

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

**Auswirkungen des Gly972Arg-Polymorphismus im
Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) auf die
Insulinsensitivität des zentralen Nervensystems**

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

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

vorgelegt von

Benjamin Klösel

aus

Offenbach am Main

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Fritsche

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Zipfel

Widmung

Meinen Eltern
für Ihre Geduld und Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Diabetes mellitus Typ 2, Epidemiologie, Pathophysiologie und Verlauf.....	2
1.2	Insulin, Insulinrezeptoren und Signaltransduktionskaskade.....	4
1.3	IRS-1 Polymorphismus.....	7
1.4	Insulinwirkung am ZNS.....	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Versuchspersonen.....	14
2.2	Experimentdesign.....	15
2.2.1	Vorbereitung.....	15
2.2.2	Clamp – Ablauf und Messung.....	16
2.2.3	MEG – Ablauf und Messung.....	19
2.3	Darbietung der visuellen und akustischen Stimuli.....	20
2.4	Auswertung der gewonnenen MEG-Daten.....	22
2.5	Verarbeitung der gewonnenen Blutproben.....	22
2.6	Genetik.....	23
2.7	Fragebögen.....	23
2.8	Statistik.....	25
3	Ergebnisse	26
3.1	MEG-Daten.....	26
3.2	Metabolische Parameter.....	29
3.3	Fragebögen.....	35
4	Diskussion	37
5	Zusammenfassung	43
	Literaturverzeichnis	45
	Abkürzungsverzeichnis	52
	Danksagung	55
	Lebenslauf	56

EINLEITUNG

1.1 Diabetes mellitus Typ 2, Epidemiologie, Pathophysiologie und Verlauf

Diabetes mellitus ist eine multifaktorielle, chronische Erkrankung, die von der WHO in Diabetes mellitus Typ 1, Typ 2 und Gestationsdiabetes unterteilt wird. Während Diabetes mellitus Typ 1 durch einen Untergang von insulinsynthetisierenden Pankreas-Inselzellen bedingt ist, spielt bei Diabetes mellitus Typ 2 eine ineffektive Verwertung des Insulins durch den Körper eine Rolle. Gestationsdiabetes ist eine Sonderform bei schwangeren Frauen. Diese Frauen haben vor der Schwangerschaft normale Blutzuckerverhältnisse und entwickeln erst während der Schwangerschaft eine Insulinresistenz, die sich in den meisten Fällen postpartal wieder normalisiert (WHO, 2009).

Diabetes mellitus ist eine bedeutende Erkrankung im 21. Jahrhundert. Nach Schätzungen der WHO leiden 180 Millionen Menschen weltweit an Diabetes und es wird erwartet, dass sich diese Zahl bis zum Jahr 2030 mehr als verdoppelt (WHO, 2008). In Deutschland wird die Prävalenz auf Basis von verschiedenen Studien auf etwa 8% angegeben (Giani et al., 2005). Eine weitere Problematik schlägt sich auf die Gesundheitsausgaben nieder. Allein in Deutschland werden die direkten und indirekten Gesamtkosten für die Behandlung der etwa 6 Millionen Diabetiker auf rund 60 Mrd. Euro jährlich hochgerechnet. Davon entfällt etwa $\frac{1}{4}$ auf die Behandlung der Grundkrankheit und $\frac{3}{4}$ auf die Behandlung der Komplikationen (Hauner, 2006).

Pathogenetisch spielen beim Diabetes mellitus Typ 2 vor allem zwei Faktoren eine wichtige Rolle, nämlich der β -Zell-Defekt des Pankreas und die Insulinresistenz von Zielorganen. Der β -Zell-Defekt des Pankreas manifestiert sich unter anderem durch Veränderungen im Bereich der pulsatilen Insulinsekretion. Es findet sich eine Abflachung der sekretorischen Peaks, das Ausbleiben der ersten Phase der physiologisch biphasischen Insulinsekretion und eine Reduktion der zweiten Phase, die zudem verzögert eintritt. Eine weitere Ver-

änderung betrifft die quantitative Insulinsekretion, welche beim Typ 2 Diabetiker reduziert ist und im Krankheitsverlauf weiter abnimmt. Als Erklärung werden hierfür β -Zell-Schädigungen durch diverse Faktoren wie Glykotoxizität, Lipotoxizität, Glykosylierung durch erhöhten Blutzuckerspiegel, sowie freie Sauerstoffradikale diskutiert (Swidan and Montgomery, 1998; Nishikawa et al., 2000; Chung et al., 2003; Pratley, 2006).

Im Bereich der Insulinresistenz von Zielorganen nehmen Skelettmuskulatur und Leber eine wichtige Stellung ein. Hauptmerkmale der Insulinresistenz dieser beiden Organe sind eine verminderte Reduktion der Glukoseproduktion (Leber) sowie eine verminderte Stimulation der peripheren Glukoseutilisation (Skelettmuskulatur) durch Insulin. Entscheidend hierbei ist nicht eine quantitative Veränderung der Insulinrezeptoren, sondern ein Defekt in der Insulinsignaltransduktionskaskade (Virally et al., 2007). Als Auslöser dieser Störungen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Zum einen kommt es durch die exzessive Sekretion von freien Fettsäuren zur intrazellulären Akkumulation von Lipiden, die über Stimulierung der PKC eine Phosphorylierung von IRS induzieren, welche die Insulinsignaltransduktionskaskade hemmt. Zum anderen besteht die Hypothese, dass die verstärkte Ausschüttung von Adiponektinen (TNF- α , IL-6, Resistin) durch das Fettgewebe über ihre insulinantagonistische Wirkung eine Insulinresistenz hervorrufen (Bonadonna, 2004; Virally et al., 2007).

Obwohl diese beiden Faktoren als pathogenetisch am wichtigsten anzunehmen sind, kommt es beim Typ 2 Diabetiker zu weiteren Dysregulationen im Hormonhaushalt. So wurden beispielsweise beim Glukagon erhöhte Blutspiegel im Nüchternzustand sowie eine abgeschwächte Suppression nach einer Mahlzeit festgestellt. Bei den Inkretinen (GLP-1 und GIP), welche normalerweise nach Nahrungsaufnahme vermehrt sezerniert und am Pankreas eine erhöhte Insulinausschüttung bewirken, kommt es bei Typ 2 Diabetes auch zu einer Reduktion der Sekretion und damit der zirkulierenden Hormonkonzentration (Pratley, 2006).

Im Gegensatz zu Typ 1 Diabetes, der sich klassischerweise in jungen Jahren durch ein ketoazidotisches Koma manifestiert, verläuft Typ 2 Diabetes schleichend. Oft beginnen die Prozesse der Insulinresistenz und Sekretionsdefekten der β -Zellen Jahre bevor Symptome auftreten oder ein erhöhter BZ erkannt wird. Im Verlauf ist der Typ 2 Diabetes durch eine chronische, fortschreitende Beeinträchtigung verschiedener Organsysteme gekennzeichnet. Die Hauptrolle hierbei spielt eine hyperglykämiebedingte Schädigung des vaskulären Systems, woraus sich die diabetestypischen Spätfolgen wie KHK, Myokardinfarkte, zerebrovaskuläre Attacken, Retinopathien, Nephropathien, pAVK, diabetische Fußulcera und Neuropathien ergeben (Campbell, 2000).

1.2 Insulin, Insulinrezeptoren und Signaltransduktionskaskade

Insulin gilt als das wichtigste Hormon des Intermediärstoffwechsels. Es besitzt eine modulierende Wirkung auf den Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel. Insulin, dessen genetische Information auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert ist, wird als Proteohormon in den β -Zellen des Pankreas (Langerhans'schen Inseln) als Präpro-Insulin (bestehend aus Signalpeptid, B-Kette mit 30 Aminosäuren, C-Peptid und A-Kette mit 21 Aminosäuren) produziert und nachfolgend im rauen endoplasmatischen Retikulum durch Abspaltung des Signalpeptids zu Pro-Insulin und schließlich im Golgi-Apparat durch Abspaltung des C-Peptids zu Insulin modifiziert. Die Speicherung erfolgt in Vesikeln, die neben dem Insulin gleiche Mengen von C-Peptid enthalten. Es erfolgt somit eine äquimolare Sekretion beider Produkte. Eine gesunde Person speichert etwa 150-250 I.E. Insulin im Pankreas wovon pro Tag ca. 20-40 I.E. ins Blut sezerniert werden. Die Sekretion wird über einen ATP-abhängigen Kalium-Kanal im Pankreas gesteuert: Bei vermehrtem Eintritt von Glukose in die Zelle (vermittelt über GLUT2, ein konzentrationsabhängiger Glukose-Transporter) kommt es zuerst zur Phosphorylierung der Glukose durch das Enzym Glukokinase. Das Produkt, Glukose-6-Phosphat, wird dann in die Glykolyse eingeschleust. ATP wird produziert, was zu einer Änderung des ADP/ATP-

Verhältnis zugunsten des ATP führt. Diese Änderung bewirkt eine Aktivierung des Sulfonylharnstoff-1-Rezeptor (SUR1), der eine Schließung benachbarter Kalium-Kanäle (potassium inward rectifier, KIR) auslöst und damit die Membran depolarisiert (Stumvoll et al., 2005). Der konsekutive Calcium-Einstrom bewirkt über Calmodulin eine Exozytose der Speichervesikel und damit die Freisetzung des Insulins (Rajan et al., 1990). Der Abbau von Insulin findet größtenteils in Leber und Niere durch Proteolyse statt. Ein geringer Teil wird auch in peripheren Geweben abgebaut.

Insulin wirkt als anaboles Hormon und hat weitreichende Auswirkungen auf alle wichtigen Stoffwechsellvorgänge. Im Bereich des Kohlenhydratstoffwechsels bewirkt es eine Translokation von GLUT4-Transportern aus dem Zellinneren an die Zellmembran, damit verbunden eine erhöhte Aufnahme von Glukose (in insulinabhängigen Geweben wie Muskeln und Fettzellen), Steigerung der Glykolyse über Aktivierung des Enzyms Hexokinase und Glukokinase in der Leber (damit verbunden ein Glukose-Trapping in der Zelle), Steigerung der Glykogensynthese und Steigerung der Glykolyse. Weiterhin werden Glukoneogenese und Glykogenolyse (Inhibition der Glukose-6-Phosphatase) gehemmt. Im Bereich des Proteinstoffwechsels kommt es zur Stimulation der Aminosäuresynthese in den Zellen sowie dem Transport von Aminosäuren aus dem Blut ins Zellinnere. Die Proteolyse wird gehemmt. Im Lipidstoffwechsel kommt es durch eine Stimulation der Lipoproteinlipaseaktivität zur Bereitstellung von freien Fettsäuren, die von Adipozyten (ebenfalls durch Insulin stimuliert) zur Triglyzeridsynthese genutzt werden. In der Leber kommt es zur Steigerung der Fettsäuresynthese. Lipolyse, Ketogenese und Fettsäureoxidation werden durch Inhibition der intrazellulären Lipase gehemmt. Auch der Elektrolythaushalt wird durch Insulin beeinflusst. Insulin erhöht bei vielen Zellen die Plasmamembranpermeabilität für Kalium-, Magnesium- und Phosphat-Ionen. Zusätzlich aktiviert Insulin die Na^+/K^+ -ATPase. Während Insulin eine Sonderstellung als einziges Hormon mit BZ-senkender Wirkung einnimmt und damit ein Mangel oder ein kompletter Verlust nicht kompensiert werden kann, gibt es auf der Gegenregulationsseite eine größere Anzahl von Hormonen mit BZ-steigernder Wirkung.

Hierzu gehören Glukagon (aus den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas), Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin (aus dem Nebennierenmark und den Ganglien des sympathischen Nervensystems) und Wachstumshormon (GH, aus der Leber). Die Signaltransduktion dieser Hormone wird über Bindung an einen extrazellulären Rezeptor mit Aktivierung der Adenylatcyclase, Ansteigen des cAMP und Aktivierung einer Proteinkinase erreicht, die im weiteren Verlauf andere Proteine und Enzyme durch Phosphorylierung aktivieren kann (Pickup, 2002).

Der Insulinrezeptor wird von einem auf Chromosom 19p13.2-19p13.2 liegenden Gen codiert und beinhaltet 22 Exons. Er ist ein Tetramer bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Während die α -Untereinheiten der Zelle außen aufsitzen, ragen die β -Untereinheiten als Transmembranproteine in die Zelle hinein und besitzen am Ende eine Tyrosinkinase- und eine ATP-Bindungsdomäne. Im Ruhezustand übt die α -Untereinheit eine inhibitorische Wirkung auf die β -Untereinheit aus. Kommt es zur Bindung von Insulin an die α -Untereinheit führt eine Konformationsänderung zur Ausschaltung der inhibitorischen Komponente und damit zur Aktivierung der in der β -Untereinheit lokalisierten Tyrosinkinase. Die nun folgende Autophosphorylierung ermöglicht die Bindung von IRS-1, das über 10 potentielle Phosphorylierungsstellen verfügt und als Andockprotein fungiert. Nachdem das gebundene IRS-1 am Tyrosinrest phosphoryliert wurde, kann es PI3K binden, die über weitere Phosphorylierungsmechanismen eine GLUT-4-Translokation sowie über Phosphorylierung von PI4,5P zu PI3,4,5P mit Aktivierung einer PKB eine Aktivierung von Glykolyse und Glykogensynthese bewirken (Sun et al., 1991). Über IRS-1 findet auch eine Proliferationsstimulation durch die GRB2-SOS-RAS-MAPK-Kaskade statt. Prinzipiell lässt sich die weitere Signaltransduktion grob in das Schema a) akute metabolische Effekte (vermittelt durch den IRS PI3K-PI3K-abhängigen Kinasen-Pfad) und b) längerfristige Wachstums- und Proliferationseffekte (vermittelt durch den Ras-MAP-Kinase-Pfad) gliedern, obwohl dies natürlich eine starke Vereinfachung eines komplizierten und vernetzten Systems ist (Nandi et al., 2004).

1.3 IRS-1 Polymorphismus

IRS-1 gehört zu einer Familie von Proteinen, die als Teil der Insulinsignaltransduktionskaskade die Insulinwirkung modulieren. Sie wirken als Andockproteine zwischen dem Insulinrezeptor und einer Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionsproteinen, die Src homology 2 Domänen beinhalten. Bisher wurden vier verschiedene IRS-Typen charakterisiert, die sich in Gewebeverteilung, Lokalisation, Expression, Insulinrezeptorbindungseigenschaften sowie Interaktion mit den SH2-Domänen Proteinen unterscheiden (Sesti et al., 2001). Tab. 1 zeigt eine Übersicht wichtiger Merkmale der verschiedenen IRS-Typen.

