körpergewebes wurde in der Gesamtpopulation in Form des Matsuda Index zur Abschätzung der Insulinsensitivität (ISI_{est}) aus den OGTT Daten bestimmt. Dabei ergab sich ein mittlerer Matsuda Index von 19,3 (2,8-69,7 Willkürliche Einheiten).

3.1.5 Körperfett und Fettverteilung

3.1.5.1 BMI

Der mittlere BMI lag bei den untersuchten Probanden bei 27,2 kg/m^2 . Die weiblichen Probanden wiesen einen mittleren BMI von $27,5 \pm 0,4 \text{ kg/m}^2$ auf. Bei den männlichen Probanden fand sich ein mittlerer BMI von $26,8 \pm 0,4 \text{ kg/m}^2$.

3.1.5.2 Taillenumfang

Der Taillenumfang in cm, der einen Parameter für die Körperfettverteilung darstellt, lag in der Gesamtpopulation im Mittel bei 92,6 cm (56,0 – 171,0 cm).

Der mittlere Taillenumfang war mit $89,5 \pm 1,0$ cm niedriger als bei den Männern mit $96,2 \pm 1,2$ cm.

3.1.5.3 Körperfettgehalt

Eine gute Quantifizierung des Körperfettes ist mit Hilfe der Messung des prozentualen Körperfettgehaltes per Impedanz möglich. Der mittlere prozentuale Körperfettanteil der untersuchten Probanden lag bei 28,0 % (7,0-58,3 %).

3.1.6 Übersicht

Die anthropometrischen Daten und Stoffwechseldaten der Probanden der Gesamtpopulation sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 3: Übersicht über die Parameter der Probanden der Gesamtpopulation

	M±SEM	Streuung (min-max)
Anzahl	407	
Geschlecht (F/M)	218/189	
BMI (kg/m ²)	27,2 ± 0,3	17,4 - 63,7
Taillenumfang (cm)	92,6 ± 0,8	56,0 - 171,0
Alter (Jahre)	38 ± 1	17 - 69
Körperfettanteil (%)	28,0 ± 0,5	7,0 - 58,3
Nüchterninsulin (pmol/L)	51,9 ± 1,7	11,0 - 313,0
2h Insulin (pmol/L)	350,9 ± 16,7	22,0 - 2132,0
Nüchternglukose (mmol/l)	4,96 ± 0,03	3,00 - 6,50
2h Blutglukose (mmol/l)	5,9 ± 0,1	2,8 - 10,7
Nüchtern FFS (μmol/l)	533 ± 11	74 - 1452
2h FFS (μmol/l)	72 ± 2	8 - 364
Triglyceride (mg/dl)	116 ± 5	15 - 857
Gesamtcholesterin (mg/dl)	190 ± 2	67 - 350
HDL-Cholesterin (mg/dl)	56 ± 1	27 - 138
LDL-Cholesterin (mg/dl)	118 ± 2	17 - 222
ISI (Matsuda) (willkürliche Einheiten)	19,3 ± 0,6	2,8 - 69,7

Legende: Die Daten repräsentieren Mittelwerte (M) ± Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM).

Die SNPs *usf1s1* C>T und *usf1s2* G>A standen in komplettem Kopplungsungleichgewicht zueinander ($D'=1.0$). Alle Probanden, die sich homozygot für das häufigere Allel von *usf1s1* (C/C) zeigten, waren gleichzeitig auch homozygote Träger des häufigeren Allels des SNPs *usf1s2* (G/G). Dies traf ebenso für die homozygoten Träger des selteneren Allels zu. Daher beschränken wir uns im Folgenden auf die Darstellung der

Abhandlung nur eines der untersuchten Polymorphismen, nämlich der für *usf1s2* G>A. Die Häufigkeit des Allels G für den *usf1s2* SNP betrug 0.704. Bei der Genotypisierung fand sich eine Verteilung der Allelträger gemäß dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p=0.58$).

Die Genotypen unterschieden sich nicht signifikant in Hinblick auf Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil, Nüchtern glukose, Nüchterninsulin, Freie Fettsäuren im Nüchternzustand, Lipoproteine und Insulinsensitivität.

Ebenso wenig fanden sich nach Anpassung für Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil signifikante Unterschiede zwischen den Genotypgruppen in Bezug auf Nüchternplasmaglukose, Nüchterninsulinspiegel, Spiegel an freien Fettsäuren im Nüchternzustand, Lipoproteinspiegel und auf die aus dem OGTT abgeschätzt Insulinsensitivität (ISI_{est}).

3.1.7 Genetischer Effekt des *usf1s2* SNP auf Plasmaglukose und –insulin

Nach multivariater Regressionsanalyse fand sich im OGTT im dominanten Modell (X/A) ein geringgradiger, jedoch statistisch signifikanter Effekt des Genotyps auf die 2h Werte für Plasmaglukose und -insulin. Träger des A Allels des *usf1s2* SNP zeigten nach 2 Stunden im Vergleich zu homozygoten Trägern des G Allels niedrigere Plasmaglukosespiegel ($p=0,046$) und Insulinspiegel ($p=0,047$).

3.2 Genetischer Effekt des *usf1s2* SNP auf die Lipolyse in der Gesamtpopulation

3.2.1 Freie Fettsäuren

Eine größere Auswirkung des Genotyps zeigte sich hingegen auf die Serumspiegel an FFS nach 2 Stunden in der Gesamtpopulation. Träger des

selteneren A Allels wiesen sowohl im additiven als auch im dominanten Modell nach 2 Stunden niedrigere Konzentrationen an FFS im Serum auf als die homozygoten Träger des häufigeren G Allels des *usf1s2* SNP ($p=0,01$).

Darüber hinaus nahmen die Konzentrationen an Freien Fettsäuren bei Trägern des A Allels im zeitlichen Verlauf des OGTT stärker ab als bei den homozygoten Trägern des G Allels ($p=0,045$ im additiven Modell und $p=0,02$ im dominanten Modell; nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil, 2 Stunden Insulinwert und Nüchternspiegel an FFS. Diese Ergebnisse sprechen für eine effektivere Unterdrückung der Lipolyse bei Trägern des selteneren A Allels.

3.3 Genetischer Effekt des *usf1s1* Polymorphismus auf die Lipolyse im Antilipolyse-Clamp

Insgesamt hatten 54 Probanden Daten zur antilipolytischen Insulinsensitivität aus einem euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamp. Es handelte sich um 25 Frauen und 29 Männer.

3.3.1 Alter und Geschlecht

Die Population war im Mittel 29 ± 1 Jahre alt.

3.3.2 BMI und Körperfett

Der mittlere BMI lag bei $23,1 \pm 0,5$ kg/m². Bei den weiblichen Probanden betrug er $23,8 \pm 0,8$ und bei den Männern $22,5 \pm 0,4$ kg/m². Der mit Hilfe der Impedanzmessung ermittelte mittlere prozentuale Körperfettanteil der untersuchten Probanden lag bei $21,2 \pm 1,2$ %. Bei den Frauen betrug er $27,4 \pm 1,5$ % und bei den Männern $15,9 \pm 1,0$ %..

Ergebnisse

Eine Übersicht über die Daten der Probanden aus diesem euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Übersicht Probandendaten EC₅₀

Legende: Die Daten repräsentieren Mittelwerte $M \pm$ Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM).

	M\pmSEM	Streuung (min - max)
Anzahl	54	
Geschlecht (F/M)	25/29	
BMI (kg/m ²)	23,1 \pm 0,5	17,4 - 36,3
Alter (Jahre)	29 \pm 1	19 - 49
Körperfettanteil (%)	21,2 \pm 1,2	5,0 - 47,0
EC ₅₀ (pmol/L)	52,0 \pm 1,5	28,7 - 80,0

Bei 48 dieser Probanden wurden außerdem zusätzlich Messungen der Spiegel an FFS zu Beginn des OGTT sowie nach 2 Stunden durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an homozygoten Trägern für das seltene A Allel (n=3) wurde hierzu lediglich das dominante Modell (G/G vs. X/A) angewandt.

