

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

**Polymorphismen im Transkriptionsfaktor 7-like2 Gen
und die Auswirkungen auf die GLP-1-induzierte
Insulinsekretion**

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

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

**vorgelegt von
Cornelia Laudenschach
aus
Rottweil
2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Fritsche

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Meinem Bruder Thomas

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus Typ 2.....	1
1.2 Insulin: Struktur, Synthese, Sekretion und Wirkung.....	3
1.3 Genetische Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2	4
1.4 Polymorphismen	6
1.5 Transkriptionsfaktoren	6
1.5.1 Der Transkriptionsfaktor 7-like-2 (TCF7L2)	7
1.6 Inkretine	8
1.6.1 Geschichte des Inkretinkonzeptes.....	8
1.6.2 Definition der Inkretine	9
1.6.3 Inkretin-Hormone.....	9
1.7 Fragestellung und Hypothese	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Studienaufbau.....	14
2.2 Probanden	15
2.2.1 Teilnahmevoraussetzungen	15
2.2.2 Teilnehmer	16
2.3 Versuchsablauf	18

Inhaltsverzeichnis

2.3.1 Oraler Glukosetoleranztest: OGTT	18
2.3.2 Kombiniertes intravenöses Glukosetoleranztest (IVGTT) und euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	18
2.3.4 Hyperglykämischer Clamp mit zusätzlicher GLP-1-Infusion und Arginin-Bolus-Gabe	20
2.4 Verwendete Medikamente	21
2.4.1 Oraler Glukosetoleranztest: OGTT	21
2.4.2 Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	21
2.4.3 Hyperglykämischer Clamp mit GLP-1-Infusion und Arginin-Bolus ...	22
2.5 Analytik	23
2.5.1 Blutglukose	23
2.5.2 Insulin, C-Peptid und Proinsulin	23
2.5.3 GLP-1	24
2.5.4 Genotypisierung	24
2.6 Berechnungen	25
2.6.1 Body-Mass-Index (BMI)	25
2.6.2 OGTT	25
2.6.3 IVGTT	26
2.6.4 Hyperglykämischer Clamp	26
2.7 Statistische Methoden	27

3 Ergebnisse	29
3.1 Genetische Varianten im TCF7L2-Gen.....	29
3.2 Orale Glukosetoleranztest OGTT	29
3.3 Kombiniertes intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT) und euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	37
3.4 Hyperglykämischer Clamp	38
4 Diskussion	44
4.1 Polymorphismen im TCF7L2-Gen	44
4.2 TCF7L2-Polymorphismus im OGTT	45
4.3 TCF7L2-Polymorphismus im IVGTT	46
4.4 TCF7L2-Polymorphismus im hyperglykämischen Clamp.....	47
4.5 Gründe für eine gestörte GLP-1-induzierte Insulinsekretion	48
4.6 Schlussfolgerung	50
5 Zusammenfassung	51
6 Anhang	53
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	53
6.2 Tabellenverzeichnis	55
6.3 Abbildungsverzeichnis	56
7 Literaturverzeichnis	57

8 Danksagung.....	63
9 Lebenslauf	64

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus ist eine der wichtigsten und häufigsten internistischen Erkrankungen weltweit und die Anzahl der Betroffenen nimmt ständig zu. Im Jahr 2000 waren bereits 171 Millionen Menschen betroffen und für 2030 werden die Zahlen auf 366 Millionen geschätzt [59]. Allein in Deutschland leben fast 6 Millionen Diabetiker.

Die American Diabetes Association teilt den Diabetes mellitus anhand verschiedener Pathogenesen in 4 Hauptgruppen ein [2]:

- I. Diabetes mellitus Typ 1 mit Beta-Zellzerstörung des Pankreas mit absolutem Insulinmangel
- II. Diabetes mellitus Typ 2 mit Insulinresistenz und/oder Defekt der Beta-Zellsekretion
- III. Andere Formen des Diabetes mellitus
- IV. Schwangerschaftsdiabetes mellitus

Die häufigsten Krankheitsformen sind der Typ-1-Diabetes mellitus und Typ-2-Diabetes mellitus, der bei 95% aller Diabetiker vorliegt.

Bei Diabetes mellitus Typ 2 handelt es sich um eine chronische Störung des Glukosestoffwechsels, bei der es aufgrund einer eingeschränkten Wirksamkeit des Insulins am Gewebe, der so genannten Insulinresistenz, und einer gestörten Beta-Zellfunktion zu einem Ungleichgewicht zwischen Insulinangebot und Insulinwirkung kommt.

Häufig tritt der Diabetes mellitus Typ 2 im Rahmen des sogenannten „Metabolischen Syndroms“ auf. Unter diesem Krankheitsbild sind verschiedene Erkrankungen zusammengefasst [64]. Dazu gehören Bluthochdruck, Adipositas, Dyslipoproteinämie, Mikroalbuminurie, Insulinresistenz und ein

gestörter Glukosestoffwechsel [41]. Patienten, die nach dem Body-Mass-Index nicht unter Adipositas leiden, zeigen oft einen erhöhten Anteil an abdominellem Fett. Sehr selten tritt bei dieser Form des Diabetes auch eine Ketoazidose meist im Zusammenhang mit leichten Infektionen auf [2].

Der Typ-2-Diabetes an sich kann viele Jahre asymptomatisch verlaufen, da sich die Hyperglykämie allmählich entwickelt und in frühen Stadien oft nicht schwer genug ist, um vom Patienten mit den klassischen Symptomen wahrgenommen zu werden. Zu den Symptomen des Diabetes mellitus zählen unter anderem Müdigkeit, Leistungsschwäche, Gewichtsabnahme, Polyurie, Polydipsie, Pruritus und Zeichen der Abwehrschwäche. Bei Diagnosestellung sind deshalb bereits oft schon Folgeschäden wie Mikroangiopathien (Retinopathie, Nephropathie, Neuropathien) und Makroangiopathien (kardiovaskuläre Erkrankungen, arterielle Verschlusskrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankungen) vorhanden [5, 64]. Als häufigste Todesursache von Typ-2-Diabetikern ist die koronare Herzkrankheit zu nennen [20, 40, 44].

Um das Auftreten des Diabetes selbst und seiner Folgeschäden zu verringern oder gar zu verhindern, ist es wichtig, die Auslöser zu kennen, die schließlich zum Diabetes mellitus Typ 2 führen.

Es konnte gezeigt werden, dass es für den Diabetes mellitus Typ 2 nicht nur einen Auslöser gibt, sondern dass der Erkrankung eine multifaktorielle Genese zugrunde liegt. Sowohl genetische Faktoren als auch äußere Einflüsse und Umweltfaktoren spielen bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle [2, 19, 52].

Auf biochemischer Ebene wird als Ursache des Typ-2-Diabetes sowohl eine Störung der Insulinsekretion der Beta-Zelle des Pankreas als auch eine periphere Resistenz gegenüber Insulin zugrunde gelegt. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen Glukoseangebot und -abbau und somit zu einem dauerhaften Anstieg des Blutzuckerspiegels [15, 30, 39, 46, 52].

1.2 Insulin: Struktur, Synthese, Sekretion und Wirkung

Insulin ist ein Proteohormon, das aus zwei Peptidketten besteht, welche durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und über eine dritte stabilisiert werden. Die Synthese und Sekretion erfolgt im endokrinen Anteil des Pankreas, in den Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln. Wie bei allen sekretorischen Peptiden erfolgt die Biosynthese des Insulins über ein Vorläuferpeptid: Prä-Proinsulin gelangt in das raue Endoplasmatische Retikulum der Beta-Zelle. Nach proteolytischer Abspaltung des Signalpeptids entsteht Proinsulin. Dies unterscheidet sich vom fertigen Insulin nur noch durch die C-Sequenz. Insulin wird im Golgi-Apparat durch Entfernung des C-Peptids gebildet. Die Insulinmoleküle verbinden sich mit Zink-Ionen und werden nun als stark kondensierte Zinkkomplexe in den Granula der Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln bis zu ihrem Gebrauch gespeichert [26, 30].

Die Insulinsekretion hängt von der extrazellulären Glukosekonzentration ab. Unter normalen Bedingungen folgt jeder Erhöhung der Blutglukosekonzentration ein Anstieg der Insulinkonzentration im peripheren Blut. Die Beta-Zellen nehmen Glukose entsprechend der Blutkonzentration über das insulinunabhängige Glukosetransportprotein 2 (GLUT-2) auf. Jede Steigerung des Glukoseumsatzes in der Beta-Zelle resultiert aufgrund von Abbauprozessen in einem Anstieg des ATP-Spiegels. Dies führt zur Hemmung eines ATP-empfindlichen K^+ -Kanals in der Plasmamembran der Beta-Zellen, was eine Depolarisation auslöst. Daraufhin öffnet sich ein spannungsregulierter Ca^{2+} -Kanal und Kalzium strömt in die Zelle hinein, was zu einer Ausschüttung der Insulin-Vesikel führt. Somit stellt nicht das Glukosemolekül selbst, sondern die bei seinem Abbau entstehenden Stoffwechselprodukte das Signal für die Depolarisation und die folgende Insulinfreisetzung dar [26, 30].

Das aus den Beta-Zellen freigesetzte Insulin wirkt nicht auf alle Zellen in gleichem Maße und seine Wirkungen sind unterschiedlich. Die wichtigste Wirkung ist jedoch die Aufnahme der Glukose in die Zelle und der daraus

resultierende Blutglukoseabfall. In der Muskel- und Fettzelle ist der insulinabhängige Glukosetransporter 4 (GLUT-4) daran beteiligt, welcher die Glukoseaufnahme durch erleichterte Diffusion katalysiert. In der Leber wird der Glukosetransport über GLUT-2 insulinunabhängig über die Glukosekonzentration gewährleistet. Die gesteigerte Glukoseaufnahme führt in Leber und Skelettmuskulatur zur Aktivierung der Glykogen-Biosynthese, parallel werden Glykogen-Abbau und Glukoneogenese gehemmt. Im Fettgewebe sinkt die Lipolyse, die Liponeogenese steigt hingegen. Insulin ist somit das einzige Hormon, welches unser Fett in den Depots hält. Desweiteren fördert Insulin die Aufnahme verschiedener Aminosäuren in Geweben und damit die Proteinbiosynthese.

1.3 Genetische Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2

Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim Diabetes mellitus um eine multifaktorielle Erkrankung, die sowohl von Umweltfaktoren als auch von genetischen Faktoren bestimmt wird. Dass die genetischen Faktoren eine wichtige Rolle spielen, konnte anhand von Zwillingsstudien gezeigt werden: Bei eineiigen Zwillingen trat der Diabetes mellitus in 50-95 % der Fälle bei beiden auf, bei zweieiigen betrug die Übereinstimmung nur noch 10-15%. Einen weiteren Anhalt für die genetische Komponente des Diabetes mellitus liefert auch das gehäufte Auftreten der Erkrankung innerhalb einer Familie. Bei einem betroffenen Elternteil liegt das Risiko einen Diabetes mellitus zu entwickeln bei 40 %, sind beide Elternteile betroffen erhöht sich das Risiko auf 70%. Die hohe Prävalenz in bestimmten ethnischen Gruppen spricht ebenfalls für eine genetische Ursache.

Die Formen des Diabetes mellitus Typ 2 kann man in zwei Gruppen einteilen: monogen und polygen. Monogene Formen sind die Konsequenz seltener Mutationen innerhalb eines einzigen Gens, zeigen eine starke phänotypische Penetranz und werden meist im frühen Lebensalter diagnostiziert. Zu den

monogenen Formen zählt unter anderem MODY (maturity-onset diabetes of youth), der autosomal-dominant vererbt wird. Bis jetzt konnten sechs verantwortliche Gene als Auslöser der Erkrankung gefunden werden, anhand derer man die Unterformen MODY 1-5 voneinander unterscheiden kann. Allesamt beeinträchtigen die reguläre Beta-Zell-Sekretion. Weitere monogene Formen des Diabetes sind MIDD (maternal inherited diabetes with deafness), der auf Mutationen in der Mitochondrien-DNA beruht, und Syndrome der Insulinresistenz, die Mutationen im Insulinrezeptor zeigen. Die monogenen Formen machen allerdings nur etwa 5-10% aller Diabetes mellitus Typ 2 Fälle aus.

Die polygenen Formen des Diabetes konnten noch nicht genau entschlüsselt werden. Unterschiedliche Kombinationen von verschiedenen Genen interagieren mit verschiedenen Umweltfaktoren und die Aufschlüsselung der einzelnen Gene ist schwierig. Die genetische Heterogenität mit unterschiedlichen Genen, die in unterschiedlichen Populationen zu Diabetes mellitus Typ 2 führen und das Vorhandensein verschiedener Subtypen des Diabetes mellitus machen die Suche nach verantwortlichen Genen zu einer großen Herausforderung. Mutationen in Genen, die bisher mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert wurden, sind unter anderem bei Calpain-10, einer Cystein-Protease, Kir6.2, einer Untereinheit eines ATP-abhängigen K^+ -Kanal und bei PPAR γ , einem Transkriptionsfaktor gefunden worden. Bei den Veränderungen von Calpain-10 handelt es sich um die Polymorphismen SNP41 und SNP43, bei Kir6.2 wurden Polymorphismen bei Glu23Lys gefunden und bei PPAR γ handelt es sich um den Polymorphismus von Pro12Ala. [3, 4, 28, 31, 46, 51, 55]

1.4 Polymorphismen

Unter einem genetischen Polymorphismus versteht man einen durch Mutation entstandenen Unterschied in der Nukleotidsequenz homologer DNA-Bereiche. Hierbei kommt es zu verschiedenen Allelen, von denen das seltenere Allel mit einer Häufigkeit von über 1% vorkommen muss, damit man von einem Polymorphismus sprechen kann. Der Nachweis der Polymorphismen erfolgt meist auf biochemischem Wege, vorwiegend durch Elektrophorese oder mit molekularbiologischen Methoden. Mit Hilfe der Polymorphismen können über den Einsatz von DNA-Markern in Kopplungsanalysen monogene Erkrankungen erkannt werden. In der Populationsgenetik dienen mitochondriale Polymorphismen als diagnostisches Mittel und der Analyse des menschlichen Genoms, so dass Polymorphismen auch bei der Entschlüsselung von genetisch bedingten Krankheiten eine entscheidende Rolle spielen [53].