IRS	Chromosom	Tyrosinphosphorylierungsstellen	Hauptwirkort
1	2q36-37	21	Skelettmuskel
2	13q34	22	Leber, Beta-Zellen
3	Telomerregion (nur Maus)	13	Redundant
4	X-Chromosom	12	Redundant, Reproduktionsorgane

Tab. 1: Übersicht der verschiedenen IRS-Typen

Um festzustellen, welche Auswirkungen der Verlust eines oder mehrerer IRS-Gene hat, wurden Experimente mit Knockout-Mäusen durchgeführt, bei denen durch Genmodifikation die Informationen für den jeweils zu untersuchenden Rezeptor-Typ ausgeschaltet wurden. Tab. 2 listet verschiedene Knockout-Kombinationen und deren phänotypische Effekte auf.

Der häufigste IRS-1-Polymorphismus (Prävalenz ca. 13%) beinhaltet einen Austausch von Glycin gegen Arginin im Codon 972. Verschiedene Studien haben sich bereits mit den Auswirkungen befasst, die eine Aminosäuresequenzänderung im IRS-1-Gen bewirkt. Eine Studie über IRS-1 in Muskel-

IRS-Knockout bei Mäusen	Effekt
1	Intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung Milde Insulinresistenz ohne Diabetes beeinträchtigte Insulinsekretion aus Beta-Zellen
2	Insulinresistenz mit Diabetes Störungen Beta-Zell Wachstum verstärkte Beta-Zell Apoptose
3	keine phänotypischen Auswirkungen (möglicherweise wegen Kompensation durch IRS-1) ! keine Expression von IRS-3 in menschlichen Zellen
4	Wachstumsretardierung milde Insulinresistenz ohne Diabetes Störungen des Reproduktionssystems
1 + 2	Tod des Mäuseembryos
1 + 3	Lipoatrophie
1 + 4	Wachstumsretardierung Insulinresistenz ohne Diabetes

Tab. 2: Effekte von IRS-Knockout-Versuchen bei Mäusen

zellen berichtet über eine Beeinträchtigung des IRS1-PI3-Kinase-Akt GSK-3 Weges mit konsekutiver Störung der GLUT-4-Translokation und damit dem Glukosetransport, sowie verminderter Glykogensynthese (Hribal et al., 2000). Weiterhin berichten andere Studien über einen verminderten Insulininhalt (Marchetti et al., 2002) sowie eine verminderte Insulinsekretion im Pankreas bei vorhandenem IRS-1 Polymorphismus mit erniedrigten Spiegeln des C-Peptids und des zirkulierenden Insulinvolumens (Stumvoll et al., 2001; Stumvoll et al., 2002). Dies beruht auf einer verminderten Antwort der β -Zellen auf sekretionsfördernde Stimuli wie Glukose, GLP-1 und Arginin (Stumvoll et al., 2001). Eine elektronenmikroskopische Studie weist darauf hin, dass β -Zellen der Pankreas mit IRS-1 Polymorphismus einen verminderten Gehalt an reifen sekretorischen

Granula aufweisen - als mögliche Erklärung wird angegeben, dass die PDX-1 DNA-Bindungsaktivität und die Insulin Promotoraktivität über einen Signalweg stimuliert werden, der die PI3K beinhaltet, die bei Vorliegen des IRS-1 Polymorphismus schlechter aktiviert werden kann (Marchetti et al., 2002). Die molekularbiologische Erklärung für dieses Verhalten wird kontrovers diskutiert. Eine Studie berichtet über eine Signaltransduktionsabschwächung durch verminderte Phosphorylierung der Gly972Arg-Variante des IRS-1 im Gegensatz zum Wildtyp sowie einer Wirkung des IRS-1 als kompetitiver Inhibitor der Insulinrezeptorautophosphorylierung (McGettrick et al., 2005), während eine andere Studien eine verminderte Bindung des p84 Subunits der PI3K und damit eine Abschwächung der Transduktion auf dieser Ebene angibt (Porzio et al., 1999). Die Frage, die Wissenschaftler seit einiger Zeit beschäftigt ist, ob dieser IRS-1 Polymorphismus einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz oder einem Sekretionsdefekt der β -Zellen im Pankreas hat und somit zur Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 beiträgt - während dies für andere Genvariationen, wie zum Beispiel den P12A Polymorphismus im PPAR γ (Altshuler et al., 2000; Douglas et al., 2001; Mori et al., 2001; Ardlie et al., 2002; Memisoglu et al., 2003), den E23K Polymorphismus im ATP-sensitiven Kaliumkanal Kir6.2 (Barroso et al., 2003; Gloyn et al., 2003; Nielsen et al., 2003; Florez et al., 2004a) und SNP-44 in CAPN10 (Weedon et al., 2003; Song et al., 2004) mittels mehrere Studien konsistent reproduziert wurde, gibt es für den IRS Polymorphismus noch keine eindeutigen Daten. Einige Studien postulieren für Träger des IRS-1 Polymorphismus ein erhöhtes Risiko an Typ 2 Diabetes mellitus zu erkranken (Jellema et al., 2003). Neuere Meta-Analysen mit größeren Fallzahlen konnten diesen Zusammenhang zum Teil nicht bestätigen oder zumindest abschwächen (Florez et al., 2004b). Allerdings besteht bis jetzt kein Konsens, und Wissenschaftler weisen darauf hin, dass eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus und Krankheitsentstehung genauer untersucht werden müssen.

1.4 Insulinwirkung am ZNS

Eine lange Zeit wurde angenommen, dass Versorgung und Funktionen des Gehirns absolut unabhängig von Insulin ablaufen würden. Ausgelöst durch Studien im Jahr 1978, in denen zum einen Insulin und zum anderen Insulinrezeptoren im Gehirn von Ratten nachgewiesen wurden (Havrankova et al., 1978a; Havrankova et al., 1978b; Pansky and Hatfield, 1978; Baskin et al., 1988) fand in den Jahren danach durch neugewonnene Erkenntnisse ein Paradigmenwechsel statt. Obwohl durch einige Studien dokumentiert wurde, dass Insulin im Gehirn keine (Eastman et al., 1990; Cranston et al., 1998; Hasselbalch et al., 1999), oder möglicherweise höchstens eine, durch die Basalkonzentration beeinflusste, permissive Funktion im Bereich des Glukose-Transports übernimmt (Bingham et al., 2002), existieren starke Hinweise, dass sich die Insulinwirkung am zentralen Nervensystem mehr in den Bereichen Energiehomöostase, Kognition, Nahrungsaufnahme und Reproduktion manifestiert. Fehlfunktionen in diesen Regelkreisläufen sollen daher maßgeblich an der Entstehung von Stoffwechsel- und Nervensystem-Erkrankungen beteiligt sind (Kern et al., 2001; Gerozissis, 2003).

Eine Frage, die es zu beantworten gilt ist, woher das im ZNS gefundene Insulin stammt. Eine Hypothese besagt, dass das Insulin von peripher (also pankreatisches, im Gefäßsystem zirkulierendes Insulin) über Transportmechanismen in das ZNS gebracht wird. Dabei wurde in Studien ein aktiver transendothelialer Transportmechanismus durch die Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen (King and Johnson, 1985; Banks et al., 1997), der für Insulin spezifisch zu sein scheint (Banks and Kastin, 1998). Eine andere Vermutung besagt, dass Insulin zuerst in die interstitielle Flüssigkeit des Gehirns und danach in den Liquor diffundiert (Baura et al., 1993). Diese Theorie unterstützend ist eine Untersuchung, bei der die Konzentration von Insulin im Liquor und Gehirn als Reaktion auf eine Erhöhung des peripheren Insulins sofort ansteigt (Wallum et al., 1987). Die Möglichkeit, dass Insulin durch bestimmte Neurone im ZNS selbst gebildet wird, ist widersprüchlich. Während einige Studien mRNA in Neuronen neonataler

Kaninchen und neuronalen Zellkulturen nachweisen konnten, ist der gleiche Nachweis an adulten Neuronen nicht besonders überzeugend gelungen. Eine Studie weist auf die möglicherweise unzureichende Spezifität der Nachweismethoden hin. Weiterhin wurden zwischen verschiedenen Spezies Unterschiede gefunden - so ließ sich bei adulten Ratten im ZNS keine Synthese von Insulin nachweisen, während dies bei adulten Kaninchen gelang (Park, 2001).

Insulinrezeptoren sind im ZNS an Astrozyten und Neuronen vorhanden (Abbott et al., 1999). Radioautographische Markierungsstudien an Rattengehirnen zeigten eine hohe Insulinrezeptordichte in den Bereichen Hypothalamus, Plexus choroideus, Bulbus olfactorius, zerebraler und zerebellärer Kortex, Amygdala und Septumregion (Broer et al., 1987). Interessant dabei ist, dass sich der Insulinrezeptor des Gehirnes von den peripheren Insulinrezeptoren in Größe (α -Untereinheit des Rezeptors im Gehirn ist kleiner), Glykosylierungszustand (elektrophoretische Mobilität des peripheren Rezeptors ist Neuraminidase-sensitiv) und Insulinbindungskinetik (bei Rezeptoren des Gehirns ist keine negative Kooperativität vorhanden) unterscheidet.

Bereits früh wurde Insulin eine Rolle als Wachstumsfaktor im sich entwickelnden Gehirn zugesprochen. In verschiedenen Experimenten konnte man eine Steigerung der Proteosynthese nach Insulinapplikation beobachtet (Heidenreich and Toledo, 1989a, b). Unbestritten ist heutzutage die positive Wirkung von Insulin auf Gedächtnisleistungen, die in verschiedene Studien wie z.B. die Insulinwirkung bei passiven Vermeidungstests bei Ratten (Park et al., 2000), Testung des deklarativen Gedächtnis und der selektiven Aufmerksamkeit bei Alzheimer Patienten (Craft et al., 1999) oder bei der Testung der Kurzzeitgedächtnisleistungen bei Menschen nach intranasaler Insulinapplikation (Fehm et al., 2000) eingehend nachgewiesen wurde.

Einige Studien befassten sich mit der Auswirkung von Insulin auf auditorisch evozierte Potentiale und auf das Arbeitsgedächtnis. Man fand heraus, dass

Insulin eine negative Verschiebung in den AEP bewirkt, die mit einer Verbesserung der Gedächtnisleistung korreliert (Kern et al., 1999; Pelosi and Blumhardt, 1999; Wolach and Pratt, 2001; Shucard et al., 2003). Des Weiteren unterstreichen Studien, die durch intranasale Insulinapplikation beim Menschen eine Unterdrückung von Hungergefühl (Porte et al., 1998; Schwartz et al., 2000) bzw. durch eine selektive Deletion von Insulinrezeptoren in Mäusen einen Phänotyp mit Hyperphagie, Adipositas und metabolischer Insulinresistenz (Bruning et al., 2000) auslösen, die zerebrale Insulinwirkung in den Bereichen Energiehomöostase und Nahrungsaufnahme. Diese Funktion scheint vor allem im Hypothalamus ihre Lokalisation zu haben. Hier werden Hungergefühl und Nahrungsaufnahme durch einen extrem komplexen Regulationsmechanismus gesteuert. Die wichtigsten Modulatoren sind allerdings Insulin, das nach Nahrungsaufnahme ausgeschüttet wird und im Hypothalamus als Appetitzügler fungiert und NPY, das als Antagonist zu Insulin ein Hungergefühl auslöst (Schwartz et al., 1991; McKibbin et al., 1992; Schwartz et al., 1992; Sipols et al., 1995).

Neben dem EEG gilt heutzutage das MEG als eine etablierte Methode zur nichtinvasiven Messung kortikaler Verarbeitungsprozesse. Die bisher zur Verfügung stehenden Methoden hatten einige Nachteile, die ihre Aussagefähigkeit einschränkten. Beispielsweise litten funktionelle MRT Messungen an einem stark limitierten zeitlichen Auflösungsvermögen. Bei PET-Geräten erlaubten Aufzeichnungen nur Aussagen über den lokalen Glukoseverbrauch, also eine reine Beobachtung von metabolischen Prozessen ohne Erfassung der elektrisch-neuronalen Vorgänge, und auch hier war das räumliche Auflösungsvermögen eher schlecht. Das EEG dagegen erfasst die interessanten elektrisch-neuronalen Prozesse. Der Hauptgrund, weswegen nun das EEG weitgehend durch das MEG abgelöst oder zumindest ergänzt wird, ist das gegenüber dem EEG höhere zeitliche und räumliche Auflösungsvermögen (Lounasmaa et al., 1996), zum einen bedingt durch die Tatsache, dass elektromagnetische Felder durch die physikalische Beschaffenheit des menschlichen Kopfes im Gegensatz zu elektrischen Feldern nur für Messungen vernachlässigbar verzerrt

werden und zum anderen, dass durch den Aufbau des MEG-Dewars problemlos 151 Sensoren an den Probanden platziert werden, während das Anbringen einer größeren Anzahl von Sensoren beim EEG mit extrem viel Aufwand verbunden ist. Durch die Eigenschaften magnetischer Wellen ist es dem MEG nur möglich, Aktivitäten zu registrieren, die aus tangentialen Quellen, also den Sulci stammen. Aus diesem Grund wird dem Experimentaldesign ein fünfpoliges EEG hinzugefügt, das radiale Quellen (von den Gyri stammend) aufzeichnen soll. Mit Hilfe des MEG wurde in unserem Experiment die Erfassung der kortikalen Hintergrundaktivität (Baseline) repräsentiert durch das Beta- und Theta-Band sowie die stimulierte kortikale Aktivität repräsentiert durch die mismatch negativity durchgeführt. Die mismatch negativity misst bei auditorischen Stimuli die unbewusste Diskrimination zwischen zwei Tonqualitäten (genauer: Frequenzabweichungen zwischen zwei Tönen). Sie gilt als aufmerksamkeits- und erwartungsunabhängig und stellt somit eine Möglichkeit zur Messung unbewusster kortikaler Informationsverarbeitung dar (Lounasmaa et al., 1996; Naatanen, 2003). Sie weist außerdem eine gute Retest-Stabilität auf (Tervaniemi et al., 2005).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Studie untersucht die Insulinwirkung am zentralen Nervensystem bei Trägern und Nicht-Trägern des Gly972Arg-Polymorphismus im IRS-1 Gen. Unsere Hypothese ist, dass die Träger der Mutation (Arg-Allel) im Vergleich zu den Trägern des Wildtyp (Gly-Allel) eine verminderte Insulinwirkung am ZNS zeigen. Zur Durchführung der Untersuchung verwenden wir ein Verfahren, das als euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp bekannt ist. Bei diesem Verfahren wird dem Probanden Insulin infundiert während der BZ über eine gleichzeitige Infusion von Glukose konstant gehalten wird. An einem anderen Tag wird der Versuch mit NaCl-Infusion anstelle des Insulins als Kontrollexperiment verblindet wiederholt. Zur Beurteilung der ZNS-Aktivität werden mittels magnetencephalographischer Messungen sowohl die kortikale Hintergrund-

aktivität wie auch die stimulierte kortikale Aktivität erfasst. Da aus Vorversuchen bekannt ist, dass die Insulinwirkung am ZNS beispielsweise vom Körpergewicht und Körperfettanteil abhängt und übergewichtige Personen eine Insulinresistenz des ZNS aufweisen, wurde darauf geachtet, dass Träger der Mutation und die Träger des Wildtyps im Körpergewicht, Alter und Geschlechterverteilung einander entsprachen.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchspersonen

Für unsere Studie rekrutierten wir zehn heterozygote und einen homozygoten IRS-1 Gly972Arg Polymorphismus-Träger. Zu diesen Versuchspersonen wurden elf gesunde, normal glukosetolerante IRS-1 Wildtypträger nach Alter, Geschlecht und BMI gematcht (siehe Tab. 3).