Die einzelnen Genotypgruppen unterschieden sich nicht signifikant in Hinblick auf Geschlecht (G/G: 9 Frauen, 14 Männer; X/A: 16 Frauen, 15 Männer, $p=0.33$), Alter (29.1 ± 1.7 vs. 29.2 ± 1.3 Jahre, $p=0.96$), BMI (23.1 ± 0.5 vs. 23.2 ± 0.7 kg/m², $p=0.95$) und prozentualen Körperfettanteil (19.7 ± 1.5 vs. $22.4 \pm 1.7\%$, $p=0.73$).

3.3.3 EC₅₀

Eine Differenz zwischen den Genotypen zeigte sich hingegen in Bezug auf den errechneten Insulinsensitivitätsindex EC₅₀. Der Wert für EC₅₀ war bei Trägern

des A Allels des *usf1s2* Polymorphismus niedriger als bei den Individuen, die homozygote Träger des G Allels des *usf1s2* SNP waren ($p=0.03$ nach Anpassung für Geschlecht, Alter, und Körperfett in Prozent). Diese Daten sprechen dafür, dass bei Trägern des A Allels weniger Insulin erforderlich war, um die Lipolyse zu unterdrücken. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2

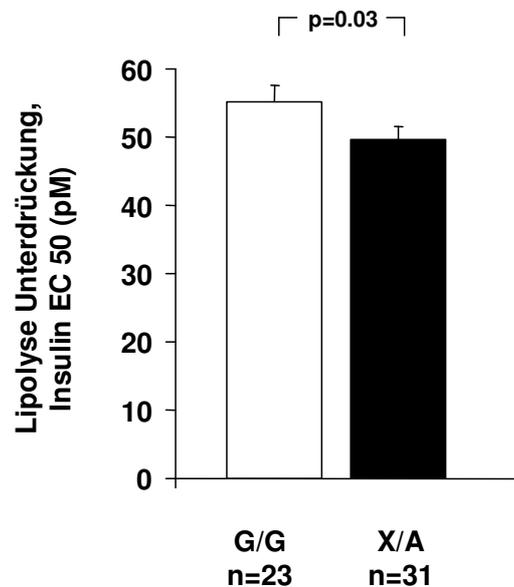


Abbildung 2

Assoziationen der Genotypen des *usf1s2* (rs2073658) G>A Polymorphismus im USF-1 Gen mit EC₅₀ (diejenige Insulinkonzentration, die eine halbmaximale Unterdrückung der Glycerolrate im Blut bewirkt) im dominanten Modell nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil

3.4 Effekt des SNP -60C>G der Hormon Sensitiven Lipase (HSL) auf die antilipolytische Insulinsensitivität und Interaktionen dieses Polymorphismus mit dem usf1s2 SNP

Aufgrund der Tatsache, dass in früheren Studien eine Interaktion zwischen dem SNP -60C>G der Hormon Sensitiven Lipase (HSL) und dem USF SNP bei der Determinierung der Triglyceridspiegel nach Fettzufuhr festgestellt werden konnte [65], haben wir weiter untersucht, ob eine Assoziation des genannten HSL Polymorphismus mit der antilipolytischen Insulinsensitivität besteht und ob es eine Wechselwirkung zwischen HSL SNP und usf1s2 SNP im Hinblick auf die antilipolytische Insulinsensitivität gibt.

Die Insulinsensitivität wurde in der Clamp-Untersuchung erfasst (ISI) und aus dem OGTT abgeschätzt (ISI_{est}). Die antilipolytische Insulinsensitivität wurde als EC_{50} im Clamp erfasst. Es wurden keine Assoziationen des HSL SNP mit der antilipolytischen Insulinsensitivität gefunden. Auch zeigten sich keine Wechselwirkungen des HSL Polymorphismus mit dem SNP usf1s2 in Bezug auf die antilipolytische Insulinsensitivität (alle $p > 0,23$; Daten nicht dargestellt).

3.5 Effekt des usf1s2 SNP und des -514 C>T LIPC SNP auf den Leberfettgehalt und die Insulinsensitivität

Bei 114 Probanden wurde der Leberfettgehalt bestimmt.

3.5.1 Parameter der Insulinsensitivität

Als Maß für die insulinabhängige systemische Glukoseaufnahme des Körpergewebes wurde in dieser Population der Matsuda Index (ISI_{est}) aus den OGTT Daten bestimmt. Dabei ergab sich ein mittlerer Matsuda Index von $12,9 \pm 0,6$ (willkürliche Einheiten).

3.5.2 Körperfett und Fettverteilung

3.5.2.1 BMI

Der mittlere BMI lag bei den Probanden bei $29,2 \pm 0,5 \text{ kg/m}^2$. Die weiblichen Probanden wiesen einen mittleren BMI von $29,01 \pm 0,7 \text{ kg/m}^2$ auf. Bei den männlichen Probanden fand sich ein mittlerer BMI von $29,5 \pm 0,6 \text{ kg/m}^2$.

3.5.2.2 Körperfettgehalt

Der mittlere prozentuale Körperfettanteil der untersuchten Probanden lag bei 31,1%. Die Frauen hatten mit $35,8 \pm 1,0 \%$ einen höheren mittleren Körperfettanteil als die Männer mit $25,9 \pm 0,7\%$.

3.5.2.3 FFS im Nüchternzustand

Die FFS im Serum lagen nach Nahrungskarenz bei den untersuchten Probanden im Mittel bei $586 \pm 21 \mu\text{mol/l}$.

Eine Übersicht über die Daten aus dieser Population findet sich in Tabelle 5.

Ergebnisse

Tabelle 5: Probandendaten Leberfettpopulation

	M±SEM	Streuung (min-max)
Anzahl	114	
Geschlecht (F/M)	59/55	
BMI (kg/m ²)	29,2 ± 0,5	19,2 - 47,0
Alter (Jahre)	43 ± 1	20 – 69
Körperfettanteil (%)	31,1 ± 0,8	14,0 - 60,0
Nüchterninsulin (pmol/L)	59,9 ± 3,1	19,0 - 180,0
2h Insulin (pmol/L)	522,6 ± 37,9	67,0 - 2132,0
Nüchtern glukose (mmol/l)	5,1 ± 0,4	4,2 - 6,5
2h Glukose (mmol/l)	6,8 ± 0,1	3,8 - 10,6
Nüchtern FFS (µmol/l)	586 ± 21	148 – 1315
2h FFS (µmol/l)	85 ± 8	17 – 775
Triglyceride (mg/dl)	127 ± 9	41 – 857
Gesamtcholesterin (mg/dl)	188 ± 3	96 – 341
HDL-Cholesterin (mg/dl)	51 ± 1	27 – 94
LDL-Cholesterin (mg/dl)	118 ± 3	37 – 223
ISI (Matsuda) (willkürliche Einheiten)	12,9 ± 0,6	2,9 - 32,1
Intrahepatisches Fett (%)	7,0 ± 0,7	0,2 - 41,1

In dieser kleineren Gruppe unterschieden sich die Genotypgruppen in Hinblick auf die Nüchternspiegel an Freien Fettsäuren. Bei Trägern des selteneren A Allels des *usf1s2* SNP zeigten sich niedrigere Nüchternspiegel an FFS ($p=0,04$). Für alle anderen in der Tabelle dargestellten Parameter fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Die festgestellte Differenz zwischen den Genotypen bezüglich der FFS-Spiegel im Nüchternzustand, die sich in der kleineren Leberfettgruppe, nicht jedoch in der Gesamtpopulation fand, könnte Folge eines Zufalls sein. Dieser Fehler könnte in der geringen Gruppengröße und der relativ hohen Variabilität bei der Messung von Freien Fettsäuren im Serum begründet sein.

3.5.2.4 ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (^1H -MRS) zur Bestimmung des Leberfettgehalts

3.5.2.4.1 Leberfett und Insulinsensitivität

Im Gegensatz zur FFS-Messung im Serum handelt es sich bei der Bestimmung der Lipidanteile des Lebergewebes mittels volumenselektiven Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie (^1H -MRS) jedoch um eine etablierte Methode, die in höchstem Maße reproduzierbar ist [32].