1.5 Transkriptionsfaktoren

Die Regulation der Genexpression ist ein entscheidender Schritt in der Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts. Die Mehrheit der regulierenden Ereignisse findet während der Transkription, dem „Abschreiben“ der DNA in mRNA, statt. Um mit der Transkription beginnen zu können, benötigt die RNA-Polymerase II sogenannte Transkriptionsfaktoren. Sie binden an mehreren kurzen Sequenzelementen in der direkten Nähe eines Gens, den sogenannten Promotoren, an die DNA und weisen so der Polymerase den Weg. Eine immer länger werdende Liste von Krankheiten resultiert anhand genetischer Defekte in den Transkriptionsfaktoren. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Mutationen, die anschließend zu vielerlei Effekten führen, da die Transkriptionsfaktoren die Expression mehrerer Gene kontrollieren [43, 54, 57].

1.5.1 Der Transkriptionsfaktor 7-like-2 (TCF7L2)

Auf der Suche nach genetischen Komponenten für ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 stellten Grant et al. 2006 eine Verbindung zu Chromosom 10 in der Bevölkerung Islands fest [18]. Bei einer Analyse mit Mikrosatelliten-Markern identifizierten sie einen Zusammenhang zwischen DG10S478 und Diabetes mellitus Typ 2. Bei DG10S478 handelte es sich um eine Gen-Region des Polymorphismus in Form eines Tetranucleotid-Repeats mit 6 Allelen, von denen die Allele 0, 8 und 12 insgesamt 98% der Chromosomen in den Bevölkerungskontrollen ausmachten. Allel 0 zeigte eine protektive Verbindung zu Diabetes und alle Allele außer 0 wurden als Allel X definiert. Es zeigte sich ein erhöhtes relatives Risiko von 1,5 für Diabetes bei Trägern von Allel X im Vergleich zu Nicht-Trägern des Allels. DG10S478 befindet sich im Intron 3 des TCF7L2-Gens auf Chromosom 10q25.2. Bei weiteren Untersuchungen fand man verschiedene SNPs (single nucleotide polymorphism), von denen die folgenden fünf die stärkste Korrelation zu DG10S478 zeigten: rs12255372, rs7903146, rs7901695, rs11196205 und rs7895340. Diese fünf SNPs zeigten alle eine Assoziation zu Diabetes mellitus Typ 2, wobei die T-Allele von rs12255372 und rs7903146 eine vergleichbar starke und rs7903146 insgesamt die stärkste Verbindung zeigten [18].

Nachfolgend konnte in vielen Studien weltweit der Zusammenhang zwischen TCF7L2 und Diabetes mellitus Typ 2 bestätigt werden. Träger von Polymorphismen im TCF7L2 Gen zeigten auch eine deutlich verminderte Insulinsekretion, wobei die größte Bedeutung den Polymorphismen rs12255372 und rs7903146 zugeschrieben wird [6, 9, 10, 29, 47, 48, 62, 63]. Welche Mechanismen dahinter stecken könnten, untersuchten wir im Folgenden anhand der GLP-1-induzierten Insulinsekretion.

1.6 Inkretine

1.6.1 Geschichte des Inkretinkonzeptes

Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts entdeckten Bayliss und Starling, dass saure Extrakte der Darmschleimhaut einen Faktor enthalten, der in der Lage ist, die Pankreassekretion zu stimulieren. Diesen Faktor nannten sie Sekretin [36]. 1906 postulierten Moore, Edie und Abram, dass Extrakte des Duodenum in der Lage seien, die Insulinsekretion zu stimulieren [35]. 20 Jahre später zeigten La Barre und seine Kollegen, dass die Gabe von Sekretin eine Hypoglykämie durch die Stimulation des Pankreas hervorruft. Sie kamen zu dem Schluss, dass Sekretin zwei aktive Prinzipien enthält: Zum einen „Inkretin“, das die endokrine Sekretion des Pankreas stimuliert und zum anderen „Exkretin“, welches das exokrine Pankreas anregt [7]. Zur selben Zeit arbeiteten Heller et al. mit einem Extrakt aus dem Duodenum, das den Blutzucker bei intravenöser und oraler Gabe im Zustand der Hyperglykämie senkte. Dieses nannte er später „Duodenin“. In den darauf folgenden 30 Jahren blieb die Inkretinfrage unbeobachtet und erst mit der Etablierung des Radioimmunoassays für Insulin kam es in den 60er Jahren zu einer erneuten bis heute anhaltenden Beschäftigung mit dem Inkretinkonzept. Es gelang der radioimmunologische Nachweis, dass die orale Gabe von Glukose zu höheren Insulinspiegeln im Plasma führte als die intravenöse Gabe, selbst wenn die Blutglukosespiegel den gleichen Wert erreichten. Dieses Phänomen wird als Inkretineffekt bezeichnet und wurde 1964 von Elrick et al. und McIntyre durch unabhängige Versuche bestätigt [13, 33]. 1967 wurde von Perley und Kipnis errechnet, dass die Hälfte des Insulins, das nach einer oralen Glukosegabe sezerniert wird, mit Hilfe gastrointestinaler Faktoren freigesetzt wird [42].

Sämtliche Verbindungen zwischen Dünndarm und endokrinem Pankreas wurden 1969 von Unger und Eisentraut unter dem Begriff der „entero-insulären Achse“ zusammengefasst; hierzu gehören die gastrointestinalen Inkretine, direkte oder über das ZNS geschaltete neurale Verbindungen und die

Insulinsekretion-steigernden Substrate wie z.B. Glukose und einige Aminosäuren [56].

1.6.2 Definition der Inkretine

Man hat mittlerweile viele gastrointestinale Hormone und Neuropeptide entdeckt, die in der Lage sind, unter bestimmten Bedingungen, die Insulinsekretion zu steigern. Um jedoch von einem Inkretin im engeren Sinne sprechen zu können, stellte Creutzfeldt 1979 folgende Anforderungen an das Hormon:

1. es wird nach Nahrungsmittelaufnahme, vor allem nach oraler Aufnahme von Kohlenhydraten freigesetzt
2. es stimuliert die Insulinsekretion in Anwesenheit von Glukose, mit betonter Steigerung der Insulinsekretion bei Blutglukosewerten innerhalb des postprandialen Bereichs [7, 36].

1.6.3 Inkretin-Hormone

Bisher erfüllen nur zwei der vielen gastrointestinalen Hormone all diese Anforderungen beim Menschen: GIP (Gastric Inhibitory Peptide, auch Glucose-dependent-insulinotropic Peptide) und GLP-1 (Glukagon like Peptide -1) [12].

GIP

GIP wurde als eines der ersten Inkretinhormone 1973 entdeckt [11]. Es ist ein Peptid aus 42 Aminosäuren, das aus einem Vorläuferpeptid mit 153 Aminosäuren entsteht und gehört zu der Glukagon-Sekretin-Familie. GIP wird von speziellen endokrinen Zellen, den sogenannten K-Zellen sezerniert, die hauptsächlich im Duodenum vorkommen, aber auch im oberen Jejunum zu

finden sind. Hauptsekretionsreize sind Glukose, einige andere Mono- und Disaccharide sowie Triglyzeride. Aus diesem Grund gilt die Nahrungsaufnahme als stärkster Reiz und ein Anstieg der Plasmakonzentration erfolgt bereits nach 15 Minuten mit einem Maximum nach 1-3 Stunden. GIP wird jedoch nur dann sezerniert, wenn die Nahrung auch resorbiert wird. Eine alleinige Anwesenheit der Nährstoffe im Darmlumen reicht nicht aus.

Die wesentliche Wirkung von GIP, die Insulinsekretionssteigerung, wird über den GIP-Rezeptor vermittelt, der sich in den Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln, aber auch im Magen, im Fettgewebe, am Herzen und in verschiedenen Regionen des Gehirns befindet. Die Wirkung von GIP ist stark glukose-abhängig. So wird bei normalen Nüchtern-Glukosewerten, also im euglykämischen Stadium, die Insulinsekretion nur wenig stimuliert, mit steigender Hyperglykämie steigt sie jedoch deutlich an. Verabreicht man GIP intravenös bis zu Plasmakonzentrationen, die denen nach einer Mahlzeit entsprechen, so ist die Insulinsekretionsantwort vergleichbar mit einer, die nach oraler Glukosebelastung gefunden wird [7, 12, 23, 25, 36].

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist die insulinotrope Wirkung von GIP stark vermindert. Zunächst vermutete man, dass bei den Betroffenen der GIP-Rezeptor vermindert exprimiert würde. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass bei einer Bolusinjektion von GIP die insulinotrope Wirkung nicht wesentlich geringer ausfällt als bei Stoffwechselgesunden, bei einer Dauerinfusion mit sehr hohen Dosen jedoch keine Reaktion der Langerhans'schen Inseln mehr erfolgt. Dies spricht eher für eine Abschwächung der Rezeptoren als für eine Abwesenheit. Bei einigen Untersuchungen konnte eine gesteigerte GIP-Sekretion gefunden werden, was auf Dauer vielleicht die Abschwächung der Rezeptoren erklären könnte [24, 27, 36, 37, 38, 58].

GLP-1

GLP-1 ist ein Peptid aus 30 Aminosäuren und ein Produkt des Glukagon-Gens. Das primäre Translationsprodukt, Proglukagon, besteht aus 160 Aminosäuren und beinhaltet außer der Glukagonsequenz zwei weitere Glukagon-ähnliche (Glukagon-like) Sequenzen: GLP-1 und GLP-2. Sie sind Glukagon-ähnlich, da sie zu 50% homolog zu Glukagon sind. Während des Processings des Prohormons im Pankreas wird die Glukagon-Sequenz abgespalten und der Teil, der die GLPs beinhaltet, wird als einzelnes großes Peptid sezerniert. Im Magen verbleibt die Glukagon-Sequenz in Form eines inaktiven, größeren Peptids namens Glicentin und die zwei Glukagon-like-Peptide werden geteilt und einzeln parallel mit Glicentin sezerniert. Glicentin kann weiter zu Oxyntomodulin umgewandelt werden, das einige biologische Fähigkeiten von Glukagon beinhaltet, aber weniger potent ist und in zu geringen Konzentrationen vorkommt, um wirken zu können.

GLP-1 wird ebenfalls von speziellen endokrinen Zellen sezerniert und zwar von den sogenannten L-Zellen, die sich hauptsächlich im unteren Dünndarm und Dickdarm befinden und auf Kohlenhydrate und Fett mit Sekretion von GLP-1 reagieren. Bereits 5-30 Minuten nach Nahrungsaufnahme erfolgt die Antwort der L-Zellen, was aufgrund der distalen Lage im unteren Darmbereich zu Spekulationen führte, ob nicht noch andere Mechanismen eine Rolle bei der GLP-1-Sekretion spielen. Es werden heute ein direkter Mechanismus über einzelne L-Zellen im oberen Magen-Darm-Trakt und ein indirekter Mechanismus über Hormone aus dem oberen Dünndarm oder über das enterale Nervensystem diskutiert. GLP-1 nimmt ebenfalls wie GIP Einfluss auf die Insulinsekretion. Sein Wirkmechanismus ist an einen speziellen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aus der Glukagon-Familie gebunden, der auch in den Beta-Zellen des Pankreas zu finden ist. Über eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase steigt der cAMP-Spiegel, K⁺-Kanäle schließen sich, Ca²⁺ strömt aufgrund der Depolarisation in die Zelle ein und Insulin-Vesikel entleeren sich.

GLP-1 potenziert die Wirkung von Glukose auf die Insulinsekretion. GLP-1 stimuliert jedoch nicht nur die Insulinsekretion, es nimmt auch einen Einfluss auf die Insulin-Synthese, die Neubildung von Beta-Zellen, die Regeneration von Langerhans'schen Zellen und ist somit ein wichtiger Faktor in der Regulation der Beta-Zell-Masse. Eine weitere Wirkung von GLP-1 ist der Einfluss auf die Glukagon-Sekretion. Im Zustand einer Hyperglykämie wird die Glukagon-Sekretion deutlich gehemmt. Somit hat GLP-1 eine doppelte Wirkung auf die Langerhans'schen Inseln: Stimulation der Insulinsekretion und Hemmung der Glukagon-Sekretion. Eine dritte Wirkung von GLP-1 ist die Verzögerung der Magenentleerung, die auch bei normalen Glukosekonzentrationen zu finden ist. Und schließlich führt GLP-1 auch zu einer Verminderung des Appetits und Verstärkung des Sättigungsgefühls, was zu einer verminderten Kalorienaufnahme führt. In dieser Wirkungsweise unterscheidet sich GLP-1 ganz deutlich von GIP, da dieses hierbei keinerlei Einfluss nimmt [1, 11, 14, 22, 23, 25, 36].

Der Inkretineffekt ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 abgeschwächt, was in einer niedrigen Insulinsekretion im Anschluss an eine Mahlzeit resultiert. Neuere Studien haben gezeigt, dass auch die GLP-1-Sekretion vermindert ist und es so zu einem abgeschwächten Inkretineffekt kommen könnte. In Studien konnten bei intravenöser Gabe von GLP-1 die Blutzuckerwerte in Normalbereiche gebracht werden und bei dauerhafter subkutaner Gabe von GLP-1 über 6 Wochen verbesserten sich die durchschnittlichen Plasmaglukosekonzentrationen, der HbA1c, die Anzahl der freien Fettsäuren und die Probanden zeigten eine deutliche Gewichtsabnahme und eine Steigerung der Insulinsekretion. Es zeigte sich jedoch auch, dass einzelne subkutane Gaben von GLP-1 nur sehr kurz wirksam sind und nach 60 Minuten keinerlei Wirkung mehr zeigen. Das liegt an der schnellen Inaktivierung durch die ubiquitär vorkommende Dipeptidyl-Peptidase IV, die das N-terminale Ende von GLP-1 abspaltet und es so in einen Antagonisten des GLP-1-Rezeptors umwandelt. Bei möglichen Behandlungsansätzen des Diabetes mellitus Typ 2 mit GLP-1 muss dieses Problem beachtet werden [14, 17, 22, 25, 61].

1.7 Fragestellung und Hypothese

Welcher pathogenetische Mechanismus der verminderten Insulinsekretion bei Trägern von Polymorphismen im TCF7L2-Gen genau zugrunde liegt, ist bisher noch nicht klar.