Als definierte Einschlusskriterien galten Einwilligungsfähigkeit und ein Alter zwischen 18 und 50 Jahre. Ausschlusskriterien beinhalteten Krankheiten mit klinischer Relevanz (z.B. psychiatrische Erkrankungen, Diabetes mellitus, gestörte Glukosetoleranz), Schwangere und stillende Frauen, ein BMI von >35, eine kürzer als drei Monate zurückliegende Operation, jegliche Medikamenteneinnahme mit Ausnahme von Hormonsubstitution und oraler Kontrazeption, eine gleichzeitige Teilnahme an anderen Studien sowie zusätzliche Ausschlusskriterien für das MEG, also z.B. die Messung störende Metallimplantate (Zahnspangen, Prothesen, Tattoos, Piercings usw.), Klaustrophobie und wenn bei Brillenträgern ein Austausch gegen Kontaktlinsen nicht möglich ist. Des Weiteren wurden Probanden nur in die Studie aufgenommen, wenn sie nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung einwilligten und eine Einverständniserklärung unterschrieben. Das Versuchsprotokoll wurde der Ethikkommission der Universität Tübingen vorgelegt und von ihr genehmigt.

	Gly/Gly	X/Arg	p
N	11	11	-
Geschlecht (M/W)	5/6	5/6	1.0
Alter (Jahre)	31 ± 3	33 ± 3	0.85
Gewicht (kg)	72.8 ± 4.6	71.3 ± 5.0	0.82
BMI (kg/m ²)	24.42 ± 1.37	24.43 ± 1.38	0.99
Prozent Körperfett (%)	22.7 ± 2.5	23.6 ± 2.5	0.81
Taille-Hüft-Quotient	0.859 ± 0.028	0.855 ± 0.030	0.93
BZ nüchtern (mmol/L)	4.96 ± 0.09	4.83 ± 0.13	0.44
2 h glucose (mmol/L)*	5.95 ± 0.43	5.73 ± 0.37	0.70
Insulin nüchtern (pmol/L)	46 ± 7	53 ± 7	0.47
2 h insulin (pmol/L)*	367 ± 84	398 ± 100	0.81

* Oraler Glucose-Toleranztest

Tab. 3: Studienpopulation

2.2 Experimentdesign

2.2.1 Vorbereitung

Die Testpersonen wurde an zwei Experimenttagen, die mindestens eine Woche, maximal vier Wochen auseinander liegen dürften, jeweils einer Placebo Clamp- und einer Insulin Clamp-Untersuchung unterzogen. Eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 75 Euro pro Tag wurde gezahlt. Beginn der Untersuchung war 07:00 Uhr morgens. Die Probanden wurden angewiesen am Vorabend der Messung keine anstrengenden Aktivitäten wie Jogging oder lange Spaziergänge zu unternehmen und ab 20:00 Uhr nichts mehr zu essen. Tee und Kaffee waren ebenfalls bis 20:00 Uhr des Vorabends erlaubt, ab

diesem Zeitpunkt baten wir unsere Teilnehmer nur Wasser zu trinken. Des Weiteren wurde darauf hingewiesen, dass die Probanden am Tag des Experiments nüchtern erscheinen sollten und auch keinen Kaugummi kauen dürften. Nach Aufklärung und Besprechung etwaiger Fragen wechselten die Testpersonen die Kleidung, und legten alle metallischen Gegenstände ab. Es wurden zwei Venenverweilkanülen gelegt (1,4mm rechte Ellenbeuge: Infusionszugangarm; 1,4mm linker Handrücken: Blutabnahmearm), die linke Hand wurde zwecks Arterialisierung des Blutes mittels Heizkissen und Gelkompressen, die eine Umgebungstemperatur von ca. 50°C erzeugten gewärmt. Weiterhin wurde ein EEG mit fünf Elektrodenorten (Fz, Cz, Pz, Oz, T7, T8) angebracht. Kurz vor Betreten des MEG wurde das Experimentaldesign ein letztes Mal durchgesprochen. Während der gesamten Vorbereitung wurde durch Standardisierung des Vorgehens und Abdeckung aller Infusionsflaschen darauf geachtet, dass die Testperson keine Hinweise auf die Art des Versuches (Placebo oder Insulin) erhält. Während dieser Zeit wurde das MEG vorbereitet: Wir benutzten für die visuelle Stimulation eine Leinwand, auf die mit Hilfe von Spiegeln die Buchstabenkombinationen durch den außerhalb der MEG Kammer stehenden Projektor abgebildet wurden. Zur auditorischen Stimulation wurden Plastikkabel benutzt, die an den auch außerhalb der MEG-Kammer stehenden Computer zur Erzeugung akustischer Stimuli angeschlossen wurden.

2.2.2 Clamp – Ablauf und Messung

Die Messung gliederte sich in eine 60-minütige Baseline-Messung mit darauf folgenden 2-Stufen hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp oder Placebo. Ein MEG-Messungsblock von ca. 30 Minuten wurde nach der Baseline-Messung und jeweils nach der Clamp/Placebo-Stufe durchgeführt. Die erste low-dose Insulin-Stufe bestand in der Infusion von 0,25mU/kg/min Insulin (Insuman Rapid in 0,9% NaCl-Lösung), das in der zweiten high-dose Stufe auf 1,0mU/kg/min erhöht wurde. Die Länge der beiden Clamp-Stufen betrug jeweils 90 Minuten. Eine Studie, die ähnliche GIR verwendete, konnte eine Verdop-

pelung der Insulinkonzentration im Liquor nachweisen (Watson et al., 2003). Basierend auf dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp-Protokoll wurde zur Konstanthaltung des BZ eine Glukoseinfusion (20% Glukose) gestartet. Um dem Absinken des Serum-Kaliums aufgrund der Insulininfusion Rechnung zu tragen, wurde der Glukoselösung beim Insulinversuch 20mval/L Kalium zugesetzt. Durch Blutentnahmen (alle 5-10 Minuten) und BZ-Messungen wurde die benötigte GIR berechnet. Um der Gefahr des BZ-Anstieges durch körpereigene Gegenregulationsmechanismen Rechnung zu tragen, wurde ein Zielwert von 5mmol/L festgesetzt, der einen genügenden Spielraum offen lässt, um unvorhergesehene Fluktuationen nach unten zu vermeiden. Zur Bestimmung der metabolischen Parameter Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid und Magnesium), Serumosmolarität, Katecholamine, Cortisol, GH und Plasmainsulin wurden spezielle Blutabnahmen zu den Zeitpunkten -30, 0, 45, 90, 135 und 180 Minuten durchgeführt. Die Bestimmung der peripheren Insulinresistenz erfolgt über die errechnete GIR und den mittleren Plasmainsulinpiegel während den letzten 40 Minuten der high-dose Insulinstufe. Die Kontrolluntersuchung wurde zeitlich exakt gleich durchgeführt. Durch Wegfallen der Insulininfusion wurde auf die Glukoseinfusion verzichtet. Um die Verblindung zu wahren wurden die fehlenden Infusionen durch die gleiche Menge NaCl-Lösung ersetzt. Ein leichter physiologischer Abfall des BZ bedingt durch die Tageszeit wurde in Kauf genommen. Die Spritzenpumpen mit den jeweiligen Infusionen wurden außerhalb der MEG Kammer montiert, der Zugang zur Testperson erfolgte über verlängerte Infusionssysteme durch ein kleines Zuleitungsloch. Nach Beendigung des Experiments wurden die Probanden in einen speziellen Raum gebracht und etwa 60 Minuten ärztlich überwacht - dabei wurden weiterhin die BZ-Werte in fünfminütigen Abständen bestimmt. Zur Wahrung der Verblindung wurde die Nachbeobachtung bei Placebo-Versuchen exakt gleich durchgeführt. Der Clamp Ablauf ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

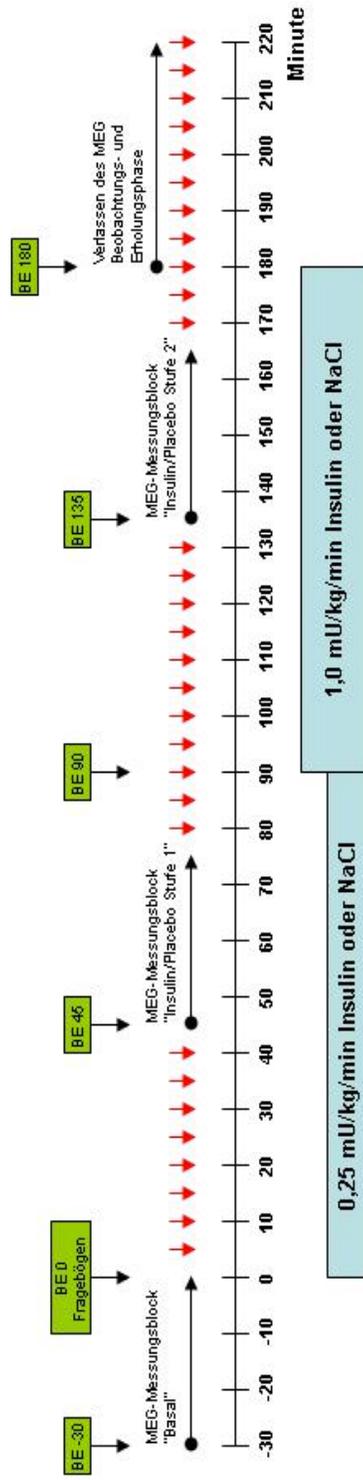


Abb. 1: Darstellung des MEG-Experimentablaufs (BE = Blutentnahme, die roten Pfeile symbolisieren Blutzucker-Kontrollen)

2.2.3 MEG – Ablauf und Messung

Das von uns genutzte MEG ist ein 151-Kanal Ganzkopf-MEG (Fa. CTF Inc., Canada, 1997). Wegen den hochempfindlichen und damit störungsanfälligen Messsensoren ist das Gerät in einem elektromagnetisch abgeschirmten Raum untergebracht (dreilagige Mu-Metallschicht, Vakuumschmelze, Hanau, Deutschland). Weitere Störfaktoren, also alle Gegenstände die ferromagnetisches Metall enthalten, wie z.B. Armbanduhren, Ohrringe, Hosenkнопfe usw. wurden durch Kleidungswechsel (OP-Oberteil, Hose, Schuhe) und Ablegen aller Schmuckstücke und Metallartikel eliminiert. Während der Messung saßen die Probanden in einem speziellen MEG-Stuhl, der durch ein hydraulisches System auf- und abgefahren werden konnte. Somit wurde ein guter Kontakt zwischen dem schwenkbaren Dewar (Positionsmöglichkeiten von 180° bis 90°) und Kopf des Patienten gewährleistet. Für unsere Messung wählten wir 90° als Messposition. Der Dewar beinhaltet neben den 151 Sensoren, die jeweils mit einem SQUID verbunden sind, Referenzspulen und flüssiges Helium zur Kühlung. Um eine exakte Positionierung des Kopfes innerhalb des Dewars zu dokumentieren wurden drei Referenzspulen an den Punkten Nasion, Präauricular links und Präaurikular rechts angebracht. Mit Hilfe der Referenzspulen und der Positionsmessung (jeweils am Anfang und am Ende eines Messblocks) konnten auch etwaige Kopfbewegungen während der Messung erfasst und in die Berechnung miteinbezogen werden. Als Richtlinie galt hier: Messungen mit Kopfbewegungen größer 5mm wurden wiederholt. Zur Unterstützung des Probanden wurde der Kopf im Dewar mittels Schaumstoffpolster fixiert und eine rutschfeste Matte am MEG-Stuhl angebracht.

Die Datenerfassung und Speicherung wurde durch eine Workstation (Fa. Hewlett-Packard, HP Visualize C3000, USA) mittels Datenerfassungsprogramm Acq gewährleistet. Bei der MEG-Messung wurden zwei Parameter erfasst: zum einen die spontane kortikale Aktivität (baseline-activity) und zum anderen die stimulierte kortikale Aktivität. Als Stimuli für die Kortexaktivierung dienten akus-

tische Reize. Die Datenerfassung erfolgte in Blöcken, die jeweils 12 Minuten dauerten. Ein Block bestand aus einer Ruhephase, bei der sich die VP 1,5 Minuten mit geschlossenen Augen und 1,5 Minuten mit offenen Augen entspannen konnte und der danach folgenden mentalen Aufgabe (Sternberg Aufgabe), die etwa 9 Minuten in Anspruch nahm. Da es für die VP schwer ist, eine Konzentrationsaufgabe über 20 Minuten hinweg zu bearbeiten und dabei den Kopf absolut ruhig zu halten wurde die Datenerfassung in jeder Stufe (Basal, Stufe 1, Stufe 2) in zwei 12-Minuten-Blöcke geteilt. Dazwischen konnte die VP kurz entspannen und die Sitzposition verändern. Während der Ruhephase wurde das Spontan-MEG der VP aufgezeichnet und daraus die Leistungsspektren (Delta, Theta, Alpha, Beta, Gamma) bestimmt. Bei der MEG Aufzeichnung während der mentalen Aufgabe interessierten uns die visuell (Test-Stimulus) und auditorisch (Töne) evozierten Potentiale.