Wie erwartet fanden wir einen starken Zusammenhang zwischen Leberfett und Insulinsensitivität. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3

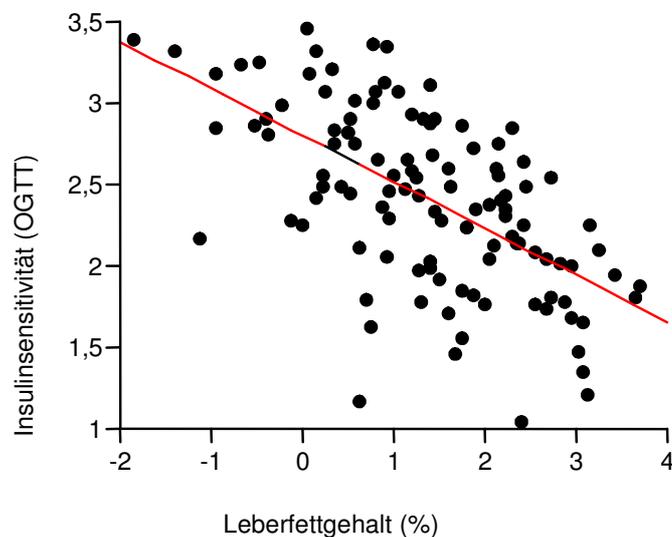


Abbildung 3 Assoziationen von Leberfett und Insulinsensitivität in der Leberfettpopulation nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil

3.5.2.4.2 Polymorphismen und Leberfett

Der *usf1s2* G>A SNP zeigte nach Adjustierung für Alter, Geschlecht und prozentualem Körperfettanteil keine Assoziation mit dem Leberfett (G/G, n=59, 7.73 ± 1.02 % und X/A, n=55, 6.25 ± 1.05 %, $p=0.35$). Wie schon im Vorangegangenen berichtet, bestand dagegen ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Trägerschaft für das seltenere Allel T des -514 C>T LIPC SNP und dem Vorliegen von höheren Leberfettwerten (C/C, n=74, 5.67 ± 0.76 % und X/T, n=40, 9.48 ± 1.47 %, $p=0.01$).

3.5.2.5 Interaktion *usf1s2* und LIPC SNP

3.5.2.5.1 Leberfett

Bei der Untersuchung dieses Ergebnisses in Zusammenhang mit dem *usf1s2* SNP war die Beobachtung jedoch eine andere ($p=0,01$ für die Interaktion).

Der Leberfettgehalt war lediglich bei denjenigen Probanden erhöht, die gleichzeitig homozygote Träger des häufigeren Allels G des *usf1s2* SNP und Träger des selteneren T Allels des -514 C>T LIPC SNP waren. Diese Beobachtung ist in Abbildung 4 dargestellt.

Träger des T-Allels des -514 C>T SNP im LIPC-Gen hatten nur dann höhere Leberfettwerte wenn sie gleichzeitig homozygote Träger des G-Allels des *usf1s2* G>A SNP waren. Es ergaben sich ein $p=0,01$ für die Unterschiede zwischen den Gruppen (Bestimmung mittels ANOVA) sowie ein $p=0,00007$ für den Unterschied zwischen den Probanden des Genotyps X/T für den LIPC SNP und G/G für den *usf1s2* SNP und denjenigen des Genotyps C/C für den LIPC SNP und G/G für den *usf1s2* SNP. $p=0,021$ nach Korrektur für multiples Testen (dreifaches Testen).

Abbildung 4

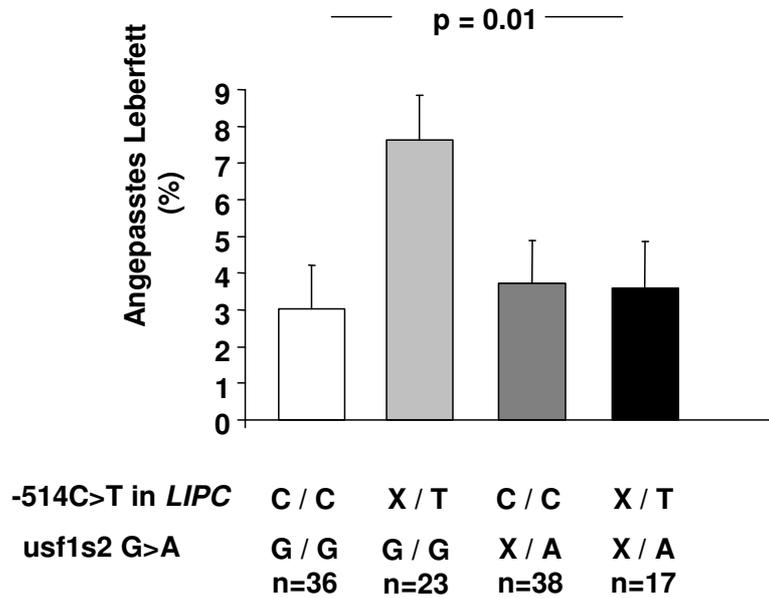


Abbildung 4

Assoziationen des -514 C>T SNP im LIPC-Gen mit dem Leberfett nach Anpassung für Alter, Geschlecht und prozentualen Körperfettanteil vor dem Hintergrund des usf1s2 (rs2073658) G>A Polymorphismus im USF-1 Gen.

3.5.2.5.2 Insulinsensitivität

Darüber hinaus untersuchten wir den *usf1s2* Polymorphismus auf eine mögliche Interaktion mit dem -514 C>T LIPC SNP bezüglich des Effekts auf die Insulinsensitivität.

Auch hier wurden als Parameter für die Insulinsensitivität sowohl der Matsuda-Index aus dem OGTT als auch der aus dem Clamp errechnete ISI herangezogen. Ähnlich den Ergebnissen der Untersuchung bezüglich der intrahepatischen Lipide war auch hier die Insulinsensitivität insbesondere bei den Probanden niedriger, die gleichzeitig homozygote Träger des häufigeren Allels des *usf1s2* SNP und Träger des T Allels des -514 C>T LIPC SNP waren. Dieser Unterschied war jedoch im Falle der Insulinsensitivität nicht von statistischer Signifikanz. ($p = 0.06$ für die Interaktion im OGTT und $p = 0.08$ im Clamp, Daten nicht dargestellt).

4. Diskussion

4.1 USF-1 – Kandidatengen für Insulinresistenz und Diabetes Typ 2, Dyslipidämie und Atherosklerose

Vorangegangene Untersuchungen zur Bedeutung von USF-1 lassen eine wichtige Rolle dieses flächendeckend im menschlichen Körper exprimierten Transkriptionsfaktors für den Lipid- und Glukosemetabolismus mit entscheidendem Einfluss auf die Insulinresistenz vermuten. USF-1 ist eines der wichtigsten derzeit bekannten Gene für die Familiäre Hypercholesterinämie (FHCL) [54,59,87]. Außerdem ist USF-1 stark mit Atherosklerose vergesellschaftet. Diese Beobachtungen konnten wiederholt in multiplen Kohorten mit FHCL [29, 54, 65] und anderen Dyslipidämien gemacht werden [17, 40, 69]. Sowohl die FHCL als auch die Atherosklerose ihrerseits korrelieren stark mit Lipolyse und Leberfett. USF-1 reguliert im Fettgewebe die Expression von Lipolyseenzymen, vor allem die der Hormonsensitiven Lipase (HSL). In den Hepatozyten reguliert USF-1 die Expression des Gens der hepatischen Lipase (LIPC), das mit der Akkumulation von Fett in der Leber in Zusammenhang steht. Die *usf1s1* (rs3737787) C>T und *usf1s2* (rs2073658) G>A Polymorphismen des USF-1 Gens sind mit einer erhöhten in vitro katecholamin-induzierten Lipolyse in Adipozyten assoziiert [29]. Zusammengenommen weisen diese Beobachtungen auf eine entscheidende Rolle von USF-1 bei der Koordination von Fettstoffwechselreaktionen auf Veränderungen von Glukose- und Insulinspiegel hin. Bisher gibt es jedoch kaum Erkenntnisse zur genauen Wirkung und

Wirkweise von USFs im menschlichen Körper. In dieser Arbeit wurde untersucht über welche Mechanismen USF-1 zur Dyslipidämie und zur Atherosklerose beiträgt. Dazu wurden unter Anderem genaue Messmethoden für Lipolyse und Leberfett angewandt. Es stellte sich heraus, dass Träger des T-Allels des *usf1s1* SNP und des A-Allels des *usf1s2* SNP im Vergleich zu homozygoten Trägern des C-Allels des *usf1s1* und des G-Allels des *usf1s2* SNP empfindlicher gegenüber dem lipolyse-unterdrückenden Effekt von Insulin waren. Die Daten zum Intrahepatischen Fettgehalt aus einer volumenselektiven Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie (^1H -MRS) deuten weiterhin auf eine Interaktion der Polymorphismen mit dem -514 C>T SNP im LIPC-Gen der hepatischen Lipase in Bezug auf das Leberfett hin.