TCF7L2 ist eine essentielle Komponente des sogenannten „wingless-type MMTV integration site family member 1 (WNT)“-Signalweges, welcher für die GLP-1- Expression und GLP-1-Sekretion durch die endokrinen L-Zellen mitverantwortlich ist [50]. Ein Polymorphismus im TCF7L2-Gen könnte somit zu einer Veränderung im WNT-Signalweg führen und eine veränderte GLP-1-Sekretion oder GLP-1-Wirkung zur Folge haben. Dies würde dann in einer veränderten Insulin-Sekretion resultieren.

Um diese Hypothese zu untersuchen, analysierten wir bei Trägern des Polymorphismus rs7903146, welcher am stärksten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist [18], verschiedene Aspekte der Insulinsekretion bei Probanden mit erhöhtem Diabetesrisiko.

Wir untersuchten die Effekte des Polymorphismus rs7903146 im TCF7L2 Gen auf den Blutzucker und die Insulinsekretion während eines oralen Glukose-Toleranztestes (OGTT). Ferner wurde die GLP-1-Sekretion während des OGTTs untersucht. Außerdem untersuchten wir den Einfluss des Polymorphismus rs7903146 auf die Insulinsekretion während eines intravenösen Glukose-Toleranztestes (IVGTT) und während eines hyperglykämischen Clamps. Zudem untersuchten wir die Auswirkungen des Polymorphismus auf die GLP-1-induzierte Insulin-Sekretion mittels eines erweiterten hyperglykämischen Clamps mit zusätzlicher GLP-1-Infusion.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die Untersuchungen fanden im Rahmen der TULIP-Studie (Tübinger Lebensstil Interventions Programm) statt. Seit mehreren Jahren besteht an der Universität Tübingen eine Studie, in der Daten zu Risikoprofilen von Menschen mit erhöhtem Krankheitsrisiko für den Typ-2-Diabetes erhoben werden (TÜF= Tübinger Familien Studie). Im Rahmen dieser Studie wird in der TULIP-Studie Menschen mit einem erhöhten Risiko, eines Tages an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, die kostenlose Teilnahme an einem mehrjährigen Präventionsprogramm angeboten, das zu Beginn und im Laufe der Jahre spezielle Untersuchungen beinhaltet. Ziel der Studie ist es, Langzeitprädiktoren zu entwickeln, aus denen man ablesen kann, wer trotz Lebensstiländerung später einmal einen Diabetes mellitus bekommen wird, wer nicht und aus welchen Gründen nicht. Ziel der Studie ist es außerdem, herauszufinden, wer von verschiedenen Maßnahmen wie Sport oder Diäten besonders profitiert und wer für eine mögliche frühe medikamentöse Therapie in Frage kommt.

Die Probanden wurden im Voraus mündlich und schriftlich über die jeweiligen Untersuchungen, deren Durchführung, Ziele und mögliche Risiken aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung. Über genetische Analysen wurde zusätzlich aufgeklärt. Die Teilnehmer hatten die Möglichkeit, jederzeit ihre Einwilligung zurückzunehmen und aus der Studie auszusteigen. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen geprüft.

2.2 Probanden

2.2.1 Teilnahmevoraussetzungen

Als Teilnehmer suchten wir Personen mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2. Dieses ist bei Verwandten ersten Grades von Diabetes-Typ-2-Patienten stark erhöht und somit stellen sie das ideale Teilnehmerfeld dar.

Als Einschlusskriterien dienten:

- Verwandte ersten Grades von Typ-2-Diabetikern
- ein früherer Schwangerschaftsdiabetes
- eine eingeschränkte Insulintoleranz
- Übergewicht mit einem BMI von $>27\text{kg/m}^2$.

Die allgemeinen Ausschlusskriterien waren:

- ein bereits diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2
- Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, die Einfluss auf die Resorption nehmen und somit die Aussagekraft des oralen Glukosetoleranztestes verfälschen könnten
- Einnahme von Medikamenten, die einen Einfluss auf Glukosetoleranz, Insulinsensitivität oder Insulinsekretion haben
- Schwangerschaft
- Entbindung vor weniger als 3 Monaten und/oder Stillperiode

2.2.2 Teilnehmer

Es wurden insgesamt 1110 Probanden im Hinblick auf die fünf SNPs, die im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 stehen, untersucht. Wir beschreiben im Folgenden übersichtshalber nur einen der beiden wichtigsten SNPs: rs7903146.

Alle 1110 Probanden nahmen an einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) teil. Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die jeweiligen Probandencharakteristika:

Tabelle 1 : Teilnehmercharakteristika rs7903146, OGTT

Genotyp	C/C	C/T	T/T	P ANOVA*
Anzahl	546	474	90	
NGT/IGT**	461/85	386/88	63/27	0.007
Geschlecht (w/m)	346/200	315/159	50/40	0.13
Alter (Jahre)	39±1	40±1	41±1	0.39
BMI (kg/m ²)	29.5±0.4	28.9±0.4	28.2±1.0	0.51

*ANOVA: Analysis of Variance,

** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

Bei 155 dieser Probanden wurde zusätzlich die GLP-1-Sekretion bestimmt. Die Charakteristika dieser Probanden sind der nachfolgenden Tabelle 2 zu entnehmen:

Tabelle 2 : Teilnehmercharakteristika rs7903146, GLP-1-Sekretion

Genotyp	C/C	C/T	T/T	P ANOVA*
Anzahl	73	67	15	
NGT/IGT**	64/9	48/19	10/5	0.03
Geschlecht (w/m)	50/23	42/25	8/7	0.50
Alter (Jahre)	46±1	47±1	47±3	0.99
BMI (kg/m ²)	29.8±0.7	30.3±0.7	27.1±1.1	0.15

*ANOVA: Analysis of Variance,

** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

2 Material und Methoden

Eine Gruppe von 210 Probanden nahm an einem intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT) kombiniert mit einem euglykämischem hyperinsulinämischen Clamp teil. Die Charakteristika dieser Probanden zeigt die Tabelle 3:

**Tabelle 3 : Teilnehmercharakteristika rs7903146,
IVGTT kombiniert mit euglykämischem hyperinsulinämischem Clamp**

Genotyp	C/C	X/T	P: CC vs XT
Anzahl	97	113	
NGT/IGT**	80/17	81/32	0.06
Geschlecht (w/m)	59/38	64/49	0.58
Alter (Jahre)	44±1	45±1	0.29
BMI (kg/m ²)	29.0±0.5	28.8±0.5	0.82

** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

Bei einer weiteren Untergruppe von 73 Probanden wurde ein modifizierter hyperglykämischer Clamp mit einer zusätzlichen GLP-1-Infusion und einem Arginin-Bolus durchgeführt. Die Probandencharakteristika sind in der folgenden Tabelle 4 zu sehen:

**Tabelle 4 : Teilnehmercharakteristika rs7903146,
modifizierter hyperglykämischer Clamp**

Genotyp	C/C	X/T	P: CC vs XT
Anzahl	35	38	
NGT/IGT**	30/5	27/11	0.13
Geschlecht (w/m)	15/20	24/14	0.08
Alter (Jahre)	38±2	40±2	0.66
BMI (kg/m ²)	26.1±0.9	25.1±0.6	0.41

** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Oraler Glukosetoleranztest: OGTT

Alle Probanden nahmen an einem oralen Glukosetoleranztest teil. In den Tagen zuvor sollten sie ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten beibehalten und zwölf Stunden vor der Untersuchung keine Nahrung mehr zu sich nehmen.

Der Test begann morgens um 8.00 Uhr. Zunächst erfolgte eine basale venöse Blutentnahme zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin und C-Peptid. Außerdem wurden Blutbild, Elektrolyte, Blutfette und Leberenzyme bestimmt. Danach erfolgte die orale Gabe einer Lösung aus 75 g Glukose in 300 ml Wasser. Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden erneut die Konzentrationen von Glukose, Insulin und C-Peptid bestimmt.

Bei einer Subpopulation von 155 Probanden bestimmten wir zu den Zeitpunkten 0, 30 und 120 Minuten zusätzlich die GLP-1-Konzentrationen.

Während der Untersuchung waren Nahrungsaufnahme, körperliche Anstrengung und Rauchen verboten.

2.3.2 Kombiniertes intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT) und euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

Nach 12-stündiger Nahrungskarenz begann der Test morgens um 8.00 Uhr. Jeder Teilnehmer erhielt zwei periphere Venenzugänge: einen zur Blutentnahme am Handrücken, an dem mit Erwärmung durch ein Heizkissen eine Erweiterung der arterio-venösen Shunts und dadurch eine Arterialisierung der entnommenen Blutprobe erreicht wurde; einen zweiten zur Gabe von Infusionslösungen am gegenüberliegenden Arm.

Um die basale Glukosekonzentration zu bestimmen, erfolgte eine Mittelung der gemessenen Blutzuckerwerte von den Zeitpunkten -10 min, -5 min, 0 min.

2 Material und Methoden

Beim IVGTT wurden 0,3g/kg Körpergewicht einer 20%igen Glukose-Lösung als Bolus innerhalb von 45 Sekunden intravenös verabreicht. Im Anschluss wurden nach 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten die Konzentrationen von Plasmaglukose, Seruminsulin und C-Peptid bestimmt.

Im anschließenden Clamp war das Ziel, den Plasmaglukosespiegel auf dem im Vorfeld errechneten Nüchternblutzuckerwert zu halten (engl.: to clamp = klammern, befestigen). Durch konstante Insulininfusion von 1mU/min/kg Körpergewicht wurde ein hyperinsulinämischer Zustand erreicht. Durch eine gleichzeitige, variabel angepasste Infusion 20%iger Glukose wurde versucht, die Plasmaglukose-Konzentration konstant zu halten. Zur Überprüfung des gewünschten Plasmaglukosespiegels wurde alle fünf Minuten Blut abgenommen und je nach Ergebnis die Glukoseinfusionsrate (GIR) angepasst. Mit Hilfe der Durchschnitts-GIR ist später eine Aussage über die Insulinsensitivität möglich.

Zu den Zeitpunkten 120 min, 160 min, 170 min und 180 min wurden weitere Blutproben zur Bestimmung der Glukose- und Insulin- und C-Peptidkonzentrationen entnommen.

Nach zwei Stunden beendeten wir den Clamp. Die Insulininfusion wurde abgeschaltet und die Glukosegabe schrittweise reduziert. Die Probanden erhielten eine Mahlzeit und es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des Blutzuckerspiegels, um einer möglichen Hypoglykämie durch Nachwirkungen des Insulins vorzubeugen.

2.3.4 Hyperglykämischer Clamp mit zusätzlicher GLP-1-Infusion und Arginin-Bolus-Gabe

Beim hyperglykämischen Clamp wird der Blutglukosespiegel auf 10mmol/l angehoben und in dieser Höhe mit Hilfe einer 20%igen Glukoseinfusion gehalten. Für jeden Probanden wurde in Abhängigkeit des Körpergewichtes ein individueller Glukosebolus errechnet (Bolusdosis = Körpergewicht (kg) × gewünschter Anstieg der Glukosekonzentration × 1,5) und innerhalb von einer Minute verabreicht. Im Anschluss startete die Glukoseinfusion. Zur Kontrolle des Plasmaglukosespiegels wurde alle fünf Minuten Blut aus dem gegenüberliegenden Zugang entnommen und die Glukoseinfusionsrate entsprechend angepasst.

Nach 120 Minuten erfolgte die Gabe eines GLP-1-Bolus (Bolusdosis= 0,6 pmol/kg), gefolgt von einer kontinuierlichen GLP-1-Infusion ($1,5 \text{ pmol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) für die nächsten 60 Minuten. Bei Minute 180 wurde zusätzlich 5 g Arginin-Hydrochlorid innerhalb von 45 Sekunden infundiert.

Mit Hilfe dieses Clamps können die erste und zweite Phase der Glukose-induzierten Insulinsekretion, die GLP-1-induzierte Insulinsekretion und die Arginin-induzierte Insulinsekretion gemessen werden.

Nach Abschluss der Untersuchung erhielten die Probanden ebenfalls eine Mahlzeit und die Blutzuckerspiegel wurden überwacht, um auch hier mögliche Hypoglykämien zu vermeiden.

2.4 Verwendete Medikamente

2.4.1 Oraler Glukosetoleranztest: OGTT

- Glukoselösung: Dextro® O.G-T.
Hersteller: F. Hoffmann-La Roche AG,
Mannheim, Deutschland
- Kochsalzlösung: NaCl 0,9%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland

2.4.2 Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

- Glukoselösung: Glucosteril 20%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland
- Kochsalzlösung: NaCl 0,9%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland
- Spüllösung: Jonosteril
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland
- Insulin: Insuman Rapid
Hersteller: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main, Deutschland

2.4.3 Hyperglykämischer Clamp mit GLP-1-Infusion und Arginin-Bolus

- Glukoselösung: Glucosteril 20%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland
- Kochsalzlösung: NaCl 0,9%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland
- Spüllösung: Jonosteril
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,
Bad Homburg, Deutschland
- GLP-1: Human GLP-1(7-36)Amid
Hersteller: PolyPeptide Laboratories GmbH
Wolfenbüttel, Deutschland
- Arginin-Bolus: Arginin-Hydrochlorid
Hersteller: Pharmacia & Upjohn GmbH
Erlangen, Deutschland

2.5 Analytik

2.5.1 Blutglukose

Die Blutglukose wurde jeweils direkt nach der Blutentnahme bestimmt und mit zwei Geräten gemessen:

- HemoCue Blutglukose-Photometer
Hersteller: HemoCue AB, Schweden
Verfahren: Photometrie
- YSI 2300 STAT plus
Hersteller: Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA
Verfahren: Glukose-Oxidase-Methode

2.5.2 Insulin, C-Peptid und Proinsulin

- Insulin: Microparticle Enzyme Immunoassay
Hersteller: Abott Laboratories, Tokio, Japan
- C-Peptid: Radioimmunoassay
Hersteller: Byk-Sangtec, Dietzenbach, Deutschland
- Proinsulin: Enzyme Immunoassay
Hersteller: IBL, Hamburg, Deutschland

2.5.3 GLP-1

GLP-1 wurde während des OGTTs zu den Zeitpunkten 0, 30 und 120 Minuten bestimmt. Die GLP-1-Immunreaktivität wurde über ein Radioimmunassay bestimmt, welcher spezifisch den C-Terminus des Peptids erkennt. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt. Die Analyse misst die Summe aus intaktem Peptid und dem ersten Metabolit, GLP-1-(9-36)-Amid, indem es das Antiserum 89390 und das synthetische GLP-1-(7-36)-Amid als Standard verwendet.