2.3 Darbietung der visuellen und akustischen Stimuli

Die Darstellung der Buchstabenfolge erfolgte mittels Computer (Fa. Unitrend, Pentium). Während der mentalen Aufgabe (Sternberg-Aufgabe) wurde der VP ein Memory-Set bestehend aus 3-6 Buchstaben (durch Variation der Buchstabenanzahl wurden vier Schwierigkeitsgrade erzeugt) und nachfolgend ein einzelner Buchstabe (Test-Stimulus) dargeboten. Die Aufgabe der VP war es, mittels Tastendruck anzuzeigen, ob der einzelne Buchstabe (Test-Stimulus) im vorangehenden Memory-Set vorhanden war. Ein Durchgang dauerte 6 sek., wovon das Memory-Set 1 sek. und der Test-Stimulus 0,5 sek. dargeboten wurden. Zwischen Darbietung des Memory-Set und des Test-Stimulus wurde eine Pause von 2,5 sek. eingeschoben, in der ein Fixationskreuz angezeigt wurde. Weiterhin gab es eine 2 sek. Pause zwischen Test-Stimulus und einem neuen Durchgang. Der Computer registrierte als Leistungswerte zum einen die Reaktionszeit zwischen dem Erscheinen des Test-Stimulus und der Antwort der VP in Form des Tastendrucks und zum anderen die Anzahl richtiger und falscher Antworten. Zur Darstellung in der MEG-Kammer wurde eine Leinwand

vor dem Probanden angebracht, auf die die erzeugten Bilder über einen Projektor (Fa. NEC, Modell GT2150), der außerhalb der Kammer aufgestellt war, sowie zwei Spiegel dargestellt wurden. Für die akustische Stimulation wurde ebenfalls ein Computer (Fa. Unitrend, Pentium) zur Erzeugung der Stimuli benutzt - die Verbindung zwischen dem Verstärker (Fa. Sony, Super Legato Linear) und Patient wurde zur Vermeidung elektromagnetischer Störungen mittels Kunststoffleitung und Kunststoffohrhörer hergestellt. Mit Hilfe eines Basic-Programms wurden 1kHz-Töne der Dauer 50ms als Standard-Ton und 960Hz-Töne der gleichen Dauer als Abweichungs-Ton erzeugt, das Darbietungshäufigkeitsverhältnis betrug 80% zu 20%. Die Stimuli wurden jeweils binaural mit einer Lautstärke von 60dB eingespielt. Mit einem Interstimulusintervall von 1250ms bei Randomisierung von +/-200ms entstanden so 640 Standard- und 160 Abweichungs-Töne. Der Ablauf des MEG-Messungsblocks und des Sternberg-Messungsblocks sind schematisch in Abb. 2 und 3 dargestellt.

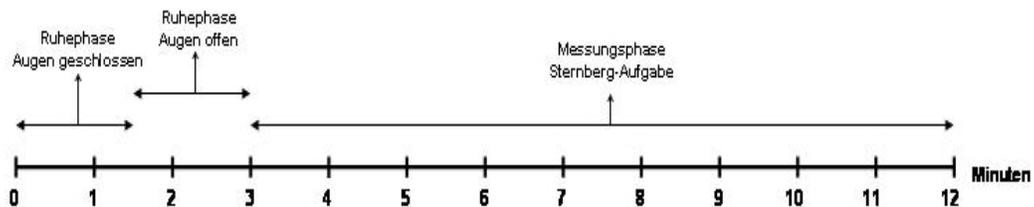


Abb. 2: MEG-Messungsblock

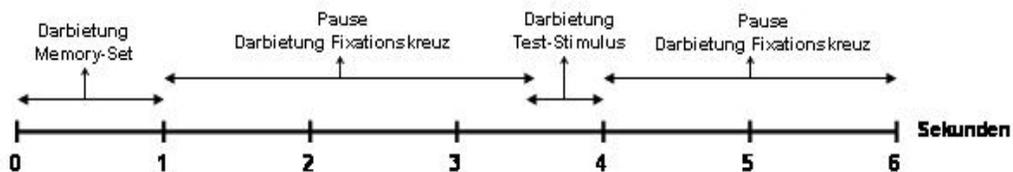


Abb. 3: Sternberg-Messungsblock

2.4 Auswertung der gewonnenen MEG-Daten

Die aus den MEG-Messungen gewonnenen Datensätze gliederten sich in zwei Ruhephasen (jeweils 90 Sekunden; ein Datensatz bei geöffneten Augen, ein Datensatz bei geschlossenen Augen) und zwei Messphasen mit Einzeldurchgängen der Zeitpunkte -100ms bis 500ms (Erfassung der Standard- und Abweichungs-Töne). Nachfolgend schloss sich die Bearbeitung der Daten an. Zuerst wurden alle Durchgänge entfernt, in denen Augenbewegungen registriert wurden. Die evozierten Potentiale erhielten wir danach durch Mittelung der verbleibenden Durchgänge. Die mismatch negativity wurde durch die Subtraktion der Standard- und Abweichungs-Töne von den gemittelten evozierten Potentialen bestimmt.

2.5 Verarbeitung der gewonnenen Blutproben

Zu den Zeitpunkten -30, 0, 45, 90, 135 und 180 Minuten wurden jeweils eine Monovette EDTA 9ml, eine Monovette EDTA 2,7ml, eine Monovette Serum 7,5ml, eine Monovette Serum 5,5ml sowie eine Monovette EDTA 9ml mit 200 I Trasyolol entnommen. Die Proben wurden direkt in einer Eis-Box bis zur Verarbeitung kaltgestellt. Im Labor wurden nach erfolgter Messung alle Monovetten bei 3500 Umdrehungen 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge, Fa. Hettich, Modell Universal 30 RF). Es wurden pro Abnahmezeitpunkt jeweils 1 PP-Röhrchen mit Beschriftung „Katecholamine“, 1 PP-Röhrchen mit Beschriftung „Serum“, 3 Eppendorf-Cups mit Beschriftung „EDTA“, 3 Eppendorf-Cups mit Beschriftung „EDTA+T“ und 2 Eppendorf-Cups mit Beschriftung „Serum“ vorbereitet. Daraufhin erfolgte die Pipettierung nach dem in Tab. 4 angegebenen Schema. Die Eppendorf-Cups mit der EDTA- und Serum-Reserve wurden für eventuell nachträglich benötigte Messungen bei -80°C im Eisschrank verwahrt. Die pipettierten Eppendorf-Cups der EDTA+T Monovette wurden in einer speziell gekennzeichneten Schachtel kühl bei -20°C gelagert. Die PP-Röhrchen „Katecholamine“ und „Serum“ sowie die EDTA- und

Serum-Monovette mit den verbliebenen Resten wurden wieder in der Eis-Box untergebracht und an das Labor des Universitätsklinikums Tübingen zur Bestimmung weitergeleitet.

Monovette	Füllung von	Volumen	Bestimmung von
EDTA	3xEppendorf-Cups	1000 μ l	EDTA-Reserve
EDTA + T	3xEppendorf-Cups	1000 μ l	EDTA+T Reserve
Serum	2xEppendorf-Cups	1000 μ l	Serum Reserve
EDTA	PP-Röhrchen „Katecholamine“	2500-3000 μ l	Katecholamine
Serum	PP-Röhrchen „Serum“	500-1000 μ l	Elektrolyte, Serumosmolalität
Serum	Rest in Monovette	verbliebener Rest	STH
Serum	Rest in Monovette	verbliebener Rest	Cortisol
EDTA	Rest in Monovette	verbliebener Rest	Insulin

Tab. 4: Blutprobenverarbeitung – Pipettierschema

2.6 Genetik

Der Nachweis des Gly972Arg Polymorphismus im IRS-1-Gen erfolgte über die Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender Restriktionsenzymanalyse mittels Mval. Die Allelenfrequenz der Arg-Allele beträgt 7,8% (P=0,8x2 Test) mit einer Genotypenverteilung im Hardy-Weinberg-Äquilibrium (Koch et al., 1999).

2.7 Fragebögen

Wir benutzen zwei Fragebögen, zum einen den POMS sowie einen Bedürfnis-Fragebogen in Form einer visuellen Analogskala. Der POMS ist eine Selbstbeurteilungsskala zur Erfassung des situativen Gefühlszustandes anhand einer

Eigenschaftswörterliste. Der Fragebogen gilt als etabliert und besitzt eine hohe Reliabilität und Validität bei der Messung von Gemütszuständen (Gibson, 1997). Die Testperson bearbeitet 35 Items (Eigenschaftswörter), denen sie anhand einer siebenstufigen Ratingskala einen Zahlenwert von 0 (= überhaupt nicht), 1 (= sehr schwach), 2 (= schwach), 3 (= etwas), 4 (= ziemlich), 5 (= stark) und 6 (= sehr stark) zuteilt. Die Items werden anhand eines festgelegten Musters (siehe Tab. 5) addiert und als Rohwert sowie dem prozentualen Anteil am maximal erreichbaren Wert angegeben und auf vier Faktoren bezogen: „Niedergeschlagenheit“ (depressive Stimmung, Minderwertigkeit, Hilflosigkeit, Verzweiflung, Entmutigung), „Müdigkeit“ (Lustlosigkeit, Trägheit), „Tatendrang“ (Aktivität, Lebhaftigkeit, Fröhlichkeit) und „Missmut“ (schlechte Laune, Gereiztheit, Zorn, Aggression).

Score	Beteiligte Items	Maximalwert
Score 1 Niedergeschlagenheit	3 ; 5 ; 7 ; 11 ; 13 ; 18 ; 21; 23 ; 24 ; 26 ; 32 ; 33	72
Score 2 Müdigkeit	2 ; 6 ; 16 ; 22 ; 25 ; 27 ; 35	42
Score 3 Tatendrang	4 ; 8 ; 12 ; 20 ; 28 ; 30 ; 34	42
Score 4 Missmut	1 ; 9 ; 10 ; 15 ; 17 ; 29 ; 31	42

Tab. 5: POMS-Auswertungsschema

Der Bedürfnis-Fragebogen gliederte sich in sieben Items: Essen, Trinken, Schlafen, Alkohol, Bewegung, Entspannung und Aufregung. Hierbei mussten die Testpersonen auf einem 10cm langen Strich ein Kreuz als Markierung setzen, wobei die linke Seite mit „wenig“ und die rechte Seite mit „viel“ bezeichnet waren. Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der Entfernung mittels Lineal vom linken Anfang des Striches und Dokumentation als Wert mit einer Nachkommastelle zwischen 0 und 10.

Die Fragebögen wurden den Probanden jeweils nach einem Messungsblock vorgelegt. Somit erhielten wir pro Proband jeweils einen POMS- und einen Bedürfnis-Bogen zu den Zeiten Insulin 0,1,2 und Placebo 0,1,2 (entspricht Basal, Stufe 1 und Stufe 2). Die erhaltenen Werte der POMS- und Bedürfnis Fragebögen werden jeweils innerhalb einer Gruppe (Wildtyp vs. IRS-1 Polymorphismus) und innerhalb des Versuchsdurchgangs (i1, i2, i3, p1, p2, p3) gemittelt und mit den entsprechenden Standardabweichungen graphisch aufgetragen.

2.8 Statistik

Die MEG-Daten wurden mittels ANOVA (repeated measure design) ausgewertet, die die Zwischenfaktoren (Gruppe: Wildtyp-, Polymorphismus-Träger) und die repeated measure Faktoren (Stufe - Basal, Stufe 1 Insulin, Stufe 2 Insulin) beinhalteten. Die MEG-Parameter wurden mit SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL) unter der Greenhouse-Geisser-Korrektur ausgewertet. Weiterhin wurde das Software- Paket JMP (SAS Institute, Cary, NC) verwendet. Die Werte der Fragebögen und der metabolischen Parameter wurden jeweils in der Gruppe (Wildtyp- vs. Polymorphismus-Träger) aufaddiert, gemittelt und dann mit Standardabweichung graphisch aufgetragen. Die statistische Aufarbeitung erfolgte als Suche nach signifikanten Unterschieden mit Hilfe der ANOVA im repeated measure design.

ERGEBNISSE

3.1 MEG-Daten

Bei der SPSS-Auswertung wählten wir als Variablen „Behandlung“ mit der Dimension zwei für den Placebo- und Insulinversuch und „Dosierung“ mit der Dimension drei für die jeweils drei Stufen. Mit „Gruppe“ (Dimension zwei) definierten wir als Zwischensubjektfaktor die beiden Gruppen (Wildtyp- und Polymorphismusträger).

Im nachfolgenden Text wurde für die MEG-Daten die jeweilige Aktivität des Placeboversuch von der Aktivität des Insulinversuch abgezogen und somit für jede Gruppe drei Werte (Basal, Stufe 1 und Stufe 2) ermittelt.

Die Beta-Aktivität differiert deutlich zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abb. 4).