4.2 USF-1 Polymorphismen *usf1s1*, *usf1s2* und antilipolytische Insulinsensitivität

In der vorliegenden Studie wurde weiterhin die Auswirkung genetischer Variationen im USF1-Gen, im Speziellen die der SNPs *usf1s1* (rs3737787) C>T und *usf1s2* (rs2073658) G>A, auf die antilipolytische Insulinsensitivität untersucht. Es zeigte sich, dass Träger des T Allels des *usf1s1* SNP und des A Allels des *usf1s2* SNP im Vergleich zu homozygoten Trägern des C Allels des *usf1s1* und des G-Allels des *usf1s2* SNP eine höhere antilipolytische Insulinsensitivität aufwiesen. Die genannten Probanden wiesen im OGTT nach 2h niedrigere Spiegel an Freien Fettsäuren auf als die Träger der häufigeren Allele der USF-1 Polymorphismen. Außerdem zeigten das T Allel des *usf1s1* SNP und das A Allel des *usf1s2* SNP eine Assoziation mit einem stärkeren Abfall der FFS während des OGTT. Die höhere antilipolytische Insulinsensitivität ging in unserer Untersuchung mit einer geringgradig besseren Glukosetoleranz der Probanden einher. Es fanden sich bei Trägern des T Allels des *usf1s1* SNP und des A Allels des *usf1s2* SNP im

Vergleich zu homozygoten Trägern des C Allels des *usf1s1* und des G Allels des *usf1s2* SNP nach 2h niedrigere Insulin- sowie Plasmaglukosespiegel.

Dies ist die erste Untersuchung, die einen Einfluss der genetischen Variationen im USF-1 Gen auf die Lipolyse *in vivo* zeigt. Wie schon beschrieben, haben Hoffstedt *et al* [29] beobachtet, dass das T Allel des *usf1s1* SNP und das A Allel des *usf1s2* SNP mit einer erhöhten *in vitro* katecholamin-induzierten Lipolyse in den subkutanen Adipozyten übergewichtiger Frauen einhergehen. Die aktuellen Studien von Pajukanta *et al* [59] und Coon *et al* [18], die einen engen statistischen Zusammenhang der selben SNP mit der Familiären Hypertriglyceridämie (FCHL) zeigen konnten (es zeigte sich ein protektiver Effekt des T Allels von *usf1s1* und des A Allels von *usf1s2*), lieferten somit eine zusätzliche indirekte Bestätigung der Vermutung, dass diese SNP eine wichtige Rolle bei der Lipolyse spielen. Diese Annahme wird des Weiteren durch Daten unterstützt, die eine Beeinträchtigung der katecholamin-induzierten Lipolyse bei Vorliegen der FCHL aufzeigen konnten [68].

4.3 USF-1 Polymorphismen *usf1s1*, *usf1s2*, Lipidprofil und basale Lipolyse

Die oben genannten Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Pajukanta und Coon [18, 59] zeigten außerdem eine Vergesellschaftung der Polymorphismen mit hohen Serum-Triglyceridwerten und hohen LDL-Cholesterinspiegeln sowie einer geringen LDL-Partikelgröße. Drei weitere SNPs im USF-1 Gen waren bei der Untersuchung junger gesunder Männer mit positiver Familienanamnese für frühzeitige koronare Herzerkrankungen weder mit den Lipidspiegeln im Nüchternzustand noch postprandial assoziiert [65].

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, den Erkenntnissen dieser Studie und derer von Hoffstedt *et al* [29] entsprechend, in unserer Untersuchung

keinen Zusammenhang der usf1s1/usf1s2 SNPs mit dem Lipidprofil der Probanden. Die Trägerschaft für die selteneren Allele des Polymorphismus zeigte keinen Effekt auf das Nüchternlipidprofil in Form von veränderten Serum-Triglyceridwerten oder Cholesterinspiegeln im Nüchternzustand. Eine mögliche Erklärung liegt jedoch in der Tatsache, dass es sich bei dem von uns untersuchtem Probandenkollektiv nicht um eine mit der FHCL-Population vergleichbare Population handelt. Die Probanden in der vorliegenden Arbeit wiesen im Mittel nicht stark erhöhte Serumspiegel an Triglyceriden und Cholesterin (siehe Tabelle 3.1) auf. Die geringe Streuung der Triglycerid- und Cholesterinwerte verringert die Wahrscheinlichkeit, eine genetische Determinante des Lipidprofils über deren Auswirkungen auf die Blutfettwerte zu detektieren, entscheidend. Deshalb können entsprechende Effekte vermutlich nicht detektiert werden.

Der Mechanismus einer erhöhten antilipolytischen Insulinsensitivität bei Trägern des T-Allels des usf1s1 SNP und des A-Allels des usf1s2 SNP ist bisher nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte die verminderte Aktivität der HSL (Hormonsensitiven Lipase), des Rate-Limitierenden Enzyms der Lipolyse, sein. Der Promotor des HSL-Gens enthält eine USF-bindende E-Box und die Konzentrationen an HSL-mRNA sind im Fettgewebe von Mäusen ohne USF-1 und UFS-2 vermindert [73]. Putt *et al* berichteten von einer Interaktion der SNPs im USF-Gen mit dem -60C>G Polymorphismus im HSL-Gen in Bezug auf Triglyceridkonzentrationen nach Zufuhr von Fett, nicht jedoch nach Glukosezufuhr [65]. Hoffstedt *et al* fanden heraus, dass die Effekte des T-Allels des usf1s1 SNP und des A Allels des usf1s2 SNP bei maximaler lipolytischer Aktion der Katecholamine eingeschränkt waren [29]. Dies legt nahe, dass die Effekte auf einer anderen Ebene der Lipolyse zustande kommen. Vermutlich auf der Post-Rezeptor Ebene, auf der HSL ebenfalls aktiv ist.

Hoffstedt *et al* fanden keine Auswirkung der Polymorphismen auf die basale Lipolyse. Dieser Beobachtung entsprechend, konnten auch wir keinen Effekt von *usf1s1* und *usf1s2* auf die Nüchternspiegel an FFS nachweisen. Des Weiteren wurde keine Interaktion von *usf1s1* SNP und -60C>G SNP im HSL-Gen im Hinblick auf die Triglyceridkonzentrationen nach Glukoseaufnahme gefunden. Die Serum-Triglyceridspiegel nach Zufuhr von Glukose waren unauffällig. Auch fanden wir keine Assoziation des -60C>G SNP im HSL-Gen an sich mit der antilipolytischen Insulinsensitivität. Weiterhin zeigte sich keine Interaktion von *usf1s1* SNP und -60C>G SNP im HSL-Gen bezüglich der im Clamp gemessenen und aus dem OGTT abgeschätzten antilipolytischen Insulinsensitivität.