2.5.4 Genotypisierung

- TaqMan Assay
 - Hersteller: Applied Biosystems Foster City, CA, USA
 - Verfahren: TCF7L2 polymorphisms detection
- GeneAmp PCR system 7000
 - Hersteller: Applied Biosystems Foster City, CA, US
 - Verfahren: Polymerase-Chain-Reaction
- ABI PRISM 7000
 - Hersteller: Applied Biosystems Foster City, CA, USA
 - Verfahren: Fluorescence sequence detector

2.6 Berechnungen

2.6.1 Body-Mass-Index (BMI)

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

2.6.2 OGTT

- Insulinsekretion

Festgelegt durch die Berechnung der Fläche unter der Kurve („Area under the curve“) von C-Peptid (AUC_{CP}) geteilt durch die Area under the curve von Glukose (AUC_{Glc}). Die AUCs wurden nach der Trapez-Methode bestimmt.

$$\text{Insulinsekretion} = \text{AUC}_{\text{CP}} / \text{AUC}_{\text{Glc}}$$

- Insulinsensitivität

Geschätzt nach dem von Matsuda und DeFronzo vorgeschlagenen Index ISI_{est} : [32].

$$\text{ISI}_{\text{est}} = \frac{10000}{\sqrt{\text{BZ}(\text{basal}) \times \text{Ins}(\text{basal}) \times \text{BZ}(\text{mean}) \times \text{Ins}(\text{mean})}}$$

$\text{BZ}(\text{basal})$ = basaler Plasmaglukosespiegel

$\text{Ins}(\text{basal})$ = basale Plasmainsulinkonzentration

$\text{BZ}(\text{mean})$ = Mittelwert des Plasmaglukosespiegels über den gesamten Untersuchungszeitraum

$\text{Ins}(\text{mean})$ = Mittelwert der Insulinkonzentration über den gesamten Untersuchungszeitraum

2.6.3 IVGTT

- Insulinsekretion

Summe des C-Peptids während der ersten zehn Minuten nach Glukose-Gabe.

- Insulinsensitivität

Durchschnitt der Glukose-Infusions-Rate (GIR) während der letzten 40 Minuten des Clamps geteilt durch die durchschnittliche Plasmainsulinkonzentration im selben Zeitraum.

$$\text{Insulinsensitivität} = \frac{\text{mittlere Glukoseinfusionsrate}}{\text{mittlere Plasmainsulinkonzentration}}$$

2.6.4 Hyperglykämischer Clamp

- 1. Phase der Insulinsekretion:

Mittlere Plasmainsulinkonzentration der Zeitpunkte 2.5 , 5, 7.5 und 10 Minuten.

- 2. Phase der Insulinsekretion:

Mittlere Plasmainsulinkonzentration im Zeitintervall von Minute 80-120.

- 1. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion:

Mittlere Plasmainsulinkonzentration im Zeitintervall von Minute 125-130.

- 2. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion (Plateau):

Mittlere Plasmainsulinkonzentration im Zeitintervall von Minute 160-180.

- Maximale Insulinsekretion nach Arginin-Bolusgabe:

Mittlere Plasmainsulinkonzentration der Zeitpunkte 182.5 Minuten und 185 Minuten minus der Plasmainsulinkonzentration zum Zeitpunkt Minute 180.

- Insulinsensitivität:

Durchschnitt der Glukose-Infusions-Rate (GIR) während der letzten 40 Minuten des Clamps (80. -120. Minute) geteilt durch die durchschnittliche Plasma-Insulinkonzentration im selben Zeitraum.

$$\text{Insulinsensitivität} = \frac{\text{mittlere Glukoseinfusionsrate}}{\text{mittlere Plasmainsulinkonzentration}}$$

2.7 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Daten wurde das Softwarepaket JMP (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) verwendet.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Um einen statistischen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Parameter, die außerhalb der angenommenen Normalverteilung lagen, logarithmiert. Die Unterschiede in den anthropometrischen und metabolischen Eigenschaften der einzelnen Genotyp-Gruppen wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA = Analysis of Variance) untersucht.

Es wurden multivariate Regressionsanalysen durchgeführt. Bei der Analyse der Insulinsekretion war die Insulinsekretion die abhängige Variable. Alter, Geschlecht, Insulinsensitivität und Genotyp die unabhängigen Variablen.

2 Material und Methoden

Aufgrund der relativ geringen Anzahl an homozygoten Trägern der seltenen Allele bei dem hyperglykämischen Clamp wurde ein dominantes Modell verwendet.

Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Genetische Varianten im TCF7L2-Gen

Der in dieser Arbeit untersuchte SNP rs7903146 im TCF7L2 Gen hatte in unserer Kohorte eine Allelfrequenz des Minor-Allels von 30%. Dieser Polymorphismus befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

3.2 Oraler Glukosetoleranztest OGTT

Anhand dieses Tests wird die sogenannte Glukosetoleranz bestimmt. Nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft liegt eine gestörte oder verminderte Glukosetoleranz (engl.: IGT=impaired glucose tolerance) vor, wenn der 2-Stunden-Plasmaglukosewert des OGTT mehr als 140mg/dl (7,8 mmol/l) beträgt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Oralen Glukosetoleranztests für die Träger des Polymorphismus rs7903146 (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1 : Ergebnisse des OGTT für rs7903146

Genotyp	C/C	C/T	T/T	P ANOVA*	P: CCvsXT
NGT/IGT****	461/85	386/88	63/27	0.007	0.03
Geschlecht (w/m)	346/200	315/159	50/40	0.13	0.64
Alter (Jahre)	39±1	40±1	41±1	0.39	0.67
BMI (kg/m ²)	29.5±0.4	28.9±0.4	28.2±1.0	0.51	0.24
Glukose basal(mmol/l)	5.1±0.02	5.1±0.02	5.2±0.07	0.25	0.39
Glukose 2h (mmol/l)	6.1±0.07	6.2±0.07	6.7±0.2	0.06	0.17
AUC Glk**(pmol/l x min)	866±8	867±9	907±23	0.26	0.52
Insulin basal (pmol/l)	62.0±2.1	53.4±1.7	49.8±3.1	0.004	0.001
Insulin 2h (pmol/l)	442±19	356±17	372±34	0.12	0.04
AUC Ins**(pmol/l x min)	53974±1815	46248±1695	46633±3012	0.005	0.001
Insulinsensitivität (arbitrary units)	16.8±0.5	18.2±0.5	17.8±1.2	0.02/0.02***	0.005/0.006***
Insulinsekretion (pmol/mmol)	319±5	301±5	292±10	0.003/0.04***	0.0009/0.02***

3 Ergebnisse

* ANOVA= Analysis of Variance

** AUC = Area under the curve; Glk= Glukose; Ins= Insulin

*** für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

**** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

Glukosetoleranz:

Es zeigte sich, dass die Anzahl der Personen mit verminderter Glukosetoleranz bei Trägern des Risikoallels T signifikant erhöht war: Bei rs7903146 ergab $P_{ANOVA} = 0.007$. Abbildung 1.1 zeigt die Verteilung der Personen mit normaler und gestörter Glukosetoleranz.

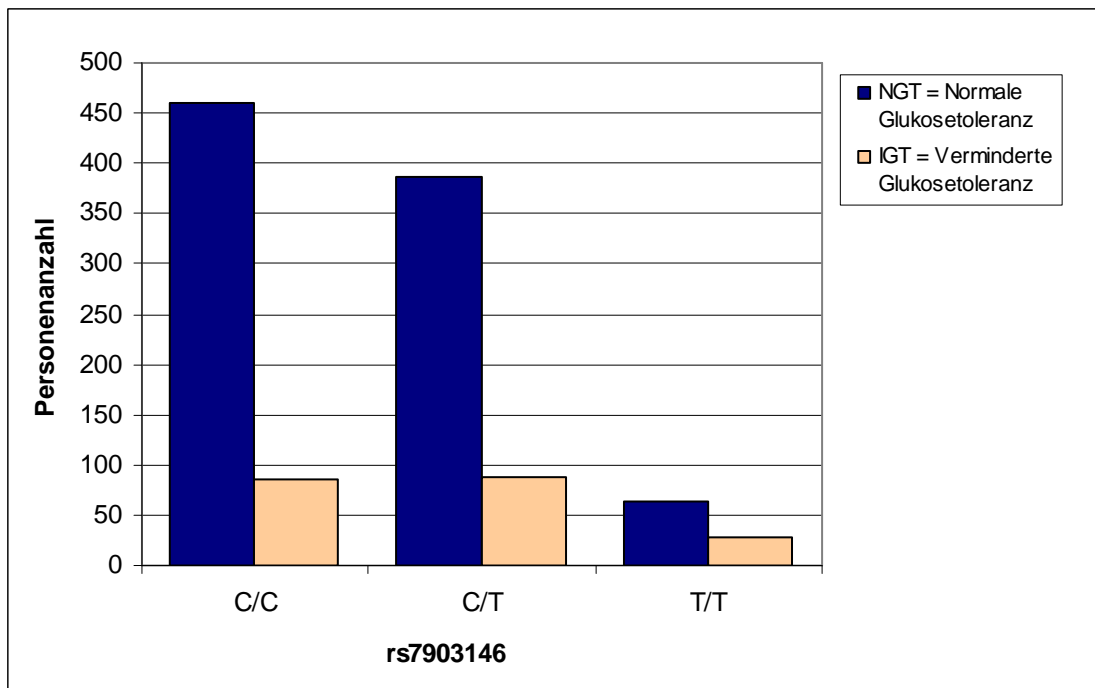


Abbildung 1.1 : Glukosetoleranz, OGTT

3 Ergebnisse

Plasmaglukose:

Im OGTT bestand bei den basalen Glukosewerten kein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen.

Nach zwei Stunden lagen die Blutzuckerwerte bei Trägern des Risikoallels T jedoch jeweils höher als bei Personen ohne Risikoallel. Personen mit dem Polymorphismus rs7903146 zeigten eine Tendenz zu höheren Plasmaglukosespiegeln, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($P_{ANOVA} = 0.06$).

Abbildung 1.2 zeigt die basale Plasmaglukosekonzentration und die 2-Stunden-Werte. Die senkrechten Balken stellen wie in allen folgenden Abbildungen die Standardabweichung dar.

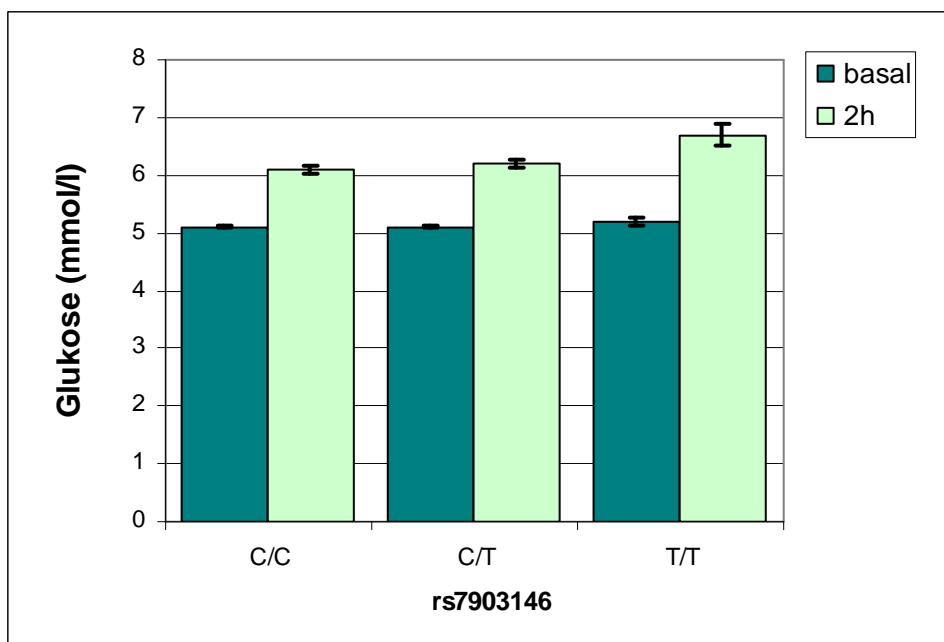


Abbildung 1.2 : Plasmaglukose, OGTT

3 Ergebnisse

Plasmainsulin:

In Abbildung 1.3 sind die Plasmainsulinwerte während des OGTTs dargestellt. Bei Trägern des Polymorphismus rs7903146 fanden wir bei homozygoten und heterozygoten Trägern des Risikoallels eine signifikante Reduktion des basalen Insulinspiegels ($P_{ANOVA} = 0.004$). Zusätzlich ergab sich ein signifikanter Unterschied nach zwei Stunden zwischen homozygoten Trägern ohne Risikoallel (CC) und Probanden mit dem Risikoallel T ($P_{CCvs.XT} = 0.04$).

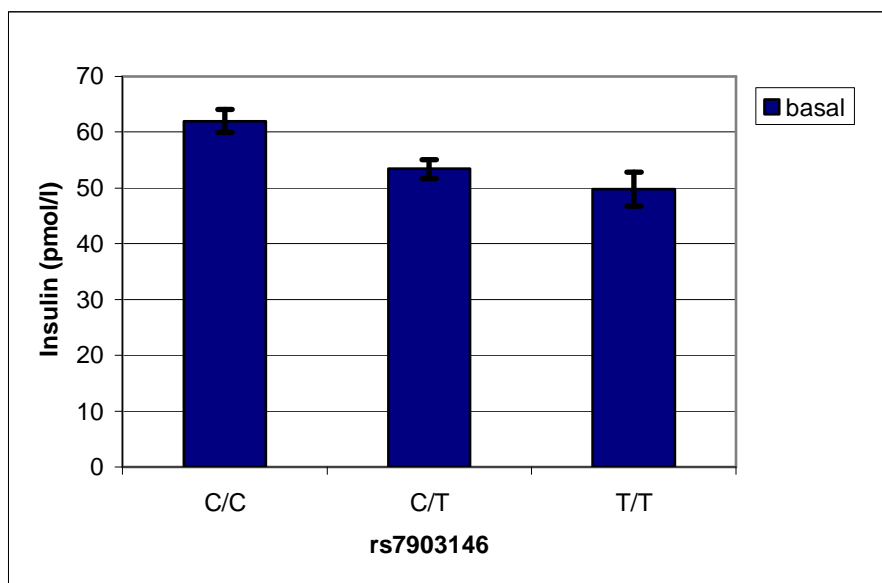


Abbildung 1.3 : Plasmainsulin, OGTT

3 Ergebnisse

Insulinsekretion:

Die Insulinsekretion, gemessen als AUC_{CP}/AUC_{Glc} , war bei homozygoten (CC) und heterozygoten (CT) Trägern des Risikoallels signifikant erniedrigt, sowohl vor als auch nach Adjustierung an die Kovariaten Alter, Geschlecht, BMI und Insulinsensitivität.