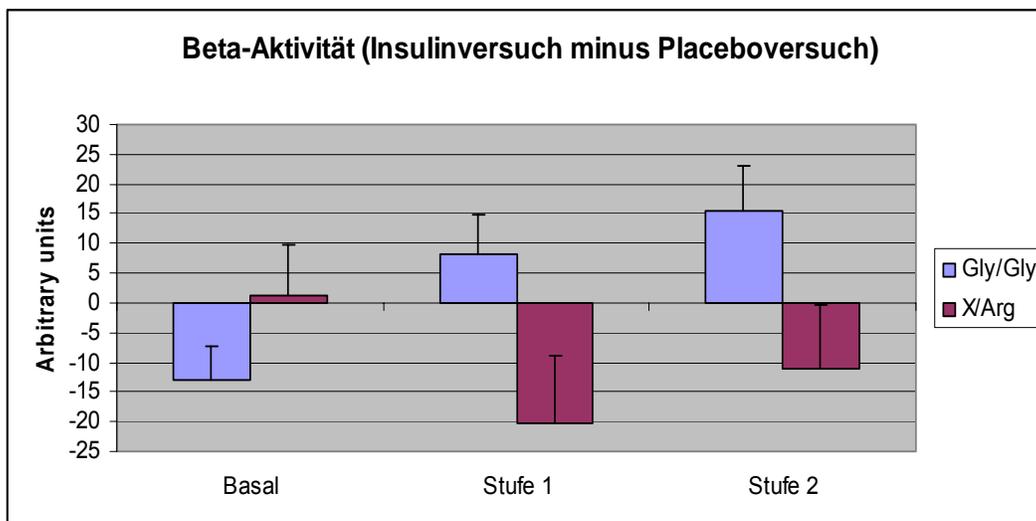


Abb. 4: Beta-Aktivität der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe (Insulinversuch minus Placeboversuch)

Die Wildtypgruppe (Gly/Gly) verzeichnete einen Anstieg von Basal: $-13,1 \pm 5,9$ über Stufe 1: $8,2 \pm 6,7$ bis zur Stufe 2: $15,4 \pm 7,5$, während in der Polymorphismusgruppe (X/Arg) ein Aktivitätsrückgang von Basal: $1,3 \pm 8,5$ auf Stufe 1: $-20,2 \pm 11,3$ und Stufe 3: $-11,2 \pm 11,0$ beobachtet wurde. Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,001$ signifikant.

Zusätzlich zur Darstellung der Messwerte erstellten wir ein Diagramm (siehe Abb. 5), das die Veränderung der Beta-Aktivität dokumentiert. Die Werte wurden mittels folgender Formel ermittelt:

$\Delta\beta$ -Aktivität =

$(\beta[\text{Insulin-Stufe 2}] - \beta[\text{Placebo-Stufe 2}]) - (\beta[\text{Insulin-Basal}] - \beta[\text{Placebo-Basal}])$

Das Ergebnis beschreibt die Änderung der Beta-Aktivität, jeweils korrigiert für den Placeboversuch.

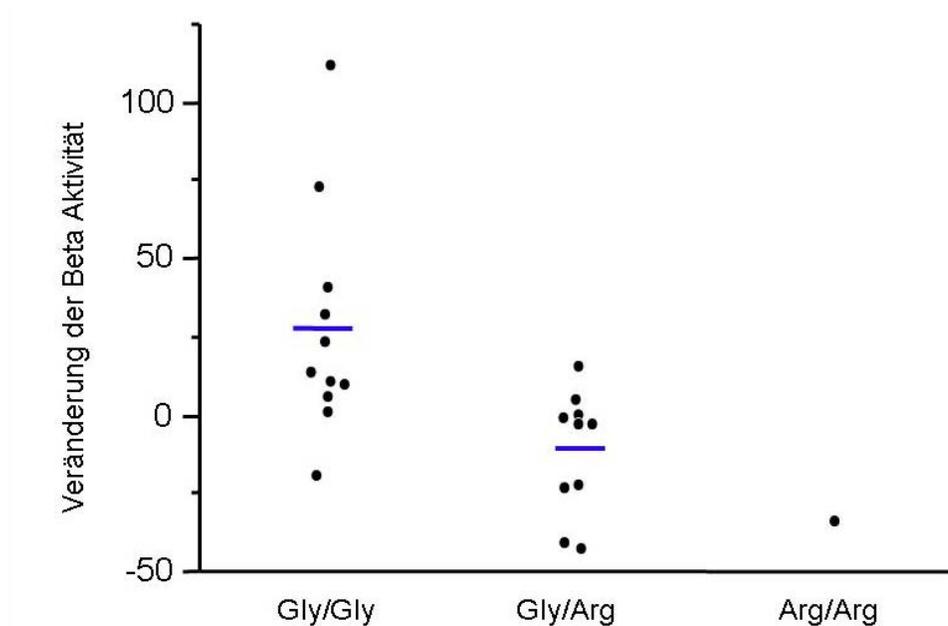


Abb. 5: Veränderung der Beta-Aktivität im Insulinversuch, gegliedert in Wildtyp- und Polymorphismus-Träger (eine bzw. zwei Arg-Allelen)

Die Theta-Aktivität (siehe Abb. 6) entwickelte sich in der Wildtypgruppe von Basal: $-15,6 \pm 26,0$ über Stufe 1: $-2,5 \pm 20,7$ zu Stufe 3: $36,4 \pm 28,0$. Bei den Polymorphismusträgern fand sich ein anfangs ähnlicher Verlauf mit Basal: $-15,1 \pm 21,0$, Stufe 1: $-17,1 \pm 18,7$ und Stufe 2: $12,0 \pm 24,7$ einen schwächeren Anstieg verzeichnete. Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,753$ nicht signifikant.

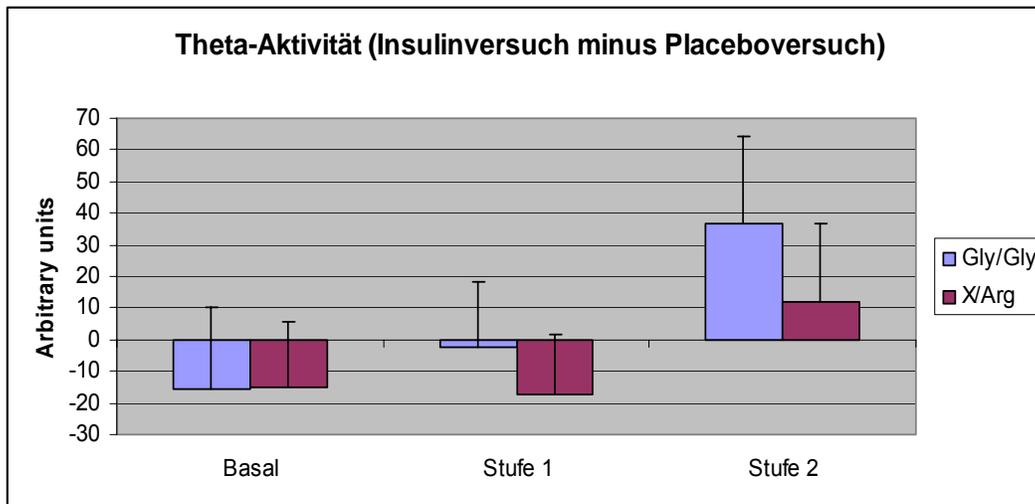


Abb. 6: Theta-Aktivität der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Insulinversuch

Die Mismatch Negativity (siehe Abb. 7) steigt bei der Wildtypgruppe über die Versuchsstufen kontinuierlich an (Basal: $7,21 \pm 0,1$; Stufe 1: $7,34 \pm 0,06$; Stufe 2: $7,43 \pm 0,09$), während sie bei der Polymorphismusgruppe nach einem Anstieg von $6,82 \pm 0,09$ (Basal) auf $6,98 \pm 0,08$ (Stufe 1) wieder auf $6,95 \pm 0,09$ (Stufe 2) abfällt. Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,298$ nicht signifikant.

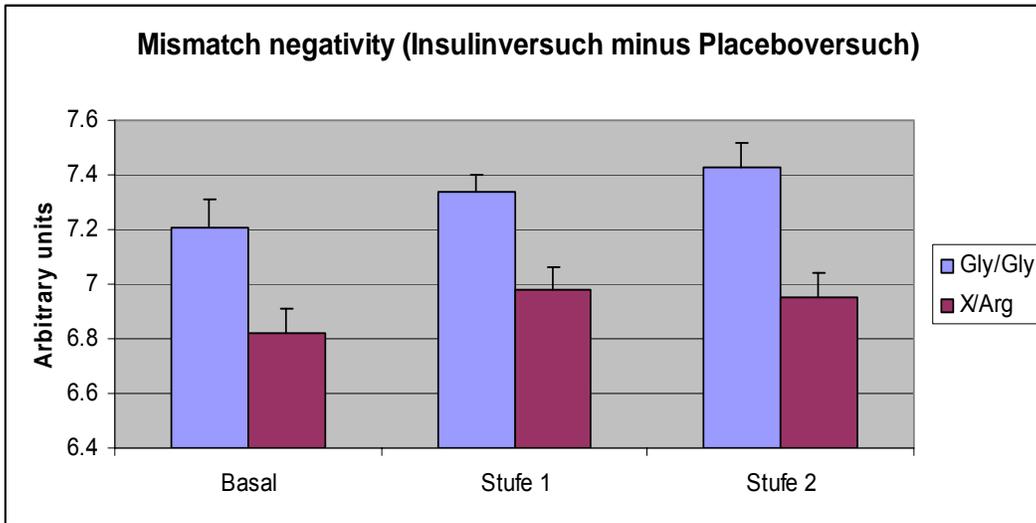


Abb. 7: Mismatch negativity der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Insulinversuch

3.2 Metabolische Parameter

Die Untersuchung der metabolischen Parameter ergab neben der direkten Bestimmung von Steady State Plasmaglukose und Steady State Plasmainsulin auch die errechneten Werte für GIR und Insulinsensitivität.

Während des Insulinclamps unterschied sich die Steady State Plasmaglukose in der Polymorphismusgruppe nicht von der in der Wildtypgruppe (siehe Abb. 8 und 9). Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,915$ nicht signifikant.

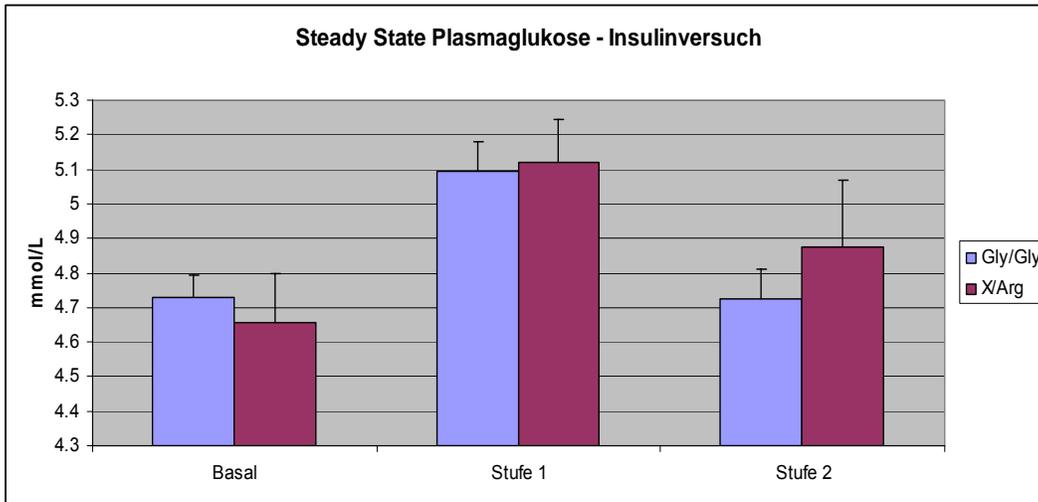


Abb. 8: Steady State Plasmaglukose der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Insulinversuch

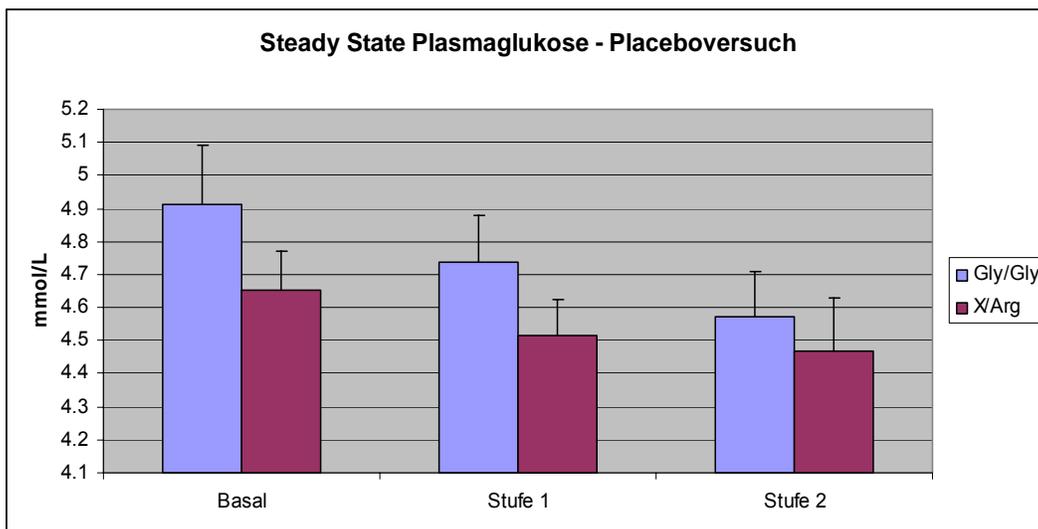


Abb. 9: Steady State Plasmaglukose der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Placeboversuch

Auch das Steady State Plasmainsulin zeigte bei beiden Versuchen innerhalb der Versuchsgruppen ähnliche Verläufe und Werte (siehe Abb. 10 und 11). Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,556$ nicht signifikant.