FFS scheinen für die Interaktion der beiden Gene entscheidend zu sein. In einer Untersuchung von Putt *et al* [65] zeigte sich eine Interaktion der beiden SNPs auf die Triglyceridkonzentrationen nach Fettzufuhr, jedoch nicht nach Zufuhr von Glukose. In unserer Studie gingen verminderte Konzentrationen an FFS mit einer geringfügig besseren Glukosetoleranz einher. Es ist plausibel, dass die verminderte Freisetzung von FFS bei Trägern des T-Allels des *usf1s1* SNP eine effizientere Unterdrückung der hepatische Glukoseproduktion unter insulinstimulierten Bedingungen erlaubt. Dies würde eine höhere hepatische Insulinempfindlichkeit dieser Probanden implizieren. Daten, die eine Beteiligung der USF-Proteine an der Regulation der Expression von am Lipidstoffwechsel beteiligten Genen zeigen [17, 33, 60, 69, 89, 93], unterstützen diese Hypothese. Daher könnten die Polymorphismen *usf1s1* und *usf1s2* neben ihrem Einfluss auf die Lipolyse einen deutlicheren Effekt auf die Leber als auf das Muskelgewebe haben. Beide sind für die systemische Insulinsensitivität ausschlaggebend. Da die hepatische Insulinsensitivität jedoch nicht explizit gemessen wurde, kann über diesen Zusammenhang lediglich spekuliert werden. Dennoch könnte es sich, wäre eine höhere Insulinsensitivität der Träger der selteneren Allele wirklich der Fall, dabei um eine mögliche Erklärung für unsere Daten handeln. Denn das Fehlen eines Effekts der untersuchten

Polymorphismen auf die Gesamtkörper-Insulinsensitivität bei gleichzeitig vorhandenem Einfluss auf die Glukosetoleranz und die Insulinspiegel nach 2 h, die beide erwiesenermaßen stark von der hepatischen Insulinsensitivität mitbestimmt werden [8] ließe sich so dadurch erklären.

4.4 USF-1 Polymorphismen *usf1s1* und *usf1s2* und Leberfett

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass USF-1 in den Hepatozyten die Expression des Gens der hepatischen Lipase (LIPC) reguliert [14]. Dieses Gen steht mit der Akkumulation von Fett in der Leber in Zusammenhang [29]. Daher haben wir den Einfluss von genetischer Variabilität in USF-1 auf den Fettgehalt der Leber untersucht.

In der aktuellen Untersuchung zum intrahepatischen Fettgehalt zeigte sich eine Interaktion der Polymorphismen (SNPs) *usf1s1* (rs3737787) C>T und *usf1s2* (rs2073658) G>A mit dem -514 C>T SNP im LIPC-Gen der hepatischen Lipase auf das Leberfett.

Der prozentuale Leberfettanteil war bei denjenigen Probanden erhöht, die gleichzeitig homozygote Träger für das häufigere Allel G des *usf1s2* SNP und homozygote Träger für das Allel T des -514C>T SNP in LIPC waren. Der SNP USF-1 an sich hatte keinen Effekt auf den mittels $^1\text{H-MRS}$ bestimmten intrahepatischen Fettgehalt. Eine vergleichbare Interaktion von *usf1s2* und LIPC zeigte sich auch auf die aus dem OGTT und dem Clamp geschätzte systemische Insulinsensitivität. Homozygote Träger für das Allel G des *usf1s2* SNP und das Allel T des LIPC SNP wiesen niedrigere Werte für ISI_{est} auf.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass sich ein erhöhter prozentualer Leberfettanteil zwar bei denjenigen Probanden findet, die gleichzeitig homozygote Träger für das Allel G des *usf1s2* SNP und das Allel T des -514C>T SNP in LIPC waren, nicht jedoch bei alleinigem Vorliegen des USF-1 SNP, liegt darin, dass es sich bei USF-1 um ein Gen mit zentraler Bedeutung

im Energiestoffwechsel handelt. USF-1 spielt durch die Regulation der Expression zahlreicher Gene des Lipidmetabolismus eine außerordentlich große Rolle im menschlichen Organismus [89]. Die Auswirkungen von zentralen Mutationen in solchen Genen sind in der Regel nicht mit dem Leben vereinbar. Daher sind in Genen wie USF-1 zentrale Defekte selten zu finden. Man findet jedoch häufig, dass Polymorphismen in solchen Genen Effekte anderer Gene regulieren.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Untersuchung nahe, dass Träger des T-Allels für *usf1s1* und Träger des A-Allels für *usf1s2* des USF-1 Gens empfindlicher für die antilipolytische Wirkung von Insulin sind als die Träger der häufigeren Allele C und G dieser Polymorphismen. Die Daten deuten außerdem auf eine Interaktion der Polymorphismen mit dem -514 C>T SNP im LIPC-Gen der hepatischen Lipase in Bezug auf das Leberfett hin.

Die genauen Mechanismen sowie die Auswirkungen der Mutation bleiben nach wie vor unklar. Das USF-1 Gen mit seinen *usf1s1* (rs3737787) C>T und *usf1s2* (rs2073658) G>A Polymorphismen stellt damit ein wichtiges Gen dar, welches seinen Einfluss auf die Insulinsensitivität und den Typ 2 Diabetes über die Modulation von am Lipidmetabolismus beteiligten Genen ausübt und die Insulinresistenz über die Regulation der Lipolyse oder die ektopische Anhäufung von Fett in der Leber beeinflusst. Nun ist es daran, die aktuellen Ergebnisse in größeren epidemiologischen Studien zu replizieren.

5. Zusammenfassung

Vorangegangene Studien zur Rolle von USF-1 lassen eine große Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors im Lipid- und Glukosemetabolismus des Menschen mit entscheidendem Einfluss auf die Insulinresistenz vermuten. Bei dem USF-1-Gen handelt es sich um eines der wichtigsten derzeit bekannten Gene für die Familiäre Hypercholesterinämie (FHCL) [54,59,87]. Außerdem ist USF-1 stark mit Atherosklerose vergesellschaftet. Diese Beobachtungen konnten wiederholt in zahlreichen Kohorten mit FHCL [29, 54, 65] und anderen Dyslipidämien gemacht werden [17, 40, 69]. Sowohl die FHCL als auch die Atherosklerose korrelieren ihrerseits stark mit Lipolyse und Leberfett.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen untersucht, über die USF-1 zur Dyslipidämie und zur Atherosklerose beiträgt. Im Speziellen haben wir folgende Fragen bearbeitet.

Erstens: Da die *usf1s1* (rs3737787) C>T und *usf1s2* (rs2073658) G>A Polymorphismen des USF-1 Gens mit einer erhöhten in vitro katecholamin-induzierten Lipolyse in Adipozyten assoziiert sind, wurde untersucht, ob diese Polymorphismen auch einen Effekt auf die in vivo antilipolytische Wirkung des Insulins beim Menschen haben. Dazu bestimmte man die Abnahme der Konzentrationen an freien Fettsäuren während eines oralen Glukosetoleranztests in einer großen Kohorte von Testpersonen ohne Diabetes mellitus. Um die antilipolytische Wirkung des Insulin direkt zu erfassen, bestimmte man bei einem Teil der Probanden zusätzlich im Rahmen eines euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamps den Zusammenhang der Polymorphismen mit der Gesamtkörperinsulinsensitivität. Da USF-1 und USF-2 regulatorisch auf die Genexpression der Hormonsensitiven Lipase in Adipozyten wirken [64], untersuchte man deren SNPs auf eine Wechselwirkung mit dem -60C>G SNP des Gens der Hormonsensitiven Lipase in Hinblick auf die Lipolyse im Fettgewebe.

Zweitens: Da USF-Transkriptionsfaktoren die Expression des Hepatischen Lipase-Gens LIPC in der Leber kontrollieren und da der SNP -514C>T des Gens der Hepatischen Lipase (LIPC) bekannterweise mit der Akkumulation von Fett in der Leber assoziiert ist, untersuchte man die Polymorphismen usf1s1 und usf1s2 und deren Interaktionen mit dem -514 C>T Polymorphismus des LIPC-Genes auf ihren Einfluss auf Leberfettgehalt und Insulinsensitivität.