Für den Polymorphismus rs7903146 betrug $P_{ANOVA} = 0.003$ vor Adjustierung und 0.04 danach.

Abbildung 1.4 spiegelt die Insulinsekretion für die einzelnen Genotypen des Polymorphismus wider. Es ist deutlich zu sehen, dass die Insulinsekretion bei Trägern des Risikoallels erniedrigt ist und bei homozygoten Trägern die tiefsten Werte erreicht.

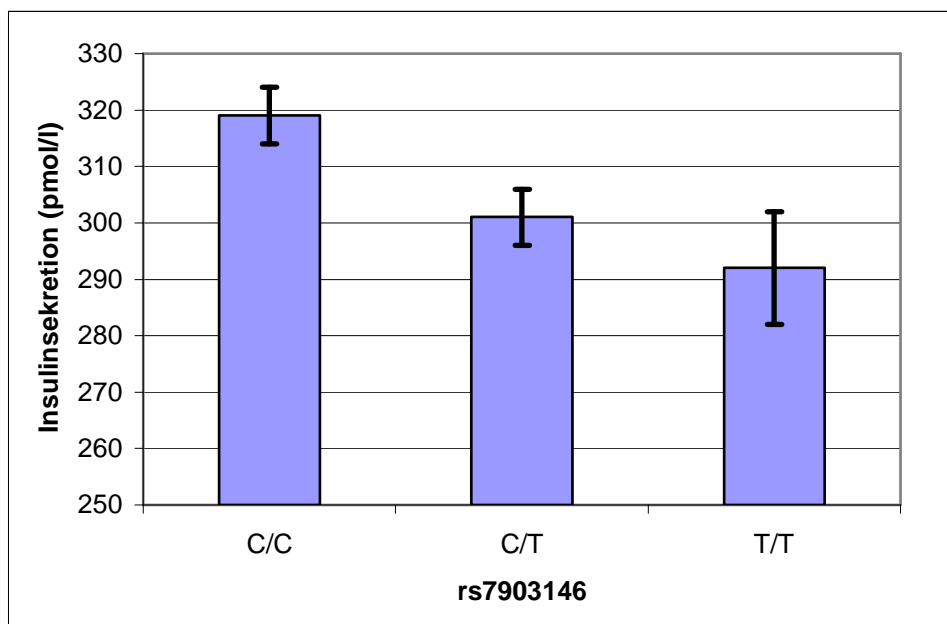


Abbildung 1.4 : Insulinsekretion, OGTT

3 Ergebnisse

Insulinsensitivität:

Geschätzt nach dem Index von Matsuda und DeFronzo ISI_{est} : [32], fanden wir bei Personen mit dem Polymorphismus rs7903146 bei homozygoten Trägern des Risikoallels eine gesteigerte Insulinsensitivität im Vergleich zu Nicht-Trägern.

Heterozygote Träger des Risikoallels (C/T) zeigten eine erhöhte Insulinsensitivität und nach Adjustierung an die Kovariaten Alter, Geschlecht und BMI zeigte sich eine statistische Signifikanz. Die P_{ANOVA} -Werte für rs7903146 lagen sowohl vor als auch nach Adjustierung bei 0.02.

Die nachfolgende Abbildung 1.5 zeigt die Insulinsensitivität für die Genotypen des Polymorphismus.

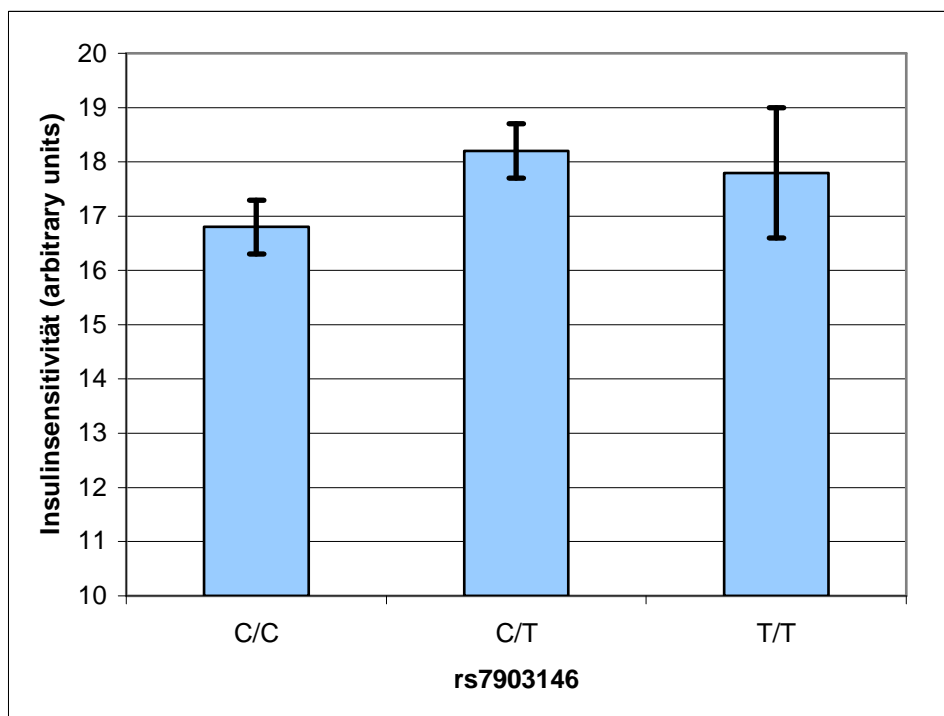


Abbildung 1.5 : Insulinsensitivität, OGTT

3 Ergebnisse

GLP-1-Konzentrationen:

Bei einer Subpopulation von 155 Probanden der insgesamt 1110 Teilnehmer bestimmten wir die GLP-1-Konzentrationen während des OGTTs zu den Zeitpunkten 0, 30 und 120 Minuten. Wir konnten zeigen, dass sich zu keinem Zeitpunkt des OGTTs die GLP-1-Plasmaspiegel der einzelnen Genotypen in signifikanter Weise voneinander unterscheiden.

Die folgende Tabelle zeigt die GLP-1-Plasmakonzentrationen dieser Subpopulation für den Polymorphismus rs7903146 (Tab. 5.2). Es ist zu erkennen, dass die Subgruppe der Probanden mit GLP-1-Bestimmung sich in wesentlichen Eigenschaften (reduzierte Insulinsekretion bei T-Allelträgern des rs7903146 SNP) nicht von der Gesamtpopulation unterscheidet.

Tabelle 5.2. : Ergebnisse des OGTT mit zusätzlicher GLP-1-Messung für rs7903146

Genotyp	C/C	C/T	T/T	P ANOVA*	P: CCvsXT
NGT/IGT****	64/9	48/19	10/5	0.03	0.009
Geschlecht (w/m)	50/23	42/25	8/7	0.50	0.33
Alter (Jahre)	46±1	47±1	47±3	0.99	0.96
BMI (kg/m ²)	29.8±0.7	30.3±0.7	27.1±1.1	0.15	0.88
Glukose basal(mmol/l)	5.2±0.05	5.3±0.07	5.6±0.2	0.17	0.21
Glukose t=2h (mmol/l)	6.5±0.1	7.0±0.2	7.2±0.5	0.22	0.10
AUC Glc(pmol/l x min)	930±17	696±22	1045±60	0.09	0.09
AUC Ins(pmol/l x min)	59835±3959	58170±5053	48423±6661	0.35	0.23
Insulinsensitivität (arbitrary units)	12.8±0.7	13.6±1.0	15.7±2.6	0.74/0.92**	0.78/0.75**
Insulinsekretion (pmol/mmol)	304±12	287±13	235±19	0.01/0.02***	0.02/0.01***
AUC GLP-1	3587±184	2890±293	2846±301	0.60	0.45
Fold increase	2.5±0.2	2.7±0.3	2.4±0.4	0.77	0.84

* ANOVA= Analysis of Variance

** für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

*** für Geschlecht, Alter, BMI und Insulinsensitivität adjustiert

**** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

3 Ergebnisse

In Abbildung 1.6 sind die GLP-1-Konzentrationen der verschiedenen Genotypen zu den Abnahmezeitpunkten 0, 30 und 120 Minuten nochmals graphisch dargestellt.

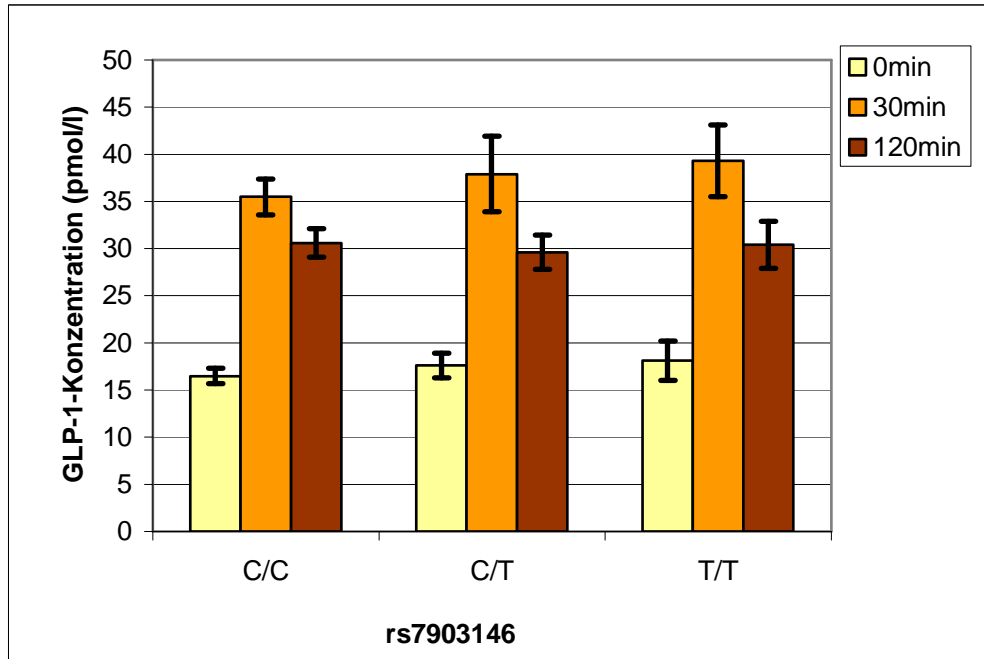


Abbildung 1.6 : GLP-1-Konzentration, OGTT

3.3 Kombiniertes intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT) und euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

Mit Hilfe des IVGTTs und des anschließenden euglykämischen hyperinsulinämischen Clamps bestimmten wir bei einer Subpopulation von 210 Probanden die Insulinsekretion anhand der C-Peptid-Konzentration und die Insulinsensitivität aus dem Durchschnitt der Glukose-Infusions-Rate (GIR) während der letzten 40 Minuten des Clamps geteilt durch die durchschnittliche Plasmainsulinkonzentration im selben Zeitraum.

Die nachfolgende Tabelle 6 zeigt die Insulinsensitivität und die unterschiedlichen Insulinsekretionsraten dieser Subpopulation für den Polymorphismus rs7903146. Die signifikanten Werte sind hervorgehoben.

Tabelle 6. : Ergebnisse des IVGTT und euglykämischen hyperinsulinämischen Clamps, rs7903146

Genotyp	C/C	X/T	P: CCvsXT
NGT/IGT***	80/17	81/32	0.06
Geschlecht (w/m)	59/38	64/49	0.58
Alter (Jahre)	44±1	45±1	0.29
BMI (kg/m ²)	29.0±0.5	28.8±0.5	0.82
Insulinsensitivität*	0.07±0.01	0.07±0.01	0.77
IVGTT C-Peptid-Sekretion (pmol/l)**	7904±306	7679±323	0.40
IVGTT Insulinsekretion (pmol/l)**	2059±131	1924±129	0.25
OGTT Insulinsekretion (pmol/mmol)	314±8	292±8	0.04

*Insulinsensitivität in $\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol} \times \text{l}^{-1}$

** für Alter, Geschlecht, BMI und Insulinsensitivität adjustiert

*** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

3 Ergebnisse

Insulinsekretion:

Bei der Berechnung der Insulinsekretion anhand der C-Peptid-Konzentration während der ersten 10 Minuten des IVGTT zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen.

Als wir jedoch die Insulinsekretion dieser Subpopulation im OGTT (siehe Kapitel 2.6.2) bestimmten, stellten wir eine signifikant verminderte Insulinsekretion bei Trägern des T-Allels in rs7903146 fest ($p=0.04$).

Insulinsensitivität:

Im Bezug auf die Insulinsensitivität zwischen den einzelnen Genotypen fanden wir während des kombinierten Clamps keinerlei signifikante Unterschiede.

3.4 Hyperglykämischer Clamp

Mit Hilfe dieser Clampuntersuchung bestimmten wir die erste und zweite Phase der Glukose-induzierten Insulinsekretion, die GLP-1-induzierte Insulinsekretion und die Arginin-induzierte Insulinsekretion bei einer Subpopulation von 73 Personen. Die metabolischen Charakteristika sowie die Ergebnisse der Clamps dieser Personen sind in der nachfolgenden Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 : Ergebnisse des hyperglykämischen Clamps für rs7903146

Genotyp	C/C	X/T	P: CCvsXT
NGT / IGT***	30/5	27/11	0.13
Geschlecht (weiblich/männlich)	15/20	24/14	0.08
Alter (Jahre)	38±2	40±2	0.66
BMI (kg/m ²)	26.1±0.9	25.1±0.6	0.41
Insulinsensitivität*	0.15±0.02	0.15±0.01	0.90
1.Phase (pmol/l) der Insulinsekretion**	1067±158	815±105	0.18
2.Phase (pmol/l) der Insulinsekretion**	308±47	291±41	0.80
1.Phase GLP-1 (pmol/min)**	2049±258	1466±175	0.03
2.Phase GLP-1 (pmol/min)**	4567±568	2881±341	0.006
Arginin (pmol/min)	2680±226	2252±181	0.40

3 Ergebnisse

*Insulinsensitivität in $\mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{pmol} \times \text{l}^{-1}$

** für Alter, Geschlecht, BMI und Insulinsensitivität adjustiert

*** NGT: Normale Glukose Toleranz; IGT: Verminderte Glukose Toleranz, engl.: Impaired Glucose Tolerance)

Glukosekonzentration:

Beim hyperglykämischen Clamp wird der Blutglukosespiegel auf 10mmol/l angehoben und in dieser Höhe mit Hilfe einer 20%igen Glukoseinfusion gehalten. Die folgende Abbildung soll dazu dienen, dies graphisch darzustellen. Sie zeigt die Blutglukosekonzentrationen in Abhängigkeit zur Zeit während eines hyperglykämischen Clamps im Vergleich zwischen Personen mit (XT) und ohne Risikoallel (CC) im Polymorphismus rs7903146.