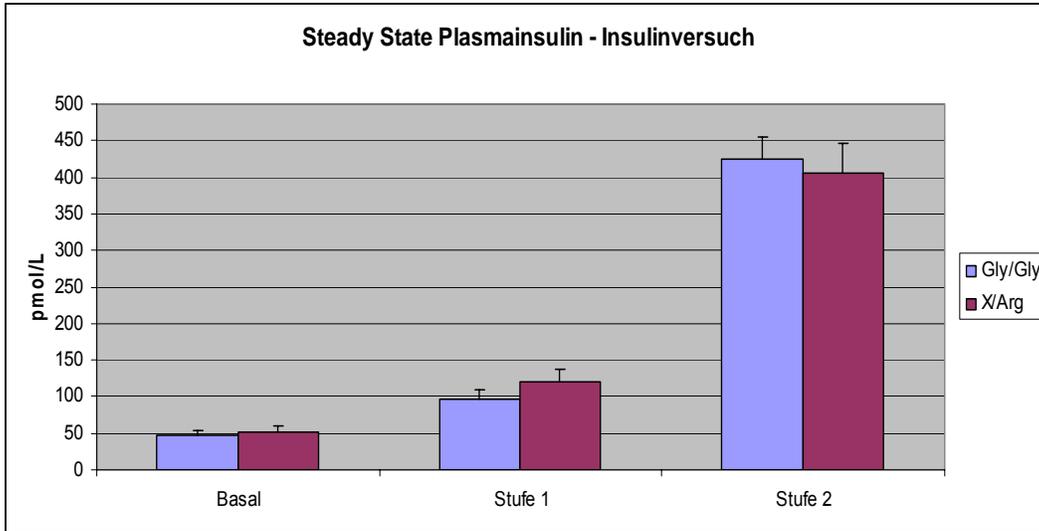


Abb. 10: Steady State Plasmainsulin der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Insulinversuch

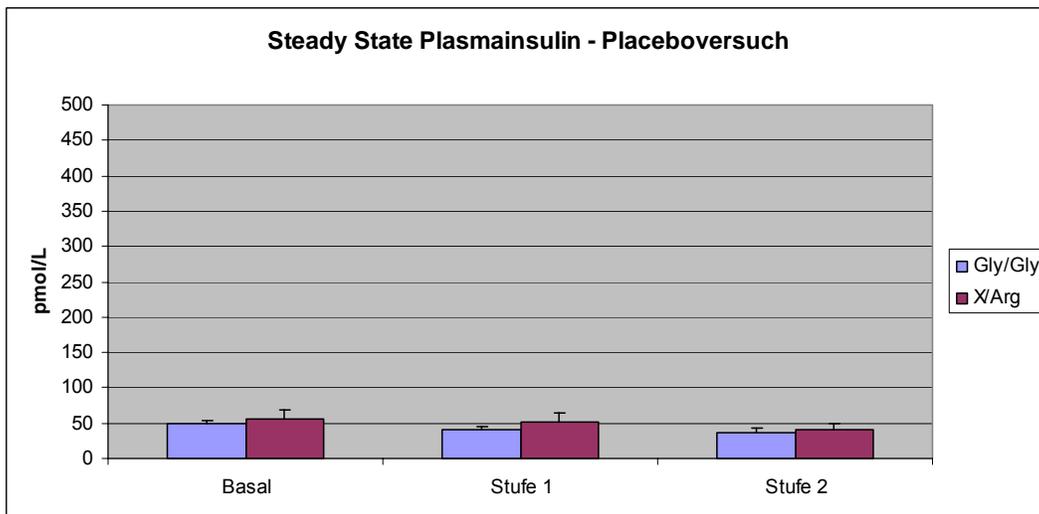


Abb. 11: Steady State Plasmainsulin der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Placeboversuch

Die Glukoseinfusionsraten stiegen bei beiden Gruppen von Stufe 1 auf Stufe 2 an, unterschieden sich jedoch nicht (siehe Abb. 12). Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,143$ nicht signifikant.

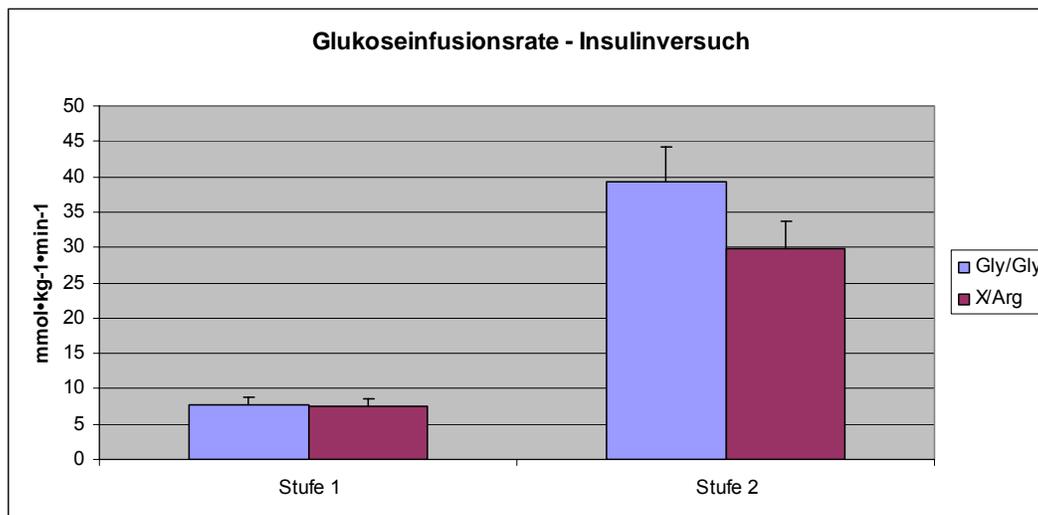


Abb. 12: Glukoseinfusionsrate der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Insulinversuch

Auch die Insulinsensitivität war in beiden Gruppen, sowohl bei der niedrigen Insulindosis (0,25mU/kg/min, Stufe 1), als auch bei der hohen Insulindosis (1,0mU/kg/min, Stufe 2), nicht unterschiedlich (siehe Abb. 13). Der Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt ist mit $p=0,669$ nicht signifikant.

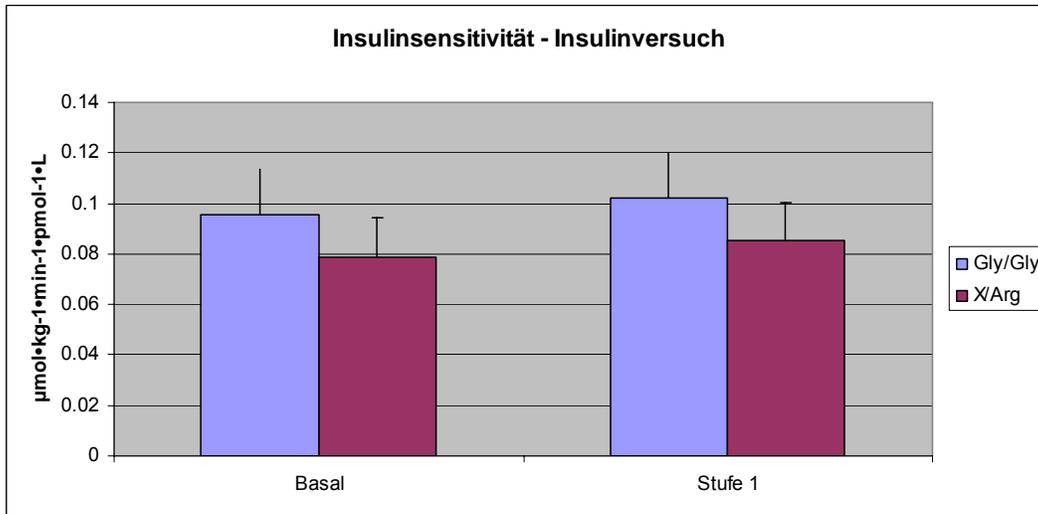


Abb. 13: Insulinsensitivität der Wildtyp- und Polymorphismusgruppe während des Insulinversuch

Die Ergebnisse der Messungen von Osmolarität, Elektrolyten, STH, Cortisol und Katecholaminen lassen sich aus Tab. 6 für beide Gruppen entnehmen.

Außer für Kalium ($p=0,475$) gab es keine signifikanten Unterschiede für den Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt.

	Gly/Gly				X/Arg				p
	Insulin Basal	Insulin Stufe 1	Insulin Stufe 2	Insulin Basal	Insulin Stufe 1	Insulin Stufe 2	Insulin Stufe 1	Insulin Stufe 2	
Osmolarität	278,14±2,04	277,23±3,09	278,73±3,18	278,45±1,85	278,5±2	277,73±2,24	278,5±2	277,73±2,24	0,242
Kalium	4,86±0,15	4,45±0,13	4,07±0,1	4,82±0,16	4,53±0,08	4,21±0,13	4,53±0,08	4,21±0,13	0,030
Natrium	137,27±0,56	136,91±0,46	137,82±0,52	138,45±0,51	138,36±0,54	138,86±0,47	138,36±0,54	138,86±0,47	0,475
Calcium	2,26±0,03	2,25±0,03	2,24±0,03	2,24±0,03	2,24±0,03	2,22±0,02	2,24±0,03	2,22±0,02	0,813
Chlorid	105,91±0,9	105,77±0,8	107,36±0,8	106,95±0,6	107,45±0,59	107,82±0,6	107,45±0,59	107,82±0,6	0,312
Magnesium	0,8±0,02	0,82±0,02	0,82±0,02	0,78±0,01	0,8±0,01	0,8±0,01	0,8±0,01	0,8±0,01	0,398
STH	2,89±1,58	0,53±0,26	2,61±1,15	3,16±1,26	1,3±0,58	3,8±1,78	1,3±0,58	3,8±1,78	0,969
Cortisol	17,03±2,43	14,31±1,44	13,01±0,8	19,02±2,85	15,55±1,36	13,55±1,19	15,55±1,36	13,55±1,19	0,376
Adrenalin	2,18±0,41	1,73±0,51	1,36±0,21	2,91±0,99	2,64±0,76	3,35±0,92	2,64±0,76	3,35±0,92	0,832
Noradrenalin	25,09±2,3	24,18±2,61	26,91±2,08	32,04±5,6	33,46±3,96	33,55±4,02	33,46±3,96	33,55±4,02	0,859
Dopamin	1,55±0,55	1±0	1±0	1±0	1,09±0,09	1±0	1,09±0,09	1±0	0,449

Tab. 6: Metabolische Parameter im Insulinclamp bei Wildtyp- (Gly/Gly) und Polymorphismus-Trägern (X/Arg)

3.3 Fragebögen

Nach schematischer Auswertung der Fragebögen wurden für jede Person elf scores ermittelt und mittels repeated measure ANOVA auf signifikante Unterschiede geprüft. Dabei ließen sich bis auf den Bedürfnis-Fragebogen für Essen ($p < 0,05$) keine signifikanten Unterschiede ermitteln (siehe Tab. 7).

	P
Score 1	0,723
Score 2	0,223
Score 3	0,327
Score 4	0,578
Essen	0,031
Trinken	0,787
Schlafen	0,873
Alkohol	0,255
Bewegung	0,84
Entspannung	0,776
Aufregung	0,073

Tab. 7: Signifikanzniveaus der POMS- und Bedürfnis-Fragebögen für den Gruppe x Dosierung x Behandlungs-Effekt

Zur Darstellung der Ergebnisse des Bedürfnis-Fragebogens für Essen wurde die Punktwertänderung (Δ Punkte) ähnlich wie bei Abb. 6 (Veränderung der Beta-Aktivität) berechnet und für Basal auf Stufe 2 graphisch aufgetragen (siehe Abb. 14).

Δ Punkte (Beispiel für Basal auf Stufe 2) =

(Punkte[Insulin-Stufe 2] - Punkte [Placebo-Stufe 2]) - (Punkte [Insulin-Basal] - Punkte [Placebo-Basal])

DISKUSSION

Das in der Vergangenheit geprägte Dogma, das Gehirn sei ein insulinempfindliches Organ (Eastman et al., 1990; Cranston et al., 1998; Hasselbalch et al., 1999), sorgte für eine Fokussierung auf die peripheren Effekte von Insulin. Mehrere Studien definierten daraufhin pathogenetisch wichtige Aspekte wie Insulinresistenz von Organen und Pankreasdysfunktion (Pratley, 2006; Virally et al., 2007). Als neue Untersuchungsmöglichkeiten wie PET, MEG und MRT verfügbar und gleichzeitig alte Methoden verbessert wurden, mehrten sich erste Berichte, die Insulin eine modulierende Rolle vieler wichtiger Funktionen im Gehirn zusprachen. Da periphere Insulinresistenz mit seinen Entstehungsfaktoren Adipositas, vermehrte Kalorienzufuhr und verminderte körperliche Betätigung, als wichtiges pathogenetisches Konzept des Typ 2 Diabetes etabliert war, rückte das Gehirn in den Mittelpunkt des Interesses, als durch Studien eine Beeinflussung der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts sowie die Regulation weiterer metabolischer Faktoren durch zentrale Insulinwirkung nachgewiesen wurden (Woods et al., 1979; Porte et al., 1998; Schwartz et al., 2000).

Unsere Arbeitsgruppe nahm sich als Ziel, in einer Studie, der auch diese Arbeit als Teilstück angehört, zu definieren, ob eine systemische Insulingabe Auswirkungen auf den zerebralen Kortex zeigt, und ob Unterschiede in Körpergewicht der Probanden die Modulation der kortikalen Aktivität durch Insulin beeinflussen (Tschröder et al., 2006). Als Untersuchungsmethode wählten wir das MEG, da es, neben einem hohen räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögen, die Untersuchung von spontaner und stimulierter kortikaler Aktivität ermöglicht (Tschröder et al., 2006). Hier zeigte sich, dass der bei der schlanken Probandengruppe vorhandene, durch Insulin stimulierte Anstieg der spontanen (Beta-Band, Theta-Band) und stimulierten (mismatch negativity) kortikalen Aktivität bei den adipösen Probanden supprimiert war. Der Insulineffekt auf die spontane kortikale Aktivität korrelierte negativ mit dem BMI und dem Körperfettanteil der Probanden.

Das Teilstück des Projekts, dem diese Arbeit gewidmet ist, konzentrierte sich auf einen weiteren Teilbereich der Pathogenese des Typ 2 Diabetes. Zu den oben beschriebenen Umgebungs- und Lebenswandel-Faktoren kommen zusätzlich genetische Faktoren hinzu. Typ 2 Diabetes ist eine polygene, multifaktorielle Erkrankung, bei der die phänotypische Expression der genetischen Prädisposition durch Umgebungsfaktoren moduliert wird. Studien zeigten eine hohe Konkordanz bei eineiigen Zwillingen (70-90%) und ein stufenweise erhöhtes Erkrankungsrisiko, wenn ein bzw. beide Elternteile an Diabetes Typ 2 erkrankt sind. Eine beispielhafte Studie, in der das Zusammenspiel von genetischen und Umgebungsfaktoren aufgezeigt wird, wurde von Schulz et al. publiziert (Schulz et al., 2006).

Nachdem eine bei schlanken und adipösen Probanden unterschiedliche kortikale Aktivitätsmodulation durch Insulin aufgezeigt wurde, untersuchen wir nun, ob sich bei Trägern von genetischen Polymorphismen, die die Insulintransduktionskaskade beeinflussen, im Vergleich zu Trägern des genetischen Wildtypen Unterschiede in der Insulinwirkung am ZNS feststellen lassen. Hierfür wählten wir einen verhältnismäßig häufigen Gly972Arg-Polymorphismus im IRS-1 Gen, der die Signaltransduktion im p85/PIP3-kinase pathway behindert (Almind et al., 1996; Sesti et al., 2001; McGettrick et al., 2005). Unsere Hypothese war, dass die Träger der Mutation (Arginin-Allele) im Vergleich zu den Trägern des Wildtyps (Glycin-Allele) eine verminderte Insulinwirkung am ZNS haben.