Es stellte sich heraus, dass Träger des T-Allels für usf1s1 und Träger des A-Allels für usf1s2 des USF-1 Gens empfindlicher für die antilipolytische Wirkung von Insulin sind als die Träger der häufigeren Allele C und G dieser Polymorphismen. Die Daten zum intrahepatischen Fettgehalt aus einer volumenselektiven Protonen-Magnetresonanz-Spektroskopie (¹H-MRS) deuten außerdem auf eine Interaktion der Polymorphismen mit dem -514 C>T SNP im LIPC-Gen der hepatischen Lipase bezüglich des intrahepatischen Fetts hin.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse somit nahe, dass das USF-1 Gen mit seinen usf1s1 (rs3737787) C>T und usf1s2 (rs2073658) G>A Polymorphismen ein wichtiges Gen darstellt, welches seinen Einfluss auf die Insulinsensitivität und den Typ 2 Diabetes über die Modulation von am Lipidmetabolismus beteiligten Genen ausübt und die Insulinresistenz über die Regulation der Lipolyse oder die ektopische Anhäufung von Fett in der Leber beeinflusst. Nun ist es daran, die von uns erhobenen Ergebnisse in größeren epidemiologischen Studien zu replizieren.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADIPOR1	Adiponektin Rezeptor 1
ADPN	Adiponutrin
ARDB	β-adrenerger Rezeptor
AU	arbitrary units
BMI	body mass index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Index der systemischen antilipolytischen Insulinsensitivität
FFS	Freie Fettsäuren
FHCL	Familiäre Hypercholesterinämie
FS	Fettsäuren
GIR	Glukoseinfusionsrate
GPR74	G-Protein gekoppelter Rezeptor 74
¹ H MRS	Protonen Magnetresonanz-Spektroskopie
HDL	high density lipoprotein
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IL	Interleukin
ISI	Insulinsensitivitätsindex
LDL	low density lipoprotein
LIPC	Hepatische Lipase Gen
M	Mittelwert
mGlc	mittlere Glukosekonzentration im OGTT
mIns	mittlerer Insulinkonzentration im OGTT
MR	Magnetresonanz
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease

Anhang

NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
PCR	polymerase chain reaction
PIC	Präinitiationskomplex
PPAR- γ	peroxisome proliferator activated receptor- γ
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
SFM	Standardfehler des Mittelwertes
SNP	Single nucleotide polymorphism
TLR4	toll-like receptor 4
TNF- β	tumor necrosis factor- β
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TULIP	Tübinger Lebensstil Interventionsprogramm
USF-1	Upstream-transcription factor 1
USF-2	Upstream-transcription factor 2
WHO	world health organisation
YSI	yellow spring instruments

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Normwerte des prozentualen Körperfettgehalts in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht	27
Tabelle 2:	Norm- und Grenzwerte BMI nach WHO [10].....	27
Tabelle 3:	Übersicht über die Parameter der Probanden der Gesamtpopulation	37
Tabelle 4:	Übersicht Probandendaten EC ₅₀	40
Tabelle 5:	Probandendaten Leberfettpopulation.....	44

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Volumenselektives Spektrum aus der Leber. Die Voxelposition ist im T1-gewichteten Turbo-Spin-Echo Tomogramm (links) eingezeichnet.	28
Abbildung 2	Assoziationen der Genotypen des usf1s2 (rs2073658) G>A Polymorphismus im USF-1 Gen mit EC ₅₀ (diejenige Insulinkonzentration, die eine halbmaximale Unterdrückung der Glycerolrate im Blut bewirkt) im dominanten Modell nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil.....	41
Abbildung 3	Assoziationen von Leberfett und Insulinsensitivität in der Leberfettpopulation nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und prozentualen Körperfettanteil	45
Abbildung 4	Assoziationen des -514 C>T SNP im LIPC-Gen mit dem Leberfett nach Anpassung für Alter, Geschlecht und prozentualen Körperfettanteil vor dem Hintergrund des usf1s2 (rs2073658) G>A Polymorphismus im USF-1 Gen.....	46

7. Literaturverzeichnis

1. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. Rev Gastroenterol Mex, 2005. **70 Suppl 3**: p. 52-6.
2. Arai, Y., Hirose, N., Yamamura, K., Nakazawa, S., Shimizu, K., Takayama, M., Ebihara, Y., Homma, S., Gondo, Y., Masui, Y., Inagaki, H., *Deficiency of cholesteryl ester transfer protein and gene polymorphisms of lipoprotein lipase and hepatic lipase are not associated with longevity*. J Mol Med, 2003. **81**(2): p. 102-9.
3. Arner, P., *Genetic variance and lipolysis regulation: implications for obesity*. Ann Med 2001. **33**(8): p. 542-6.
4. Arner, P., *The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(3): p. 137-45.
5. Arner, P., *Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 471-82.
6. Banerji, M.A., Faridi, N., Atluri, R., Chaiken, R. L., Lebovitz, H. E., *Body composition, visceral fat, leptin, and insulin resistance in Asian Indian men*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(1): p. 137-44.
7. Basu, A., Shah, P., Vella, A., Rizza, R. A., Jensen, M. D., *Systemic and regional free fatty acid metabolism in type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E1000-6.
8. Bavenholm, P.N., Pignon, J., Ostenson, C. G., Efendic, S., *Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1449-54.
9. Bensadoun, A. and D.E. Berryman, *Genetics and molecular biology of hepatic lipase*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(2): p. 77-81.
10. WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
11. Bjorntorp, P., *"Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes*. Arteriosclerosis, 1990. **10**(4): p. 493-6.
12. Boden, G., *Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM*. Diabetes, 1997. **46**(1): p. 3-10.
13. Bogardus, C., Lillioja, S., Nyomba, B. L., Zurlo, F., Swinburn, B., Esposito-Del Puente, A., Knowler, W. C., Ravussin, E., Mott, D. M., Bennett, P. H., *Distribution of in vivo insulin action in Pima Indians as mixture of three normal distributions*. Diabetes, 1989. **38**(11): p. 1423-32.
14. Botma, G.J., van Deursen, D., Vieira, D.van Hoek, M., H. Jansen and A.J. Verhoeven, *Sterol-regulatory-element binding protein inhibits upstream stimulatory factor-stimulated hepatic lipase gene expression*. Atherosclerosis, 2005. **179**(1): p. 61-7.

15. Brunt, E.M., *Nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2004. **24**(1): p. 3-20.
16. Carey, G.B., *Mechanisms regulating adipocyte lipolysis*. Adv Exp Med Biol, 1998. **441**: p. 157-70.
17. Casado, M., Vallet, V. S., A. Kahn and S. Vaulont, *Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2009-13.
18. Coon, H., Xin, Y., Hopkins, P. N., Cawthon, R. M., S.J. Hasstedt and S.C. Hunt, *Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides*. Hum Genet, 2005. **117**(5): p. 444-51.
19. Dahlman, I., Dicker, A., Jiao, H., Kere, J., Blomqvist, L., van Harmelen, V., Hoffstedt, J., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Hansen, T., Pedersen, O., M. Laakso and P. Arner, *A common haplotype in the G-protein-coupled receptor gene GPR74 is associated with leanness and increased lipolysis*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(6): p. 1115-24.
20. Deeb, S.S. and R. Peng, *The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity*. J Lipid Res, 2000. **41**(1): p. 155-8.
21. DeFronzo, R.A., *Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM*. Diabetes, 1988. **37**(6): p. 667-87.
22. Dowse GK, Z.P., *The prevalence and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Alberti KGMM, Mazze R. Frontiers in Diabetes Research: Current Trends in Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. Elsevier, 1989: p. 22.
23. Fan, J.G., Li, F., Cai, X. B., Peng, Y. D., Ao, Q. H., Gao, Y., *Effects of nonalcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(7): p. 1086-91.
24. Frayn, K.N., *The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1115-9.
25. Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B. A., I.A. Macdonald and S.W. Coppack, *Integrative physiology of human adipose tissue*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27**(8): p. 875-88.
26. Guerra, R., et al., *A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4532-7.
27. Guerra, R., Wang, J., S.M. Grundy and J.C. Cohen, *A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4532-7.
28. Guo, Z., Hensrud, D. D., Johnson, C. M. and M.D. Jensen, *Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes*. Diabetes, 1999. **48**(8): p. 1586-92.
29. Hoffstedt, J., Ryden, M., Wahrenberg, H., V. van Harmelen and P. Arner, *Upstream transcription factor-1 gene polymorphism is associated with*