Insulinsekretion:

Wir untersuchten während des hyperglykämischen Clamps die erste und zweite Phase der Insulinsekretion und fanden keinen signifikanten Unterschied in der Insulinsekretion: Der p-Wert betrug im Vergleich zwischen Trägern des Risikoallels (XT) und Personen ohne Risikoallel in der ersten Phase der Insulinsekretion 0.18 und erreichte auch in der zweiten Phase der Insulinsekretion mit einem p-Wert von 0.80 keine Signifikanz.

Die folgende Abbildung 2.1 zeigt die Insulinsekretion während des gesamten hyperglykämischen Clamps. Anhand des Beispiels des Polymorphismus rs7903146 sind die Unterschiede in der Insulinsekretion zwischen Risikoallel-Trägern (XT) und Personen ohne Risikoallel (CC) dargestellt. Es ist zu sehen, dass Personen mit Risikoallel eine verminderte Insulinsekretion aufweisen:

3 Ergebnisse

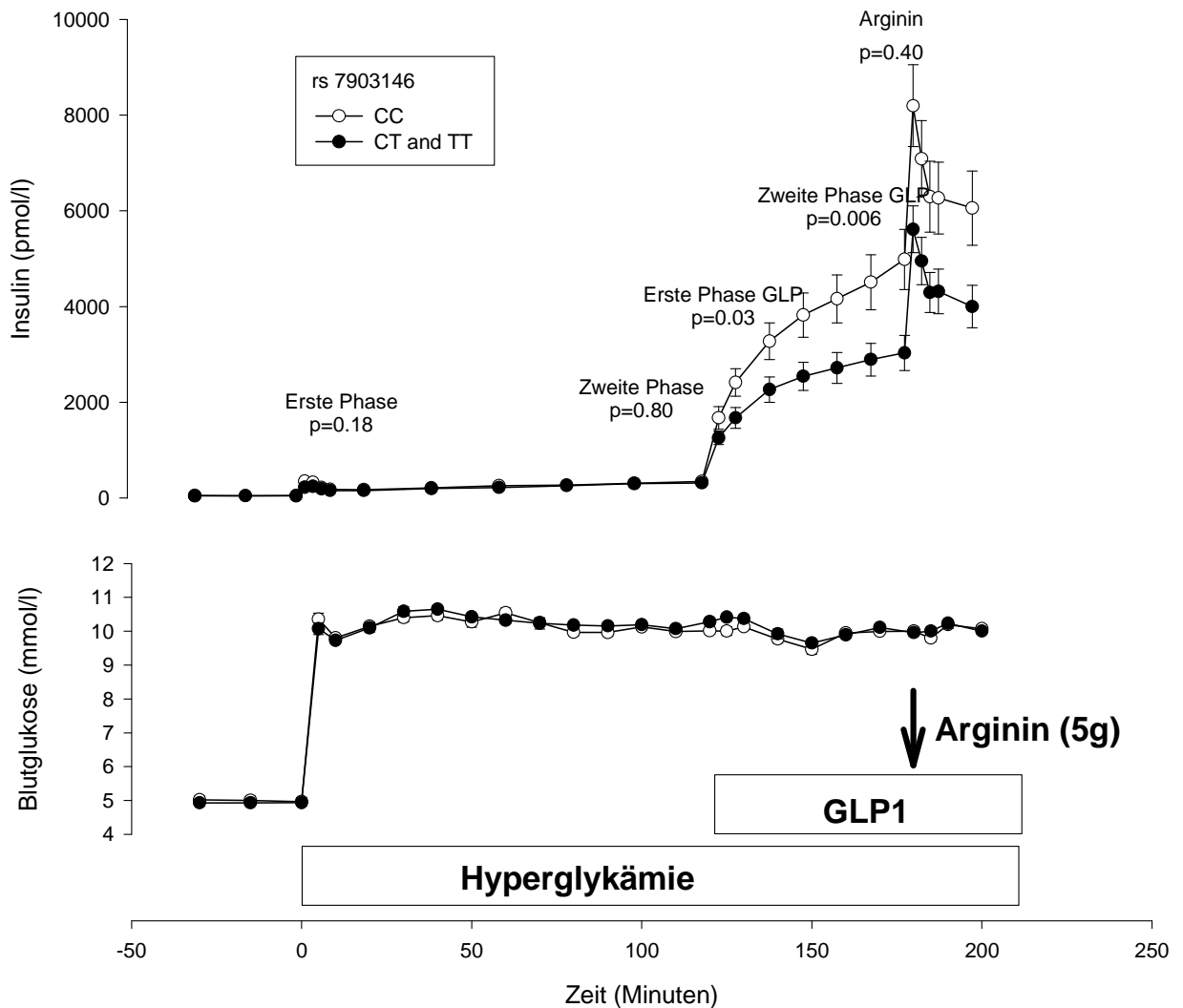


Abbildung 2.1. Insulinsekretion und Glukosekonzentration, Hyperglykämischer Clamp, rs7903146

1. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion:

Die erste Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion findet im Anschluss an die Gabe des GLP-1-Bolus in der 120. Minute statt. Wir konnten zeigen, dass sich die 1. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion bei Trägern des Risikoallels (XT) verändert. Der p-Wert für rs7903146 betrug 0.03.

3 Ergebnisse

2. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion:

Für die 2. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion betrachteten wir den Zeitraum zwischen der 160. und 180. Minute des hyperglykämischen Clamps. Ebenso wie in der 1. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion zeigte sich auch hier bei Polymorphismusträgern eine schwächere Insulinsekretion. Die Signifikanz war mit einem p-Wert von $p=0.006$ noch deutlicher als in der 1. Phase.

Die nachfolgenden Abbildungen sollen dazu dienen, sich die Insulinsekretion im Verlauf des gesamten hyperglykämischen Clamps einmal vor Augen zu halten. Sie zeigen die Insulinsekretion für den Polymorphismus rs7903146 in Abhängigkeit zu der Zeit. Die zwei Kurven stellen den Unterschied zwischen Risikoallelträgern (XT) und Personen ohne Risikoallel (CC) dar.

Insulinsekretion während der reinen Glukoseinfusion bis zur 120. Minute:

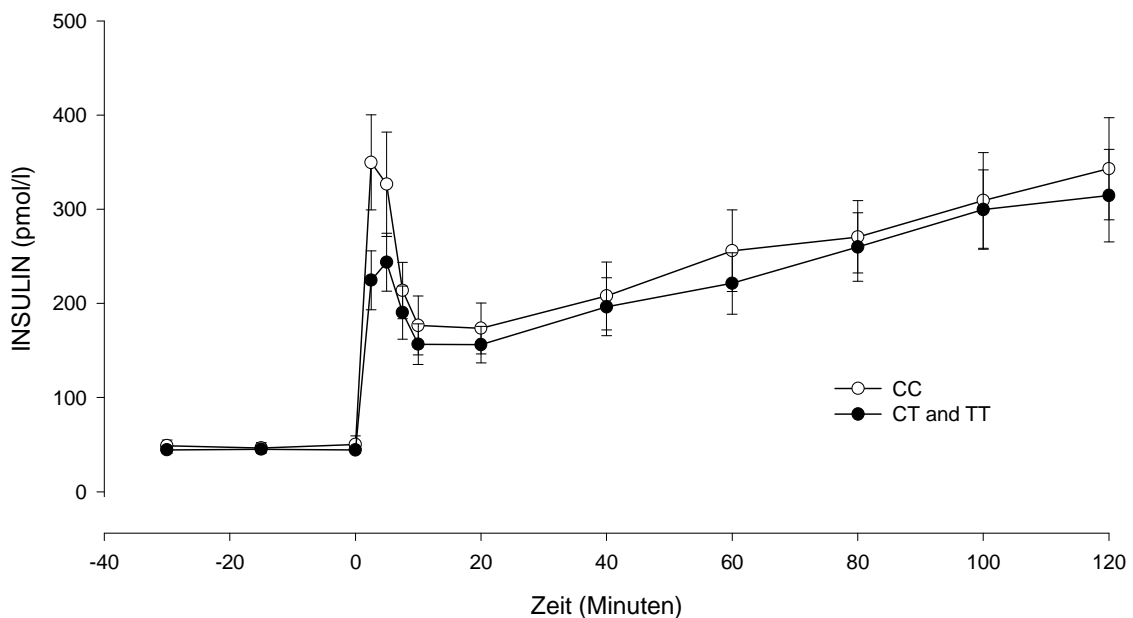


Abbildung 2.2 : Insulinsekretion; -15. – 120. Minute, Hyperglykämischer Clamp, rs7903146

3 Ergebnisse

Insulinsekretion während der GLP-1-Infusion ab der 120. Minute:

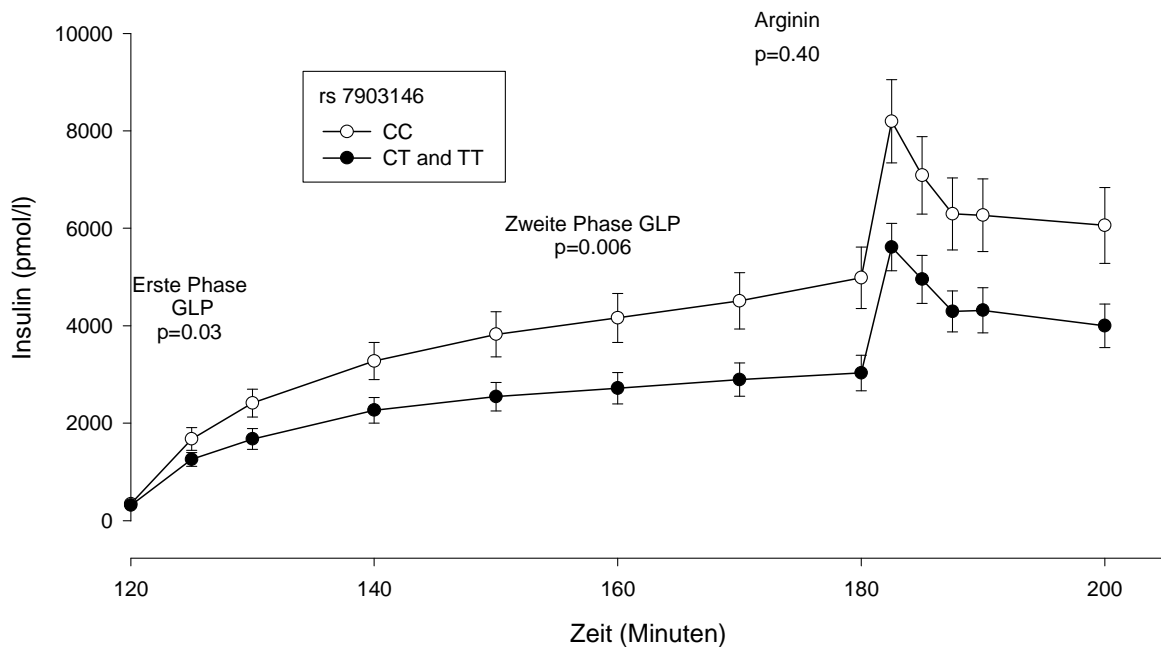


Abbildung 2.3 : Insulinsekretion; 120. - 200. Minute, Hyperglykämischer Clamp, rs7903146

Arginin-induzierte Insulinsekretion:

In der 180. Minute des hyperglykämischen Clamps erhielten die Probanden zusätzlich einen Arginin-Bolus. Arginin ist in der Lage, die Beta-Zellen auf maximale Weise zu stimulieren und zur Sekretion anzuregen. Auf diese Weise wollten wir die maximale sekretorische Fähigkeit der Beta-Zellen überprüfen und herausfinden, ob die Polymorphismen auch hierauf einen Einfluss nehmen. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu der GLP-1-induzierten Insulinsekretion, keiner der Polymorphismen einen signifikanten Einfluss auf die Arginin-induzierte Insulinsekretion nimmt. ΔB war zwischen den homozygoten und heterozygoten Polymorphismusträgern nahezu deckungsgleich.

Insulinsensitivität:

Anhand der Glukoseinfusionsrate während der letzten 40 Minuten des hyperglykämischen Clamps und der Plasmainsulinsekretion im selben Zeitraum bestimmten wir auch während dieses Versuchs die Insulinsensitivität, um einen möglichen Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen darstellen zu können. Mit einem p-Wert von 0.9 für Träger des Risikoallels im Vergleich zu Personen ohne Risikoallel beim Polymorphisums rs7903146, konnten wir zeigen, dass, wie bereits beim IVGTT und euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp, auch hier keiner der Genotypen in signifikanter Weise Einfluss auf die Insulinsensitivität nimmt.

4 Diskussion

4.1 Polymorphismen im TCF7L2-Gen

Auf der Suche nach genetischen Komponenten für ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 konnte zunächst gezeigt werden, dass zwischen einer Region auf dem Chromosom 10 und Diabetes mellitus eine Verbindung besteht. Grant et al.[18, 45] fanden bei weiteren Untersuchungen Veränderungen in der Gen-Region DG10S478, welche sich im Intron 3 des TCF7L2-Gens auf Chromosom 10q25.2 befindet. Im Anschluss konnten fünf verschiedene Polymorphismen identifiziert werden, die alle eine Verbindung zu Diabetes mellitus zeigen.

In vielen Studien weltweit konnte dann in verschiedensten Populationen der Zusammenhang zwischen genetischer Variation im TCF7L2-Gen und Diabetes mellitus Typ 2 bestätigt werden [6, 9, 29, 47, 48, 62, 63].