Da wir an diesem Punkt davon ausgehen mussten, dass bei adipösen Patienten neben einer peripheren auch eine zentrale Insulinresistenz vorliegt, wurde darauf geachtet, dass die Träger der Mutation und die Träger des Wildtyps in den Punkten Körpergewicht, Alter und Geschlechtsverteilung einander entsprachen, um eine Beeinflussung der zu untersuchenden Variable (genetischer Faktor) durch eine beeinflussende Variable (Umweltfaktoren) zu vermeiden. Unsere Messungen lieferten interessante Ergebnisse, drei von

ihnen erreichten ein signifikantes Niveau: Beta-Aktivität, Serum-Kalium und Bedürfnis-Fragebogen für Essen.

Die Abbildungen 4 und 5 zur Beta-Aktivität während des Insulinversuchs in Relation zum Kontroll-Placeboversuch zeigen, dass die Beta-Aktivität bei den Wildtypträgern ansteigt, bei den Polymorphismusträgern jedoch nicht. Hieraus lässt sich nun schlussfolgern, dass Insulingabe die spontane Gehirnaktivität im Beta-Band stimuliert (Wildtypträger), und dass eine negative Beeinflussung der Insulinsignaltransduktionskaskade, wie im Falle des Gly972-Arg-Polymorphismus, diese Stimulation verhindert. Dieser Effekt scheint sogar abhängig von der Gendosis zu sein, da, wie Abb. 5 zeigt, der Effekt der spontanen Aktivitätszunahme sich von den Wildtypträgern (hoch ausgeprägt) über die Ein-Allel Polymorphismusträger (nicht mehr oder nur noch minimal vorhanden) bis hin zu dem Zwei-Allelen Polymorphismusträger (Aktivitätsabnahme) negativ entwickelt. Diese Beobachtung kann allerdings nur mit Vorsicht bewertet werden, da die Anzahl der Versuchspersonen in der Zwei-Allelen Polymorphismusgruppe nur eins betrug. Durch das oben beschriebene „matching Verfahren“ lässt sich nun ausschließen, dass der beobachtete Effekt durch beeinflussende Faktoren wie Übergewicht zustande gekommen ist.

Die Serum-Kaliumwerte fallen in beiden Gruppen während des Insulin Clamp proportional zur Insulindosis ab. Interessanterweise zeigt der Kalium-Spiegel der Wildtypgruppe einen stärkeren Abfall als der der Polymorphismusgruppe. Insulin bewirkt eine Stimulation des Na^+/H^+ -Antiporters an der apikalen sowie der Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Zellmembran. Das Ergebnis ist ein verstärkter Eintritt von Kalium aus dem Plasma in die Zellen mit nachfolgendem Absinken des Kalium-Spiegels. Unsere Beobachtung wirft nun die Frage auf, weshalb bei der Polymorphismusgruppe scheinbar eine weniger starke Kalium-Verschiebung nach intrazellulär besteht. Interessanterweise steht unsere Beobachtung im Kontrast zu einer älteren Studie, die den Verlauf der Plasma-Kaliumkonzentration bei sechs gesunden Versuchspersonen, zwei Patienten mit Insulinresistenz und einem Patient mit idiopathischer, nicht-azotämischer

Hyperkaliämie während eines euglykämischen Clamps untersuchte und keine Unterschiede zwischen den gesunden und insulinresistenten Probanden feststellen konnten (Cohen et al., 1991).

Die Serum-Kaliumkonzentration beeinflussende Faktoren wie Insulin und Katecholamine können unseren erhobenen Daten zufolge die Beobachtung nicht erklären (Plasmainsulin ist während der Basalmessung und Stufe 1 bei den Polymorphismusträgern höher und würde bei ihnen einen verstärkten Kalium-Abfall erklären; Adrenalin und Noradrenalin sind in allen Messungen bei der Polymorphismusträgern höher, was wiederum einen verstärkten Abfall in dieser Gruppe erklären würde).

Es blieben so zwei Hypothesen: Entweder beeinflusst eine unbekannte, nicht gemessene Variable die Serum-Kaliumkonzentration oder die Kalium-Transportmechanismen unterliegen einer ähnlichen Resistenzentwicklung gegenüber Insulin wie peripheres Gewebe. Iannello et al. beschreiben in ihrem Übersichtsartikel verschiedene Studien über die Auswirkung von Übergewicht, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Diabetes auf die Na^+/K^+ -ATPase (Iannello et al., 2007). Obwohl einige widersprüchliche Ergebnisse aufgezeigt werden scheint sich ein deutlicher Trend in Richtung Aktivitätsminderung der Na^+/K^+ -ATPase beim Menschen, bedingt durch die oben aufgeführten pathologischen Zustände, abzuzeichnen. Diese, der Insulinresistenz ähnelnde herabgesetzte Fähigkeit zur Stimulation der Na^+/K^+ -ATPase durch Insulin, wäre eine mögliche Erklärung für unsere Beobachtung, dass die Polymorphismusgruppe während des Insulinversuchs signifikant niedrigere Verminderungen des Serum-Kaliumspiegels zeigt. Um diese Frage endgültig zu klären müssten allerdings zusätzliche Studien durchgeführt werden.

Bei dem Bedürfnis-Fragebogen Essen findet sich die gleiche Tendenz des steigenden Hungergefühls mit zunehmender Dauer des Versuchs bei beiden Versuchsgruppen. Korrigiert man den Insulinversuch auf den Kontroll-Placeboversuch, so zeigt sich bei der Wildtypgruppe während der

Insulininfusion ein niedrigeres Bedürfnis zu Essen als bei der Polymorphismusgruppe (siehe Abb. 14).

Dies lässt sich durch die zentrale Insulinwirkung gut erklären, die für die Energiehomöostase eine wichtige Rolle spielt. Das Gehirn moduliert die Nahrungsaufnahme und damit die Energiehomöostase eines jeden Individuums und bedient sich dabei verschiedener Hormone und Signalmoleküle, die in zwei Gruppen unterschieden werden. Eine Gruppe, zu der Insulin und Leptin zählen, gibt Auskunft über die gegenwärtigen Energiereserven und kommunizieren vorwiegend mit dem Nucleus arcuatus des Hypothalamus, wodurch ihre Wirkung NYP und AgRP-Neurone gehemmt werden. Die andere Gruppe besteht aus Stoffen wie CCK, GLP-1 und PYY, die nach Nährstoffaufnahme gebildet werden und demnach einen engeren zeitlichen Wirkungsbereich haben. Die von ihnen übermittelten Informationen werden hauptsächlich in Hinterhirnstrukturen wie dem Nucleus solitarius verarbeitet (Porte et al., 2005).

Insulin und Leptin regulieren im ZNS die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht und die metabolische Homöostase (Schwartz et al., 2000). Ein Insulinanstieg stimuliert über die Hemmung von NYP- und AgRP-Neuronen eine Umstellung der Stoffwechsellage auf katabol und resultiert in einer verminderten Nahrungsaufnahme sowie einer Erhöhung des Energieverbrauchs (Porte et al., 2005). Das Körpergewicht selbst beeinflusst dieses Gleichgewicht allerdings auch: eine Gewichtsabnahme führt zur Verminderung der Insulinausschüttung und damit des Energieverbrauchs, während eine Gewichtszunahme eine Erhöhung der Insulinausschüttung zur Folge hat, die die Nahrungsaufnahme bremst (Woods et al., 1979). Selbst die Leber wird durch die zentrale Insulinwirkung beeinflusst. Obici et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Injektion von Insulin in den 3. Ventrikel des Gehirns eine starke Verminderung der hepatischen Glukoseproduktion zufolge hatte, während die systemische Konzentration von Insulin und anderen glukoregulatorischen Hormonen unverändert blieb (Obici et al., 2002). Dies ist der physiologische Regelkreis in einem gesunden Individuum.

Bezogen auf unsere Studie ist es ersichtlich, dass die Insulinwirkung bei der Wildtypgruppe dem oben beschriebenen Regelkreis folgt. Die Wildtypgruppe zeigt ein vermindertes Hungergefühl im Insulinversuch bezogen auf den Placeboversuch. Hier könnte die zusätzliche Insulininfusion das sich natürlich im Verlauf entwickelnde Hungergefühl unterdrücken.

Bei der Polymorphismusgruppe zeigt sich kein vermindertes Hungergefühl im Verlauf von Insulinversuch relativ zum Placeboversuch. Dies unterstützt die Hypothese einer Verminderung der Insulinwirkung am ZNS durch Behinderung der Insulinsignaltransduktionskaskade, vermittelt durch den IRS-1 Polymorphismus.

Insgesamt konnte dieser Versuch Unterschiede in der zentralen Wirkung des Insulins zwischen der Versuchsgruppe der Wildtypträger und der Versuchsgruppe der Polymorphismusträger aufzeigen. Obwohl bei den magnetencephalographischen Parametern nur die Beta-Aktivität statistisch signifikante Unterschiede lieferte, kann man bei Betrachtung der anderen Parameter Tendenzen ableiten, die in größeren Kollektiven möglicherweise eine statistische Signifikanz erreichen könnten.

Die Theta-Aktivität entwickelt sich bei den Wildtypträgern stetig von negativen Werten auf positive Werte bei einem recht linearen Verlauf. Die Polymorphismusträger dagegen zeigen innerhalb der basalen Messung und Stufe 1 keine Steigerung bei negativen Werten und auf Stufe 2 nur einen schwachen Anstieg auf knapp positive Werte (Abb. 6).

Die mismatch negativity zeigt ein ähnliches Verhalten: steigen bei den Wildtypträgern die Werte konstant an zeigt die Polymorphismusgruppe neben insgesamt niedrigeren Werten einen schwachen Anstieg von Basal auf Stufe 1 und danach sogar einen leichten Abfall auf Stufe 2 (Abb. 7). Passend zu der peripheren Beeinflussung der Insulinsignaltransduktionskaskade zeigen sich im Bereich der Insulinsensitivität bei den Polymorphismusträgern niedrigere Werte

als bei den Wildtypträgern. Auch hier ist der Unterschied nicht signifikant, es könnte allerdings bei größeren Kollektiven eine Signifikanz erreicht werden, die die bisherige Theorie unterstützen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unser Experiment einen weiteren Beweis für die Wirkung von Insulin am Nervensystem und die Bedeutung von genetischen Faktoren im Zusammenhang mit Insulin und dessen Wirkungen im Bereich der Nahrungsaufnahme, zentralnervösen Modulation und allgemeiner Signaltransduktion lieferte. Allerdings stellte sich ein weiteres Mal die Größe und Vernetzung dieses wissenschaftlichen Feldes dar, so dass noch viele Versuche zur Bestätigung bzw. Widerlegung von Theorien folgen müssen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob die Insulinsensitivität des zentralen Nervensystems von einer genetischen Komponente mitbestimmt wird. Nachdem das Gehirn eine lange Zeit als insulinunempfindliches Organ galt, zeigten neuere Studien, dass Insulinrezeptoren mit funktionsfähiger Signaltransduktionskaskade im ZNS vorhanden sind. Es konnten im weiteren Verlauf eine modulierende Wirkung von Insulin auf Energiehomöostase, Kognition, Nahrungsaufnahme und Reproduktion nachgewiesen werden.

Unsere Gruppe konnte in zwei Experimenten den Nachweis erbringen, dass sich die Insulinwirkung am ZNS durch Messung der spontanen und stimulierten kortikalen Aktivität im MEG beurteilen lässt, und dass der Insulineffekt bei übergewichtigen im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden nicht vorhanden ist.

Während bei diesen Experimenten das Hauptaugenmerk auf Umweltvariablen (Gewicht des Probanden, BMI, Körperfett) lag, stellte sich die Frage, ob auch genetischen Variablen eine beeinflussende Rolle zukommt. Um dies zu unter-

suchen wählten wir Probanden mit einem prävalenten Polymorphismus im IRS-1 Gen (Gly972Arg), der zu einer Beeinträchtigung der normalen Signaltransduktion führt und somit möglicherweise Auswirkungen auf die Insulinsensitivität hat.

Um etwaige Auswirkungen auf die Insulinsensitivität des ZNS beurteilen zu können, wurden zu elf Polymorphismusträgern eine gleiche Anzahl von Wildtypträgern gematcht und mittels Magnetencephalographie und 2-stufigen euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp (vs. Kochsalz-Lösung als Placebo) untersucht. Neben der spontanen kortikalen Aktivität (Beta- und Theta-Band) wurde die stimulierte kortikale Aktivität (mismatch negativity) gemessen.

Der Vergleich der ermittelten Daten zeigte signifikante Unterschiede bei der spontanen kortikalen Aktivität im Beta-Band. Der Aktivitätsanstieg unter Insulingabe bei den Wildtypträgern ließ sich bei den Polymorphismusträgern nicht nachweisen. Ein weiterer signifikanter Unterschied ergab sich bei den Bedürfnis-Fragebögen für Essen. Träger des Polymorphismus zeigten im Vergleich zum Placeboexperiment ein unter Insulin höheres Bedürfnis zu Essen als Wildtypträger.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich schließen, dass Insulin die kortikale Aktivität des ZNS beeinflusst. Diese Insulinwirkung am ZNS ist bei Trägern des IRS-1 Gly972Arg Polymorphismus reduziert, was für das Vorhandensein einer genetisch bedingten Insulinresistenz des ZNS spricht. Möglicherweise bedingt diese herabgesetzte Insulinwirkung am ZNS auch eine herabgesetzte Sättigungswirkung von Insulin. Der IRS-1 Polymorphismus könnte somit durch Minderung der zentralen, die Nahrungsaufnahmen modulierenden Insulinwirkung eine Rolle in der Pathogenese von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 spielen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott MA, Wells DG, Fallon JR (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci* 19:7300-7308.
- Almind K, Inoue G, Pedersen O, Kahn CR (1996) A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J Clin Invest* 97:2569-2575.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80.
- Ardlie KG, Lunetta KL, Seielstad M (2002) Testing for population subdivision and association in four case-control studies. *Am J Hum Genet* 71:304-311.
- Banks WA, Kastin AJ (1998) Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* 19:883-889.
- Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18:1257-1262.
- Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ (2003) Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* 1:E20.
- Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM (1988) Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 11:107-111.
- Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92:1824-1830.
- Bingham EM, Hopkins D, Smith D, Pernet A, Hallett W, Reed L, Marsden PK, Amiel SA (2002) The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* 51:3384-3390.
- Bonadonna RC (2004) Alterations of glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. An overview. *Rev Endocr Metab Disord* 5:89-97.
- Broer Y, Lhiaubet AM, Rosselin G, Rostene W (1987) [Radioautographic and quantitative study of insulin binding sites in the rat brain]. *C R Acad Sci III* 304:31-36.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125.
- Campbell IW (2000) Epidemiology and clinical presentation of type 2 diabetes. *Value Health* 3 Suppl 1:3-6.
- Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK (2003) Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14:S233-236.