- increased adipocyte lipolysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(9): p. 5356-60.
30. Hofmann, E., *Hormone und Stoffwechsel*, in *Medizinische Biochemie systematisch*. 2001, Uni-Med-Verlag, Bremen. p. 566-568.
 31. Holland, W.L., Knotts, T. A., Chavez, J. A., Wang, L. P., K.L. Hoehn and S.A. Summers, *Lipid mediators of insulin resistance*. Nutr Rev, 2007. **65**(6 Pt 2): p. S39-46.
 32. Holm, C., *Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1120-4.
 33. Iynedjian, P.B., *Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 3): p. 705-12.
 34. Jansen, H., Waterworth, D. M., Nicaud, V., Ehnholm, C., Talmud, P. J., *Interaction of the common apolipoprotein C-III (APOC3 -482C > T) and hepatic lipase (LIPC -514C > T) promoter variants affects glucose tolerance in young adults*. European Atherosclerosis Research Study II (EARS-II). Ann Hum Genet, 2001. **65**(Pt 3): p. 237-43.
 35. Jansen, P.L., *Non-alcoholic steatohepatitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004. **16**(11): p. 1079-85.
 36. Johansson, L.E., Hoffstedt, J., Parikh, H., Carlsson, E., Wabitsch, M., Bondeson, A. G., Hedenbro, J., Tornqvist, H., L. Groop and M. Ridderstrale, *Variation in the adiponutrin gene influences its expression and associates with obesity*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 826-33.
 37. Kelley, D.E., Mokan, M., Simoneau, J. A., Mandarino, L. J., *Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 91-8.
 38. Kim, J.K., *Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes*. Cell Metab, 2006. **4**(6): p. 417-9.
 39. King, H., R.E. Aubert and W.H. Herman, *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections*. Diabetes Care, 1998. **21**(9): p. 1414-31.
 40. Komulainen, K., Alanne, M., Auro, K., Kilpikari, R., Pajukanta, P., Saarela, J., Ellonen, P., Salminen, K., Kulathinal, S., Kuulasmaa, K., Silander, K., Salomaa, V., Perola, M., Peltonen, L., *Risk alleles of USF1 gene predict cardiovascular disease of women in two prospective studies*. PLoS Genet, 2006. **2**(5): p. e69.
 41. Lafontan, M.B., M. Stich, V. Crampes, F. Riviere, D., De Glisezinski, I., C. Sengenès and J. Galitzky, *Recent data on the regulation of lipolysis by catecholamines and natriuretic peptides*. Ann Endocrinol (Paris), 2002. **63**(2 Pt 1): p. 86-90.
 42. Lakka, H.M., Lakka, T. A., Tuomilehto, J. and J.T. Salonen, *Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men*. Eur Heart J, 2002. **23**(9): p. 706-13.
 43. Langin, D., S. Lucas and M. Lafontan, *Millennium fat-cell lipolysis reveals unsuspected novel tracks*. Horm Metab Res, 2000. **32**(11-12): p. 443-52.

44. Lapidus, L., Bengtsson, C., Larsson, B., Pennert, K., E. Rybo and L. Sjostrom, *Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6454): p. 1257-61.
45. Large, V., Peroni, O., Letexier, D., H. Ray and M. Beylot, *Metabolism of lipids in human white adipocyte*. Diabetes Metab, 2004. **30**(4): p. 294-309.
46. Laws, A., Hoen, H. M., Selby, J. V., Saad, M. F., S.M. Haffner and B.V. Howard, *Differences in insulin suppression of free fatty acid levels by gender and glucose tolerance status. Relation to plasma triglyceride and apolipoprotein B concentrations. Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(1): p. 64-71.
47. Lebovitz, H.E. and M.A. Banerji, *Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance*. Diabetes Care, 2005. **28**(9): p. 2322-5.
48. Löffler G, K.M., Häring HU, *Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation*, in *Biochemie und Pathobiochemie*, P.P. Löffler G, Editor. 2003, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. p. 838-864.
49. Longo, R., et al., *Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis*. J Magn Reson Imaging, 1995. **5**(3): p. 281-5.
50. Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., G. Forlani and N. Melchionda, *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 450-5.
51. Matsuda, M. and R.A. DeFronzo, *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp*. Diabetes Care, 1999. **22**(9): p. 1462-70.
52. Mehnert, H., Sewering, H., W. Reichstein and H. Vogt, *[Early detection of diabetics in Munich 1967-68]*. Dtsch Med Wochenschr, 1968. **93**(43): p. 2044-50.
53. Müller, *Transcription factors: global and detailed views*. 26-32. Current opinion in structural biology, 2001 Feb. **11**(1): p. 7.
54. Naukkarinen, J., Gentile, M., Soro-Paavonen, A., Saarela, J., Koistinen, H. A., Pajukanta, P., M.R. Taskinen and L. Peltonen, *USF1 and dyslipidemias: converging evidence for a functional intronic variant*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(17): p. 2595-605.
55. Nguyen-Duy, T.B., Nichaman, M. Z., Church, T. S., S.N. Blair and R. Ross, *Visceral fat and liver fat are independent predictors of metabolic risk factors in men*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(6): p. E1065-71.

56. Nguyen, T.T., Mijares, A. H., Johnson, C. M. and M.D. Jensen, *Postprandial leg and splanchnic fatty acid metabolism in nonobese men and women*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 1): p. E965-72.
57. O'Rahilly, S., Spivey, R. S., Holman, R. R., Nugent, Z., A. Clark and R.C. Turner, *Type II diabetes of early onset: a distinct clinical and genetic syndrome?* Br Med J (Clin Res Ed), 1987. **294**(6577): p. 923-8.
58. Oh, W., Abu-Elheiga, L., Kordari, P., Gu, Z., Shaikenov, T., S.S. Chirala and S.J. Wakil, *Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1384-9.
59. Pajukanta, P., Lilja, H. E., Sinsheimer, J. S., Cantor, R. M., Lusi, A. J., Gentile, M., Duan, X. J., Soro-Paavonen, A., Naukkarinen, J., Saarela, J., Laakso, M., Ehnholm, C., M.R. Taskinen and L. Peltonen, *Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1)*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 371-6.
60. Pastier, D., Lacorte, J. M., Chambaz, J., P. Cardot and A. Ribeiro, *Two initiator-like elements are required for the combined activation of the human apolipoprotein C-III promoter by upstream stimulatory factor and hepatic nuclear factor-4*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15199-206.
61. Pfeiffer, *Statik und Dynamik der Insulinsekretion bei Diabetes. Protodiabetes und Adipositas*, in *Handbuch des Diabetes mellitus*, E.F. Pfeiffer, Editor. 1979, Lehmann: München
62. Pietilainen, K.H., Rissanen, A., Kaprio, J., Makimattila, S., Hakkinen, A. M., Westerbacka, J., Sutinen, J., S. Vehkavaara and H. Yki-Jarvinen, *Acquired obesity is associated with increased liver fat, intra-abdominal fat, and insulin resistance in young adult monozygotic twins*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(4): p. E768-74.
63. Pihlajamaki, J., Karjalainen, L., Karhapaa, P., Vauhkonen, I., Taskinen, M. R., S.S. Deeb and M. Laakso, *G-250A substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(7): p. 1789-95.
64. Putt, W., et al., *Variation in USF1 shows haplotype effects, gene : gene and gene : environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(15): p. 1587-97.
65. Putt, W., Palmen, J., Nicaud, V., Tregouet, D. A., Tahri-Daizadeh, N., Flavell, D. M., Humphries, S. E. and P.J. Talmud, *Variation in USF1 shows haplotype effects, gene : gene and gene : environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(15): p. 1587-97.