Es stellt sich nun die Frage, durch welche Pathomechanismen die genetische Variation im TCF7L2-Gen zu Diabetes mellitus Typ 2 führt. Hierfür kommen neben der Störung der Insulinsensitivität vor allem Störungen der Insulinsekretion in Frage.

Wir untersuchten daher 1110 kaukasische Personen mit einem erhöhten Risiko, später einmal selbst an Diabetes zu erkranken. Wir führten bei allen Probanden einen OGTT durch und machten bei einzelnen Untergruppen unseres Kollektivs weitere Untersuchungen, um den Einfluss und die Auswirkungen der Polymorphismen auf die Insulinsekretion besser analysieren zu können.

In unserer Population zeigte sich eine ähnliche Verteilung der SNPs wie in der von Grant beschriebenen Population. Desweiteren zeigte sich bei dem Polymorphismus rs7903146 die stärkste Verbindung zu einem erhöhten

Diabetesrisiko. Aus Gründen der Übersicht wurden in dieser Arbeit deswegen nur die Ergebnisse des Polymorphismus rs7903146 dargestellt.

Interessanterweise zeigte sich bei der intravenösen Verabreichung der Glukose sowohl beim IVGTT als auch beim hyperglykämischen Clamp kein Unterschied in der Insulinsekretion bei Trägern des Risikoallels (T) und homozygoten Trägern des Wildtypallels (C).

Im Gegensatz dazu sahen wir während des OGTTs deutliche Unterschiede in der Insulinsekretion zwischen Trägern des Risikoallels und Trägern des Wildtypallels. Bei Trägern des Risikoallels war die Insulinsekretion deutlich erniedrigt und bei homozygoten Trägern des Risikoallels wurden die tiefsten Werte überhaupt erreicht.

Dieser Unterschied in der Insulinsekretion zwischen oraler und intravenöser Gabe von Glukose ließ uns zu der Hypothese kommen, dass die Polymorphismen im TCF7L2-Gen einen Einfluss auf die Inkretin-induzierte Insulinsekretion nehmen müssen.

4.2 TCF7L2-Polymorphismus im OGTT

Mit Hilfe des OGTTs konnten wir die bereits in anderen Studien beschriebene [9, 47, 48] verminderte Insulinsekretion in unserer Population bestätigen. Bei der zusätzlichen Bestimmung der GLP-1-Konzentrationen konnten wir keinerlei signifikante Unterschiede zwischen Trägern und Nichtträgern des Polymorphismus feststellen. Bei unseren Versuchen hat die genetische Variation im TCF7L2 Gen keinen Einfluss auf die basale und Glukose-stimulierte GLP-1-Sekretion während des OGTT genommen. Dies lässt den Schluss zu, dass eine verminderte GLP-1-Sekretion für die verminderte Insulinsekretion bei Trägern der Polymorphismen nicht verantwortlich sein kann. Einen Einfluss der SNPs auf die GLP-1-Konzentrationen können wir

jedoch nicht ganz sicher ausschließen: Zum einen spiegeln die systemischen GLP-1-Werte nicht die genaue Menge des in der Darmwand aktiven Hormons wider [21] und zum anderen könnte eine verminderte TCF7L2-Aktivität gewebespezifisch die GLP-1-Level im Gehirn verringern, die für die Insulinsekretion ebenfalls von Wichtigkeit zu sein scheinen [8].

Die Insulinsensitivität, die wir nach dem von Matsuda und DeFronzo vorgeschlagenen Index ISI_{est} [32] berechneten, war bei Trägern des Diabetesrisikoallels im TCF7L2 Gen nach Adjustierung an die Kovariaten Alter, Geschlecht und BMI signifikant erhöht. Zu diesem Ergebnis waren Florez et al. [16] 2006 auch gekommen und hatten es als Artefakt interpretiert. Jedoch spricht die Tatsache, dass wir in unserer Kohorte ebenfalls zu diesem Ergebnis gekommen sind, gegen einen zufälligen Befund. Die erhöhte Insulinsensitivität könnte ein Ausdruck eines Kompensationsmechanismus für die verminderte Insulinsekretion sein.

4.3 TCF7L2-Polymorphismus im IVGTT

Eine Subpopulation von 210 Personen nahm an einer Kombination aus einem intravenösen Glukosetoleranztest und euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp teil.

Bei der Bestimmung der Insulinsekretion fanden wir jedoch im Gegensatz zum OGTT keine signifikanten Unterschiede in der Insulinsekretion zwischen den einzelnen Genotypen. Somit hatten wir einen deutlichen Unterschied in der Insulinantwort auf orale, nicht jedoch auf die intravenöse Verabreichung von Glukose gefunden. Die verminderte Insulinsekretion bei Antwort auf die orale Glukosebelastung ließ uns zu der Überlegung kommen, dass ein Mechanismus

in der Regulation zwischen oraler Glukoseaufnahme und anschließender Insulinsekretion hierbei eine Rolle spielen muss.

Eine große Rolle bei dieser Regulation spielen die Inkretine und der Inkretineffekt, bei dem es in Anwesenheit von Glukose zu einer Steigerung der Insulinsekretion kommt, und so kamen wir zu der Überlegung, dass Polymorphismen im TCF7L2-Gen einen Einfluss auf die Inkretin-vermittelte Insulinsekretion nehmen müssen.

4.4 TCF7L2-Polymorphismus im hyperglykämischen Clamp

Während des hyperglykämischen Clamps mit intravenöser Glukosegabe fanden wir ähnlich wie beim IVGTT keinen Unterschied in der Insulinsekretion zwischen Trägern und Nicht-Trägern des Risikoallels im Polymorphismus rs7903146. Dies bestätigte die Ergebnisse aus dem IVGTT und bestärkte uns in unserer Vermutung des Einflusses des Polymorphismus auf die Inkretinwirkung, da auch hier die Insulinsekretion nach intravenöser Glukosegabe bestimmt worden war und sich eben gerade kein Unterschied gezeigt hatte.

Um unserer Überlegung nachzugehen, analysierten wir zusätzlich zur Glukose-induzierten Insulinsekretion die Insulinsekretion im Anschluss an einen GLP-1-Bolus mit anschließender GLP-1-Infusion, die wir an den klassischen hyperglykämischen Clamp anschlossen.

Nach dem GLP-1-Bolus zeigte sich sowohl die 1. Phase, als auch die verlängerte, sogenannte 2. Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion bei Trägern des Risikoallels im Polymorphismus rs7903146 signifikant erniedrigt.

Somit zeigt sich, dass die genetische Variation im TCF7L2 Gen nicht die GLP-1-Sekretion, aber die GLP-1-Wirkstärke beeinflusst. Es ist also zu vermuten, dass die Insulinsekretion bei den Polymorphismusträgern aufgrund

einer GLP-1-Wirksamkeit auftritt. Diese Wirksamkeit kann als „Inkretinresistenz“ bezeichnet werden.

Im Anschluss an die Stimulation mit GLP-1 infundierten wir den Probanden zusätzlich einen Arginin-Bolus. Arginin stellt eine maximale Herausforderung an die Beta-Zellen und ihre Insulinsekretion dar und dient somit als Surrogatparameter für die Beta-Zellmasse. Hierbei kam es zu keinen Unterschieden in der Insulinantwort zwischen Trägern und Nicht-Trägern des Risikoallels im Polymorphismus rs7903146. Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass die genetische Variation im TCF7L2-Gen keinen Einfluss auf die maximale sekretorische Kapazität der Beta-Zelle und somit der Beta-Zell-Masse ausübt.

4.5 Gründe für eine gestörte GLP-1-induzierte Insulinsekretion

Betrachteten wir die Insulinsekretion, die im Anschluss an die GLP-1-Infusion stattfindet, so fanden wir eine Verringerung der Insulinsekretion bei Trägern des Polymorphismus. Somit muss eine Störung vorliegen, welche die Wirkung von GLP-1 verringert, was in einer geringeren Insulinsekretion resultiert. Möglicherweise führen die Polymorphismen im TCF7L2-Gen zu Veränderungen in der GLP-1-Signalkette, sodass eine adäquate Insulinsekretion nicht mehr stattfinden kann.

Die Störung könnte hierbei im TCF7L2-Rezeptor selbst liegen. Er spielt eine entscheidende Rolle im entsprechenden WNT-Signalweg. WNT-Signalwege findet man bei den verschiedensten Prozessen im menschlichen Körper. Die WNT-Liganden umfassen eine große Familie von sezernierten, hydrophoben Glykoproteinen, die eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen und Vorgängen bei ausgereiften Zellen steuern. Indem die WNTs an verschiedene Rezeptoren einzelner Zellen binden, starten sie intrazelluläre Signalkaskaden, die wiederum zu Veränderungen in der Transkription von Genen führen [34].

Diesen Signalweg benötigt man auch für eine normale Entwicklung des Pankreas und der Inselzellen und er ist außerdem entscheidend an der Regulation der GLP-1-Expression und -Sekretion in den intestinalen L-Zellen beteiligt.

Erst kürzlich wurde das TCF7L2-Gen im menschlichen Pankreas gefunden [49] und somit könnten auch hier Veränderungen im Transkriptionsfaktor die Transkription der Gene, die an der Signalkette der Inkretine beteiligt sind, spezifisch beeinflussen und zum Beispiel dazu führen, dass es zu einer Resistenz der pankreatischen Beta-Zellen auf GLP-1 kommt.

Da der WNT-Signalweg auch bei der GLP-1-Sekretion eine Rolle spielt, könnte die Insulinsekretion ebenfalls über die enteroinsuläre Achse beeinflusst werden: Die postprandiale Insulinsekretion würde über eine Störung in der Signalkaskade beeinflusst werden.

Des Weiteren nimmt GLP-1 auch Anteil bei der Stimulation des Beta-Zell-Wachstums und der Beta-Zell-Differenzierung. Shu et al [49] konnten 2008 in einer Studie über TCF7L2 und die Regulation und das Überleben der Beta-Zellen zeigen, dass GLP-1 die Glukose-stimulierte Insulinsekretion bei Kontroll-Zellen des Pankreas im Vergleich zu Zellen ohne TCF7L2 in weit höherem Maße ansteigen lässt. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass Veränderungen im TCF7L2-Gen zu einem funktionellen Defekt des GLP-1-Signalweges in den Beta-Zellen führt.

4.6 Schlussfolgerung

In unserer Studie mit einer süddeutschen Kohorte von 1110 Probanden konnten wir den von Grant et al. beschriebenen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TCF7L2-Gen und einer verminderten Insulinsekretion bestätigen.

Bei den Polymorphismusträgern fanden wir deutliche Unterschiede in der GLP-1-induzierten Insulinsekretion. Die Daten sprechen für eine reduzierte Wirksamkeit von GLP-1 im Hinblick auf die Stimulation der Insulinsekretion in den Beta-Zellen. Aus diesem Grund könnten Veränderungen im GLP-1-Signalweg innerhalb der Beta-Zellen hierbei ebenfalls eine Rolle spielen und der Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TCF7L2-Gen und Diabetes mellitus wird in den nächsten Jahren sicherlich noch genauer entschlüsselt werden.

5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist heutzutage eine Volkskrankheit und eine der wichtigsten internistischen Erkrankungen überhaupt. Weltweit wird nach den genetischen Ursachen des Diabetes mellitus gesucht und in jüngsten Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem TCF7L2-Gen und Diabetes mellitus Typ 2 bestätigt werden. Träger von Polymorphismen im TCF7L2-Gen zeigen eine deutlich verminderte Insulinsekretion, wobei die größte Bedeutung dem Polymorphismus rs7903146 zugeschrieben wird.

Wir untersuchten im Rahmen der TULIP-Studie (Tübinger Lebensstil Interventions Programm) die Auswirkungen des Polymorphismus rs7903146 im TCF7L2-Gen auf den Glukosestoffwechsel. Ein Kollektiv von 1110 Probanden wurde genotypisiert, und wir bestimmten im Anschluss bei allen Teilnehmern mit Hilfe eines oralen Glukosetoleranztestes die Plasmaglukose, Insulinsensitivität und Insulinsekretion. Zusätzlich bestimmten wir bei 155 Personen der Gesamtkohorte die GLP-1-Sekretion. 210 Personen nahmen an einem intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT) kombiniert mit einem euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp und weitere 73 Personen an einem modifizierten hyperglykämischen Clamp mit einer zusätzlichen GLP-1-Infusion und einem Arginin-Bolus teil.

In unseren Kohorten fanden wir die von anderen Studien beschriebenen Träger der Polymorphismen im TCF7L2-Gen in ungefähr gleicher Verteilung vor und konnten den starken Einfluss auf die Insulinsekretion von rs7903146 bestätigen.

Im OGTT zeigte sich bei Trägern des Risikoallels eine verminderte Glukosetoleranz sowie eine signifikante Reduktion des basalen Insulinspiegels. Die Insulinsekretion gemessen als AUC_{CP} / AUC_{Glc} , war bei homozygoten und heterozygoten Trägern des Risikolallels (XT) signifikant erniedrigt.

Bei Trägern des Risikoallels war die Insulinsensitivität erhöht. Die GLP-1-Konzentrationen zwischen den Trägern der einzelnen Genotypen unterschieden sich während des OGTT nicht signifikant voneinander.

Während des IVGTT zeigte sich, dass die Glukose-induzierte Insulinsekretion zwischen Risiko- und Nichtrisikoallelträgern gleich war. Die Insulinsensitivität war ebenfalls gleich. Während des hyperglykämischen Clamps untersuchten wir zunächst ebenfalls die erste und zweite Phase der Glukose-induzierten Insulinsekretion. Auch hier fanden wir keinen signifikanten Unterschied in der Insulinsekretion zwischen den Genotypen. Wir konnten jedoch zeigen, dass die erste und zweite Phase der GLP-1-induzierten Insulinsekretion bei Trägern des Risikoallels (XT) weniger stark ausgeprägt ist. Wir fanden zudem, dass der Polymorphismus rs7903146 keinen signifikanten Einfluss auf die Arginin-induzierte maximale Insulinsekretion nimmt.

Wir konnten somit in unserer Studie zeigen, dass bei Trägern des Risikoallels im Polymorphismus rs7903146 des TCF7L2-Gens nach oraler Gabe von Glukose eine reduzierte, nach intravenöser Gabe von Glukose aber keine reduzierte Insulinsekretion besteht. Hingegen vermittelt die genetische Variation im TCF7L2-Gen eine reduzierte GLP-1-induzierte Insulinsekretion und somit eine GLP-1-Resistenz. Dies scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der reduzierten Insulinsekretion und des Diabetes mellitus Typ 2 zu spielen.