- Cohen P, Barzilai N, Lerman A, Harel H, Szyzlan P, Karnieli E (1991) Insulin effects on glucose and potassium metabolism in vivo: evidence for selective insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 73:564-568.
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC (1999) Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry* 56:1135-1140.
- Cranston I, Marsden P, Matyka K, Evans M, Lomas J, Sonksen P, Maisey M, Amiel SA (1998) Regional differences in cerebral blood flow and glucose utilization in diabetic man: the effect of insulin. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:130-140.
- Douglas JA, Erdos MR, Watanabe RM, Braun A, Johnston CL, Oeth P, Mohlke KL, Valle TT, Ehnholm C, Buchanan TA, Bergman RN, Collins FS, Boehnke M, Tuomilehto J (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12A1a variant: association with type 2 diabetes and trait differences. *Diabetes* 50:886-890.
- Eastman RC, Carson RE, Gordon MR, Berg GW, Lillioja S, Larson SM, Roth J (1990) Brain glucose metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus: a study in Pima Indians using positron emission tomography during hyperinsulinemia with euglycemic glucose clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1602-1610.
- Fehm HL, Perras B, Smolnik R, Kern W, Born J (2000) Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: a novel approach to neuropharmacology? *Eur J Pharmacol* 405:43-54.
- Florez JC, Burtt N, de Bakker PI, Almgren P, Tuomi T, Holmkvist J, Gaudet D, Hudson TJ, Schaffner SF, Daly MJ, Hirschhorn JN, Groop L, Altshuler D (2004a) Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* 53:1360-1368.
- Florez JC, Sjogren M, Burtt N, Orho-Melander M, Schayer S, Sun M, Almgren P, Lindblad U, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly MJ, Ardlie KG, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L (2004b) Association testing in 9,000 people fails to confirm the association of the insulin receptor substrate-1 G972R polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:3313-3318.
- Gerozissis K (2003) Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol* 23:1-25.
- Giani G, Janka H-U, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, Rathmann W, Rosenbauer J (2005) Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In.
- Gibson SJ (1997) The measurement of mood states in older adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 52:P167-174.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM (2003) Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and

- SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:568-572.
- Hasselbalch SG, Knudsen GM, Videbaek C, Pinborg LH, Schmidt JF, Holm S, Paulson OB (1999) No effect of insulin on glucose blood-brain barrier transport and cerebral metabolism in humans. *Diabetes* 48:1915-1921.
- Hauner H (2006) [The costs of diabetes mellitus and its complications in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 131 Suppl 8:S240-242.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978a) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272:827-829.
- Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein M (1978b) Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5737-5741.
- Heidenreich KA, Toledo SP (1989a) Insulin receptors mediate growth effects in cultured fetal neurons. II. Activation of a protein kinase that phosphorylates ribosomal protein S6. *Endocrinology* 125:1458-1463.
- Heidenreich KA, Toledo SP (1989b) Insulin receptors mediate growth effects in cultured fetal neurons. I. Rapid stimulation of protein synthesis. *Endocrinology* 125:1451-1457.
- Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, Lauro R, Sesti G (2000) The Gly-->Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2004-2013.
- Iannello S, Milazzo P, Belfiore F (2007) Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obes Rev* 8:231-251.
- Jellema A, Zeegers MP, Feskens EJ, Dagnelie PC, Mensink RP (2003) Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia* 46:990-995.
- Kern W, Born J, Schreiber H, Fehm HL (1999) Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men. *Diabetes* 48:557-563.
- Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 74:270-280.
- King GL, Johnson SM (1985) Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* 227:1583-1586.
- Koch M, Rett K, Volk A, Maerker E, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU (1999) Amino acid polymorphism Gly 972 Arg in IRS-1 is not associated to lower clamp-derived insulin sensitivity in young healthy first degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:318-322.
- Lounasmaa OV, Hamalainen M, Hari R, Salmelin R (1996) Information processing in the human brain: magnetoencephalographic approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8809-8815.
- Marchetti P, Lupi R, Federici M, Marselli L, Masini M, Boggi U, Del Guerra S, Patane G, Piro S, Anello M, Bergamini E, Purrello F, Lauro R, Mosca F, Sesti G, Del Prato S (2002) Insulin secretory function is impaired in

- isolated human islets carrying the Gly(972)-->Arg IRS-1 polymorphism. *Diabetes* 51:1419-1424.
- McGettrick AJ, Feener EP, Kahn CR (2005) Human insulin receptor substrate-1 (IRS-1) polymorphism G972R causes IRS-1 to associate with the insulin receptor and inhibit receptor autophosphorylation. *J Biol Chem* 280:6441-6446.
- McKibbin PE, McCarthy HD, Shaw P, Williams G (1992) Insulin deficiency is a specific stimulus to hypothalamic neuropeptide Y: a comparison of the effects of insulin replacement and food restriction in streptozocin-diabetic rats. *Peptides* 13:721-727.
- Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Liu S, Meigs JB, Altshuler DM, Hunter DJ, Manson JE (2003) Prospective study of the association between the proline to alanine codon 12 polymorphism in the PPARgamma gene and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:2915-2917.
- Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M (2001) The Pro12 -->Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:891-894.
- Naatanen R (2003) Mismatch negativity: clinical research and possible applications. *Int J Psychophysiol* 48:179-188.
- Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D (2004) Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 84:623-647.
- Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O (2003) The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 52:573-577.
- Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M (2000) The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* 77:S26-30.
- Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8:1376-1382.
- Pansky B, Hatfield JS (1978) Cerebral localization of insulin by immunofluorescence. *Am J Anat* 153:459-467.
- Park CR (2001) Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 25:311-323.
- Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC (2000) Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 68:509-514.
- Pelosi L, Blumhardt LD (1999) Effects of age on working memory: an event-related potential study. *Brain Res Cogn Brain Res* 7:321-334.
- Pickup J, Williams, G. (2002) *Textbook of Diabetes*: Blackwell Publishing.
- Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW (2005) Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54:1264-1276.

- Porte D, Jr., Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW (1998) Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41:863-881.
- Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G (1999) The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 104:357-364.
- Pratley R (2006) Islet dysfunction: an underlying defect in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35 Suppl 1:6-11; discussion 17-19.
- Rajan AS, Aguilar-Bryan L, Nelson DA, Yaney GC, Hsu WH, Kunze DL, Boyd AE, 3rd (1990) Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care* 13:340-363.
- Schulz LO, Bennett PH, Ravussin E, Kidd JR, Kidd KK, Esparza J, Valencia ME (2006) Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care* 29:1866-1871.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Schwartz MW, Marks JL, Sipols AJ, Baskin DG, Woods SC, Kahn SE, Porte D, Jr. (1991) Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology* 128:2645-2647.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. (1992) Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608-3616.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *Faseb J* 15:2099-2111.
- Shucard DW, Santa Maria MP, Specht CM, Podkulski M (2003) Single-trial latency variability of auditory evoked potentials may indicate immediate memory in the albino rat. *Int J Psychophysiol* 47:229-241.
- Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44:147-151.
- Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S (2004) Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. *Am J Hum Genet* 74:208-222.
- Stumvoll M, Fritsche A, Haring HU (2002) Clinical characterization of insulin secretion as the basis for genetic analyses. *Diabetes* 51 Suppl 1:S122-129.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346.
- Stumvoll M, Fritsche A, Volk A, Stefan N, Madaus A, Maerker E, Teigeler A, Koch M, Machicao F, Haring H (2001) The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to the variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans. *Diabetes* 50:882-885.

- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-77.
- Swidan SZ, Montgomery PA (1998) Effect of blood glucose concentrations on the development of chronic complications of diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 18:961-972.
- Tervaniemi M, Sinkkonen J, Virtanen J, Kallio J, Ilmoniemi RJ, Salonen O, Naatanen R (2005) Test-retest stability of the magnetic mismatch response (MMNm). *Clin Neurophysiol* 116:1897-1905.
- Tschritter O, Preissl H, Hennige AM, Stumvoll M, Porubská K, Frost R, Marx H, Klosel B, Lutzenberger W, Birbaumer N, Haring HU, Fritsche A (2006) The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12103-12108.
- Virally M, Blicke JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ (2007) Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutic perspectives. *Diabetes Metab* 33:231-244.
- Wallum BJ, Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr., Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D (1987) Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab* 64:190-194.
- Watson GS, Peskind ER, Asthana S, Purganan K, Wait C, Chapman D, Schwartz MW, Plymate S, Craft S (2003) Insulin increases CSF Aβ₄₂ levels in normal older adults. *Neurology* 60:1899-1903.
- Weedon MN, Schwarz PE, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, Rathmann W, Selisko T, Schulze J, Owen KR, Evans J, Del Bosque-Plata L, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Bell GI, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM (2003) Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *Am J Hum Genet* 73:1208-1212.
- WHO (2008) Diabetes Fact Sheet. In: World Health Organization website (2008), http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/.
- WHO (2009) WHO Diabetes. In: World Health Organization website (2009), http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/.
- Wolach I, Pratt H (2001) The mode of short-term memory encoding as indicated by event-related potentials in a memory scanning task with distractions. *Clin Neurophysiol* 112:186-197.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Triphosphat
AEP	Akustisch (auditorisch) Evoziertes Potential
AgRP	Agouti-related peptide
ANOVA	Analysis of Variance
Arg	Arginin
ATP	Adenosin-Triphosphat
BE	Blutentnahme
BMI	Body Mass Index
BZ	Blutzucker
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CAPN10	Calpain-10
CCK	Cholezystokinin
E23K	Polymorphismus-Variante in Kir6.2
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EEG	Elektroencephalographie
GH	Growth Hormone
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GIR	Glukoseinfusionsrate
GLP-1	Gluckagon-like Petide-1
GLUT	Glukosetransporter
Gly	Glycin
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 (Gen)
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
Hz	Hertz
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
IRS	Insulin-Rezeptorsubstrat
KHK	Koronare Herzkrankheit

Kir6.2	Untereinheit eines ATP-sensitiven Kaliumkanals
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEG	Magnetencephalographie
MMN	Mismatch negativity
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NaCl	Natrium-Chlorid
NPY	Neuropeptid Y
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheiten
PDX-1	Pancreas Duodenum Homeobox-1
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
POMS	Profile of Mood States
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PYY	Peptid YY
Ras	G-Protein, beteiligt an zellulärer Signaltransduktion
RAS	Familie von Genen, die an zellulärer Signaltransduktion beteiligt sind
SNP-44	Single Nucleotide Polymorphism
SOS	Son of sevenless, Protein der Signaltransduktionskaskade, welches Ras aktiviert
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
STH	Somatotropes Hormon
SUR1	Sulfonyl Urea Receptor
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VP	Versuchsperson
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer von Seiten der Medizinischen Klinik, Herr Prof. Dr. med. Andreas Fritsche, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die fachliche Beratung, die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation und für seine Geduld und Mühe.

Herrn Dr. rer. nat. Hubert Preissl danke ich für die Betreuung von Seiten des MEG-Zentrums, die jahrelange Begleitung, die Hilfe bei der Durchführung der Messungen sowie der Auswertung der Daten, die konstruktiven Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. med. Otto Tschritter danke ich für die Hilfestellung bei der Datenverarbeitung und der Erstellung von Grafiken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der TULIP-Gruppe, Frau Heike Luz, Frau Anna Teigeler und Frau Elke Maerker sowie des MEG-Zentrums, Frau Gabi Walker und Herrn Jochen Dax herzlich für die technische Betreuung, die Unterstützung bei der Datengewinnung und die professionelle Beratung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den Teilnehmerinnen und Teilnehmern dieser Studie, die sich geduldig einer mehrstündigen Untersuchung unterzogen haben, um der Forschung zu dienen und mir den Abschluss meiner Arbeit zu ermöglichen.

Björn und Jasmin Hoeckele danke ich für die Hilfe bei der Ausgestaltung meiner Dissertation.

Meinen Eltern danke ich für die unermüdliche Unterstützung und die unzähligen Hilfestellungen im Verlauf meines gesamten Studiums.

Lebenslauf

Name: Benjamin Klösel
Geburtsdatum/-ort: 04.03.1980 in Offenbach am Main
Nationalität: Deutsch

Schulische Ausbildung, Zivildienst:

07/1999 – 07/2000 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund Offenbach
07/1991 – 06/1999 Albert-Schweitzer-Gymnasium Offenbach am Main
• 18.06.1999: Abitur
07/1987 – 06/1991 Lauterbornschule Offenbach am Main

Hochschulstudium:

08/2001 – 11/2008 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
• 25.11.2008: Approbation
• 21.11.2008: Ärztliche Prüfung
• 25.03.2003: Ärztliche Vorprüfung
08/2005 – 08/2007 Studium der Biomedizinischen Wissenschaften an der University of Toledo, Toledo, OH, USA
• 04.08.2007: Master of Biomedical Sciences in Cancer Biology
03/2001 – 08/2001 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Beruflicher Werdegang:

seit 07/2009 Assistenzarzt der Inneren Medizin an der Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
02/2009 – 05/2009 Assistenzarzt der Anästhesie am Verbundkrankenhaus Bernkastel/ Wittlich
07/2007 – 08/2008 Praktisches Jahr am Texas Children's Hospital in Houston, TX (Pädiatrie), New York-Presbyterian Hospital in New York, NY (Innere Medizin), Cleveland Clinic in Cleveland, OH (Innere Medizin), Brigham and Women's Hospital in Boston, MA (Innere Medizin) und Klinikum am Steinberg in Reutlingen (Chirurgie)