66. Rebrin, K., Steil, G. M., S.D. Mittelman and R.N. Bergman, *Causal linkage between insulin suppression of lipolysis and suppression of liver glucose output in dogs*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 741-9.
67. Rendell, M., Hulthen, U. L., Tornquist, C., L. Groop and I. Mattiasson, *Relationship between abdominal fat compartments and glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 744-9.
68. Reynisdottir, S., Eriksson, M., B. Angelin and P. Arner, *Impaired activation of adipocyte lipolysis in familial combined hyperlipidemia*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2161-9.
69. Ribeiro, A., Pastier, D., Kardassis, D., J. Chambaz and P. Cardot, *Cooperative binding of upstream stimulatory factor and hepatic nuclear factor 4 drives the transcription of the human apolipoprotein A-II gene*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1216-25.
70. Roust, L.R. and M.D. Jensen, *Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity*. Diabetes, 1993. **42**(11): p. 1567-73.
71. Santamarina-Fojo, S., C. Haudenschild and M. Amar, *The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1998. **9**(3): p. 211-9.
72. Shuldiner, A.R., N. Hoppman and T.I. Pollin, *Hepatic lipase genotype, diabetes risk, and implications for preventative medicine*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2015-8.
73. Smih, F., Rouet, P., Lucas, S., Mairal, A., Sengenès, C., Lafontan, M., Vaulont, S., M. Casado and D. Langin, *Transcriptional regulation of adipocyte hormone-sensitive lipase by glucose*. Diabetes, 2002. **51**(2): p. 293-300.
74. Stefan, N., et al., *Liver fat and insulin resistance are independently associated with the -514C>T polymorphism of the hepatic lipase gene*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 4238-43.
75. Stefan, N., Hennige, A. M., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Krober, S. M., Machicao, F., A. Fritsche and H.U. Haring, *Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans*. Diabetes Care, 2006. **29**(4): p. 853-7.
76. Stefan, N., Machann, J., Schick, F., Claussen, C. D., Thamer, C., A. Fritsche and H.U. Haring, *New imaging techniques of fat, muscle and liver within the context of determining insulin sensitivity*. Horm Res, 2005. **64 Suppl 3**: p. 38-44.
77. Stefan, N., Machicao, F., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Tschritter, O., Spieth, C., Weigert, C., Fritsche, A., M. Stumvoll and H.U. Haring, *Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat*. Diabetologia, 2005. **48**(11): p. 2282-91.
78. Stumvoll, M., Wahl, H. G., Loblein, K., Becker, R., Machicao, F., S. Jacob and H. Haring, *Pro12Ala polymorphism in the peroxisome*

- proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with increased antilipolytic insulin sensitivity.* Diabetes, 2001. **50**(4): p. 876-81.
79. Sumner, A.E., Farmer, N. M., Tulloch-Reid, M. K., Sebring, N. G., Yanovski, J. A., Reynolds, J. C., R.C. Boston and A. Premkumar, *Sex differences in visceral adipose tissue volume among African Americans.* Am J Clin Nutr, 2002. **76**(5): p. 975-9.
80. Szczepaniak, L.S., Babcock, E. E., Schick, F., Dobbins, R. L., Garg, A., Burns, D. K., J.D. McGarry and D.T. Stein, *Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo.* Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. E977-89.
81. Tahvanainen, E., et al., *Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. The LOCAT Study Investigators.* J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 956-60.
82. Tan, G.D., Goossens, G. H., Humphreys, S. M., H. Vidal and F. Karpe, *Upper and lower body adipose tissue function: a direct comparison of fat mobilization in humans.* Obes Res, 2004. **12**(1): p. 114-8.
83. Thamer, C., Machann, J., Haap, M., Bachmann, O., Wietek, B., Dahl, D., Tschritter, O., Fritsche, A., Jacob, S., Schick, F., M. Stumvoll and H. Haring, *[Reduced insulin effect in subclinical fatty liver].* Dtsch Med Wochenschr, 2004. **129**(16): p. 872-5.
84. Thomsen, C., et al., *Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy.* Magn Reson Imaging, 1994. **12**(3): p. 487-95.
85. Todorova, B., et al., *The G-250A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene predicts the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes mellitus: the Finnish Diabetes Prevention Study.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2019-23.
86. Tokushige, K., Takakura, M., Tsuchiya-Matsushita, N., Taniyai, M., E. Hashimoto and K. Shiratori, *Influence of TNF gene polymorphisms in Japanese patients with NASH and simple steatosis.* J Hepatol, 2007. **46**(6): p. 1104-10.
87. Travers, M.T., Vallance, A. J., Gourlay, H. T., Gill, C. A., Klein, I., C.B. Bottema and M.C. Barber, *Promoter 1 of the ovine acetyl-CoA carboxylase-alpha gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes.* Biochem J, 2001. **359**(Pt 2): p. 273-84.
88. Tregouet, D.A., Escolano, S., Tiret, L., A. Mallet and J.L. Golmard, *A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm.* Ann Hum Genet, 2004. **68**(Pt 2): p. 165-77.
89. Vallet, V.S., Casado, M., Henrion, A. A., Bucchini, D., Raymondjean, M., A. Kahn and S. Vaulont, *Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose.* J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20175-9.

90. Wajchenberg, B.L., Giannella-Neto, D., M.E. da Silva and R.F. Santos, *Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome*. Horm Metab Res, 2002. **34**(11-12): p. 616-21.
91. Wikipedia-Autoren. *Artikel Transkriptionsfaktor*. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie 2007 [cited 2007 7. September 2007, 10:03 UTC]; Available from: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Transkriptionsfaktor&oldid=33951472>.
92. Wyne, K.L., *Free fatty acids and type 2 diabetes mellitus*. Am J Med, 2003. **115 Suppl 8A**: p. 29S-36S.
93. Yang, H., Li, Y. Y., Nie, Y. Q., Zhou, Y. J., Du, Y. L., W.H. Sha and Y. Hong, *[The relationship between insulin resistance and adiponectin gene expression in nonalcoholic fatty liver disease.]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2007. **15**(7): p. 525-8.
94. Yu, A.S. and E.B. Keeffe, *Nonalcoholic fatty liver disease*. Rev Gastroenterol Disord, 2002. **2**(1): p. 11-9.
95. Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., A. Hermetter and R. Zechner, *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.
96. Zimmet, P., K.G. Alberti and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
97. Zimmet P, F.C., Dowse G *The Epidemiology of Diabetes Mellitus*, in *The Diabetes Annual* K.L. Alberti KGMM, eds., Editor. 1990, Elsevier: Amsterdam. p. 20.

8. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Privatdozent Dr. N. Stefan und Professor Dr. A. Fritsche für ihr Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit.

Vielen herzlichen Dank auch an Dr. med. S. Schäfer, Dr. med. K. Kantartzis sowie Dr. med. O. Tschritter für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei allen Problemen und Fragestellungen.

Herzlichen Dank auch an A. Buri und H. Luz für die Einarbeitung und die angenehme Zusammenarbeit bei der Durchführung der Clamps.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Probanden, die durch ihre bereitwillige Teilnahme an den Versuchen die Durchführung dieser Studie ermöglichten.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern für ihre Liebe und Fürsorge und dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lena Mareike Wölfle
Geburtsdatum	18.07.1982
Geburtsort	Ulm (Donau)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1988-1992	Grundschule Ehingen-Rißtissen
1992-1999	Carl-Laemmle-Gymnasium Laupheim
1999-2000	North Cross Highschool, Roanoke, VA, USA
2000-2002	Carl-Laemmle-Gymnasium Laupheim
Juni 2002	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Seit Oktober 2002	Medizinstudium an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
September 2004	Ärztliche Vorprüfung
WS 2006/2007	Studium der Medizin an der Université Pierre et Marie Curie, Paris, Frankreich
WS 2004- SS 2007	Famulaturen in Kardiologie, Gynäkologie, Psychiatrie, Allgemeinmedizin, Nephrologie und Anästhesiologie
2008 - 2009	Praktisches Jahr am Klinikum Friedrichshafen
13. Mai 2009	Ärztliche Prüfung