Die weitere Erforschung dieses Gens wird in der Zukunft einen Teil dazu beitragen, Diabetes mellitus Typ 2 möglicherweise früher zu erkennen und besser therapieren zu können.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutzucker
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CP	C-Peptid
C-Peptid	Connecting-Peptide
DNA	Desoxyribonucleidacid
DPPIV	Dipeptidylpeptidase-IV
et al.	lateinisch: und andere
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GIR	Glukose-Infusions-Rate
Glk	Glukose
GLP-1	Glukagon-like-Peptide 1
GLUT	Glukose-Transport-Protein
IGT	Impaired Glucose Tolerance
Ins	Insulin

6 Anhang

ISI	Insulinsensitivitätsindex
ISI _{est}	Insulinsensitivität aus OGTT geschätzt nach Matsuda
IVGTT	Intravenöser Glukosetoleranztest
K ⁺	Kalium-Ionen
KIR6.2	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal 6.2
MIDD	Maternal Inherited Diabetes with Deafness
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	messenger-Ribonucleidacid
NaCl	Natrium-Chlorid
NGT	Normal Glucose Tolerance
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
P	p-Wert
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPAR γ	Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor Gamma
SEM	Standard Error of the Mean
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
TCF7L2	Transkriptionsfaktor-7-like-2
TULIP	Tübinger Lebensstil Interventions Programm
TÜF	Tübinger Familien Studie

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Teilnehmercharakteristika rs7903146, OGTT

Tabelle 2 : Teilnehmercharakteristika rs7903146, GLP-1-Sekretion

Tabelle 3 : Teilnehmercharakteristika rs7903146, IVGTT kombiniert mit
euglykämischem hyperinsulinäischem Clamp

Tabelle 4 : Teilnehmercharakteristika rs7903146, modifizierter
hyperglykämischer Clamp

Tabelle 5.1 : Ergebnisse des OGTT für rs7903146

Tabelle 5.2 : Ergebnisse des OGTT mit zusätzlicher GLP-1 Messung für
rs7903146

Tabelle 6 : Ergebnisse des IVGTT und euglykämischen hyperinsulinämischen
Clamps für rs7903146

Tabelle 7 : Ergebnisse des hyperglykämischen Clamps für rs7903146

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 : Glukosetoleranz, OGTT

Abbildung 1.2 : Plasmaglukose, OGTT

Abbildung 1.3 : Plasmainsulin, OGTT

Abbildung 1.4 : Insulinsekretion, OGTT

Abbildung 1.5 : Insulinsensitivität, OGTT

Abbildung 1.6 : GLP-1-Konzentration, OGTT

Abbildung 2.1 : Insulinsekretion und Glukosekonzentration,
Hyperglykämischer Clamp, rs7903146

Abbildung 2.2 : Insulinsekretion 15. – 120. Minute, Hyperglykämischer Clamp,
rs7903146

Abbildung 2.3 : Insulinsekretion 120. - 200. Minute, Hyperglykämischer Clamp,
rs7903146

7 Literaturverzeichnis

1. **Ahrén B, Holst JJ, Mari A** (2003) Characterization of GLP-1 Effects on β -Cell Function After Meal Ingestion in Humans. *Diabetes Care* 26:2860-2864
2. **American Diabetes Association** (2006) Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 29 : 43-48
3. **Barroso I** (2005) Genetics of Type 2 diabetes. *Diab Med* 22, 517-535
4. **Bell GI, Polonsky KS** (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature* 414, 788-791
5. **Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A** (1999) Microvascular and Micorvascular Reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 48: S1856-1862
6. **Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Dina C, Born C, Marre M, Balkau B, Froguel P** (2006) TCF7L2 Variation predicts hyperglycaemia incidence in a French general population. *Diabetes* 55:3189-3192
7. **Creutzfeldt W** (1979) The incretin concept today. *Diabetologia* 16, 75-85
8. **D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ** (2005) New ways in which GLP-1 can regulate glucose homeostasis. *J Clin Invest* 115:3406-3408
9. **Damcott CM, Pollin TL, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD, Mitchell BD, Shuldinder AR** (2006) Polymorphisms in the Transcription Factor 7-like 2 (TCF7L2) Gene are associated with type 2 diabetes in the Amish. *Diabetes* 55:2654-2659
10. **Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connel P, Stern MP** (1999) Linkage of type 2 diabtes mellitus and of age onset to a genetic location of chromosome 10q in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 64:1127-1140
11. **Dupre J, Ross Sa, Watson D, Brwon JC** (1973) Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 37, 826-828

12. **Efendic S, Potwoord N** (2004) Overview of Incretin Hormones. *Horm Metab Res* 36, 742-746
13. **Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y** (1964) Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* 24,1076-1082
14. **Fehmann HC, Göke R, Göke B**:(1995) Cell and molecular biology of the Incretin Hormones Glucagon-like Peptide-1 and Glucose-dependent Insulin Releasing Polypeptide. *Endocr Rev* 16:390-410
15. **Ferrannini E** (1998) Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477-490
16. **Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, De Bakker Pi, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D** (2006) TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in de Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 355:241-250
17. **Gallwitz B** (2005) New Therapeutic Strategies for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus Based on Incretins. *Rev Diabet Stud* 2: 61-69
18. **Grant SF, Thorleiffson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Seemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gucler JR, Kong A, Stefansson K** (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38:320-323
19. **Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M** (1997) Characterization of the Prediabetic State. *Am J Hypertens* 10 :172S-180S
20. **Haffner SM, D`Agostino JR, Mykkänen L, Tracy R, Howard B, Rewers M, Selby J, Savage P, Saad MF** (1999) Insulin Sensitivity in subjects with type diabetes. *Diabetes Care* 22:562-568
21. **Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ** (1999) Glucagon-like-peptide-1-(7-36) amide is transformed to gluacagon-like-peptide-1-(9-36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140:5356-5363

22. **Holst JJ** (1999) Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1): An Intestinal Hormone, Signalling Nutritional Abundance, with an Unusual Therapeutic Potential. *Trends Endocrinol Metab* Vol. 10, No 6, 229-235
23. **Holst JJ, Gromada J** (2004) Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E199-E206
24. **Holst JJ, Gromada J, Nauck MA** (1997) The pathogenesis of NIDDM involves a defective expression of the GIP receptor. *Diabetologia* 40:984-6
25. **Holst JJ, Orskov C** (2001) Incretin hormones-an update. *Scand J Clin Lab Invest* 61, Suppl 234: 75-86
26. **Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B**: Verständigung zwischen den Zellen. 332-432, In: *Biochemie des Menschen 2. Auflage 2003*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
27. **Jones IR, Owens DR, Luzio S, Williams S, Hayes TM** (1989) The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 32:668-77
28. **Kahn CR, Vicent D, Doria A** (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 47: 509-31
29. **Kimber CH, Doney ASF, Pearson ER, McCarthy MI, Hattersley AT, Leese GP, Morris AD, Palmer CNA** (2007) TCF7L2 in the Go-DARTS study: evidence for a gene dose effect on both diabetes susceptibility and control of glucose levels. *Diabetologia* 50:1186-1191
30. **Löffler G, Kellerer M, Häring HU**: Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. 838-864, In: *Löffler G, Petrides P: Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage 2003*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
31. **Malecki MT, Klupa T** (2005) Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol Reports* 57, 20-32
32. **Matsuda M, DeFronzo RA** (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 22: 1462-1470
33. **McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS** (1964) New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* II.20-21

34. **Mikels AJ, Nusse R** (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25: 7461-7468
35. **Moore B, Edie ES, Abram JH** (1906) On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane. *Biochem J* 1, 28-38
36. **Nauck MA** (2004) Der Inkretineffekt und Regulation des Glukosestoffwechsels durch GLP-1, S.13-27. In: Gallwitz B.: GLP-1 – Therapiepotential bei Diabetes mellitus. 1. Auflage, UNI-MED Verlag, Bremen, London, Boston
37. **Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W** (1993) Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 [7-36] amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 912-7
38. **Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Jolst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W** (1993) Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36] amide but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91, 301-7
39. **Nijpels G** (1998) Determinants for the progression from impaired glucose tolerance to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 28: 8-13
40. **Novoa F, Boronat M, Saavedra P, Diaz-Cremades JA, Varillas VF, LaRoche F, Carrillo A** (2005) Differences in Cardiovascular Risk Factors, Insulin Resistance, and Insulin Secretion in Individuals with normal Glucose tolerance and in Subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 28:2388-2393
41. **Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB** (2003) The Metabolic Syndrome. *Arch Intern Med* 163: 427-436
42. **Perley MJ, Kipnis DM** (1967) Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 46, 1954-1962
43. **Poeggel G, Meitinger T** Von der DNA zum Protein: Transkription 20-29. In: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E :Taschenlehrbuch Humangenetik, 7. Auflage 2006, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
44. **Rett K** (1999) The relation between insulin resistance and cardiovascular complications of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Obes Metab* 1: S8-S16

45. **Reynisdottir I, Thorleifsson G, Benediktsson R, Sigurdsson G, Emilsson V, Einarsdottir AS, Hjorleifsdottir EE, Orlygsdottir GT, Bjornsdottir GT, Saemundsdottir J, Halldorsson S, Hrafnkelsdottir S, Sigurjonsdottir SB, Steinsdottir S, Martin M, Kochan JP, Rhees BK, Grant SFA, Frigge ML, Kong A, Gudnason V, Stefansson K, Gulcher JR** (2003) Localization of a susceptibility gene for type 2 diabetes to chromosome 5q34-q35.2. *Am J Hum Genet* 73:323-335
46. **Saltiel AR** (2001) New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, Vol. 104,517-529
47. **Saxena R, Gianniny L, Burtt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjogren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, Lindblad U, Daly MJ, Tuomi T, Hirschhorn JN, Ardlie KG, Groop LC, Altshuler D** (2006) Common single Nucleotide Polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 55:2890-2895
48. **Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N, Duren WL, Chines PS, Stringham HM, Erdos ME, Valle TT, Tuomilehto J, Bergmann RN, Mohlke KL, Collins FS, Boehnke M** (2006) Association of Transcription Factor 7-like 2 (TCF7L2) Variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 55:2649-2653
49. **Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K** (2008) Transcription Factor 7-like 2 regulates β -cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* 57:645-653
50. **Smith U** (2006) TCF7L2 and type 2 diabetes – we WNT to know. *Diabetologia* 50:5-7
51. **So Wy, Ng MCY, Lee SC, Sanke T, Lee HK, Chan JCN** (2000) Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Hong Kong Med J* Vol 6 No1, 69-76
52. **Stumvoll M, Fritsche A, Häring HU** (2002) Clinical characterization of insulin secretion as the basis for genetic analyses. *Diabetes* 51: S122-S129
53. **Tariverdian G, Buselmaier W** : Aufbau und Funktion des Genoms: Variabilität des Genoms 19-22, In: *Humangenetik* 3. Auflage, 2003, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
54. **Tariverdian G, Buselmaier W** Aufbau und Funktion des Genoms: Transkription und Translation der genetischen Information 22-30, In: *Humangenetik* 3. Auflage, 2003, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

55. **Tiffin N, Adie E, Turner F, Brunner HG, vanDriel MA, Oti M, Lopez-Bigas N, Ouzounis C, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Adeyemo A, Patti ME, Semple CAM, Hide W** (2006) Computational disease gene identification: a concert of methods prioritizes type 2 diabetes and obesity candidate genes. *Nucleic Acids Res* 34, No10, 3067-3081
56. **Unger RH , Eisentraut AM** (1969) Entero-insular axis. *Arch Intern Med.* 123, 261-266
57. **Villard J** (2004) Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly* 134:571-579
58. **VilSBoll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ** (2003) Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul Pept* 114:115-121
59. **Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H** (2004) Global Prevalence of Diabetes – Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047 -1051
60. **Yi F, Brubaker PL, Jin T** (2005) TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3 beta. *Biol Chem.* 280:1457-1464
61. **Zander M, Madsbad S, Holst JJ** (2001) GLP-1 for six weeks reduces weight and improves insulin sensitivity and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50 supp. 2, A31
62. **Zeggini E, McCarthy MI** (2007) TCF7L2: the biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia* 50:1-4
63. **Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JE, van Dam RM, Hu FB** (2006) Variant of Transcription Factor 7-like 2 (TCF7L2) Gene and the Risk of Type 2 Diabetes in large cohorts of U.S. Women and Men. *Diabetes* 55:2645-2648
64. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J** (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787

8 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Fritsche für die Bereitstellung des Themas und die Sicherheit, dass aus meiner Doktorarbeit etwas werden würde.

Vielen herzlichen Dank an Dr. med. Silke Schäfer für ihr großes Engagement und die tatkräftige Unterstützung bei sämtlichen Fragestellungen und Problemen im Zusammenhang mit der Doktorarbeit.

Herzlichen Dank an Dr. med. Claus Thamer, Dr. med. Otto Tschritter, Dr. med. Konstantinos Kantartzis und Dr. med. Silke Schäfer für die Hilfe und Anleitung bei der Durchführung der Versuche.

Ein besonderes Dankeschön gilt Anna Bury, Heike Luz und Ellen Kollmar für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Probanden. Es war eine schöne Zeit mit euch im Labor! Danke!

Herzlichen Dank auch an Barbara Horrer für die Koordination der einzelnen Termine und den reibungslosen zeitlichen Ablauf.

Herzlich bedanken möchte ich mich zu guter Letzt bei allen Probanden ohne deren bereitwillige Teilnahme an den Versuchen die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Cornelia Laudenbach
Geburtsdatum: 29. März 1983
Geburtsort: Rottweil
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989-1993 Grundschulen Gosheim und Spaichingen
1993-1999 Progymnasium Gosheim
1999-2002 Albertus-Magnus-Gymnasium Rottweil
Juni 2002 Allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung:

Seit April 2003 Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 2005 Ärztliche Vorprüfung
August 2005 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Universitätsklinikums Tübingen
September 2005 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Universitätsklinikums Tübingen
März 2006 Famulatur in der Kinderklinik, Abteilung Neonatologie, des Universitätsklinikums Tübingen
August 2006 Famulatur in der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Tübingen
März 2007 Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie am U.S. Army Hospital MEDDAC, Heidelberg
Februar 2008 bis Januar 2009 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen, Wahlfach Allgemeinmedizin
03.Juni 2009 Ärztliche Prüfung
05.Juni 2009 Approbation