

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Eine neue Variante im menschlichen *KCNA3*-Gen wird
mit niedriger Insulinsensitivität und eingeschränkter
Glukosetoleranz in Verbindung gebracht**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Katharina Kienzle
aus
Stuttgart

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Fritsche

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Diabetes mellitus Typ 2.....	1
1.2	Insulinwirkung und Insulinresistenz.....	2
1.3	Genetische Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2.....	5
1.4	Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.3.....	6
1.5	Fragestellung und Hypothese	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Studienaufbau.....	10
2.2	Probanden.....	10
2.2.1	Teilnahmevoraussetzungen und Ausschlusskriterien.....	10
2.2.2	Teilnehmer	11
2.3	Versuchsablauf.....	12
2.3.1	Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)	12
2.3.2	Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	12
2.3.3	Tetrapolare Impedanzmessung (TPI).....	13
2.4	Verwendete Medikamente.....	14
2.4.1	Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)	14
2.4.2	Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	14
2.5	Analytik	15
2.5.1	Aufbereitung der Blutentnahmen.....	15
2.5.2	Verfahren zur Ermittlung der einzelnen Blutparameter.....	15
2.5.3	Körperfett.....	16
2.5.4	Genotypisierung	16
2.5.5	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	17

INHALTSVERZEICHNIS

2.6	Berechnungen	19
2.6.1	Allgemein.....	19
2.6.2	Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)	19
2.6.3	Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	20
2.6.4	Haplotyp-Analyse	20
2.7	Statistische Auswertung.....	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Genetische Varianten im <i>KCNA3</i>-Gen	22
3.2	Geneffekte.....	24
3.2.1	Adipositasparameter	24
3.2.2	Plasmaglukose, Plasmainsulin und freie Fettsäuren im Plasma	25
3.2.3	Insulinsensitivität	28
3.2.4	Glukosetoleranz	29
3.2.5	Insulinsekretion	30
3.3	Haplotyp-Analyse	30
3.4	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	30
4	Diskussion.....	33
4.1	Eigene Ergebnisse	33
4.2	Kv1.3 in der Literatur.....	35
4.2.1	Kv1.3 und Insulinsensitivität	35
4.2.2	Kv1.3 und Glukosetransport	36
4.2.3	Kv1.3 und inflammatorische Zytokine.....	37
4.2.4	Effekte auf das Riechsystem.....	40
4.3	Schlussfolgerung	41
5	Tabellen	43
5.1	Polymorphismen ohne relevanten metabolischen Effekt	43
5.2	Metabolische Effekte des T-1545C-Polymorphismus.....	45
5.3	Haplotyp-Analyse	46

INHALTSVERZEICHNIS

6	Zusammenfassung.....	47
7	Anhang.....	49
7.1	Abkürzungsverzeichnis	49
7.2	Abbildungsverzeichnis	51
7.3	Tabellenverzeichnis	51
8	Literaturverzeichnis	52
9	Danksagung.....	64
10	Lebenslauf	65

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Veränderte Lebensgewohnheiten und Umweltbedingungen sowie steigende Lebenserwartung lassen die Prävalenz der chronischen Glukosestoffwechselstörung des Diabetes mellitus Typ 2 weltweit kontinuierlich steigen, wobei immer mehr Kinder und Jugendliche betroffen sind (38, 72). Derzeit liegt die Häufigkeit bei ca. 125 Millionen Erkrankten und in den nächsten 10 Jahren dürfte mit einer weiteren Zunahme von 50% gerechnet werden. Die zunehmende Prävalenz des Typ-2-Diabetes und die damit verbundenen Komplikationen stellen heute eine große medizinische Herausforderung dar und auch die gesundheitsökonomischen Konsequenzen sind gravierend (92).

Nach heutigem Verständnis wird der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 eine multifaktorielle Genese zugrunde gelegt: Neben genetischen Faktoren spielen äußere Einflüsse und Umweltfaktoren eine wichtige Rolle (55, 93). Die erbliche Veranlagung gilt als gesichert. Geschwister von Typ-2-Diabetikern erkranken in bis zu 60% an einem Diabetes mellitus Typ 2. Kinder eines diabetischen Elternteils haben ein Risiko von 40%, die Erkrankung zu entwickeln (17, 42, 43). Als sekundär erworbene und damit beeinflussbare soziobiologische Faktoren seien in erster Linie Adipositas, Bewegungsmangel und fettreiche Ernährung genannt.

In den meisten Fällen ist der Typ-2-Diabetes mit weiteren Stoffwechselabnormitäten vergesellschaftet, die unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden und nicht nur eine zentrale pathologische Rolle beim Diabetes mellitus Typ 2 spielen, sondern auch Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Charakteristische Bestandteile des metabolischen Syndroms sind Insulinresistenz, stammbetonte Adipositas, arterielle Hypertonie und Dyslipoproteinämie (40, 93).

Die vergleichsweise schleichend verlaufende klinische Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 zeichnet sich pathophysiologisch durch eine Resistenz der peripheren Gewebe gegenüber der Insulinwirkung und durch eine Insulinsekretionsstörung der pankreatischen Betazellen aus und ist somit Endpunkt der Dysbalance zwischen Insulinangebot und Insulinbedarf. Die oft schon Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation bestehende Insulinresistenz kann zunächst durch ein vermehrtes Insulinangebot kompensiert werden. Erst ein relatives Sekretionsversagen und ein quantitativer Betazelluntergang führen zu chronisch erhöhten Blutzuckerspiegeln (14).

Die klinische Relevanz des Diabetes mellitus Typ 2 wird auch im Hinblick auf die Folgeschäden deutlich. Durch das Auftreten der eigentlichen Krankheit erst nach vielen Jahren sind oft schon Folgen der schlechten Stoffwechsellage vorhanden (5). Besonders das kardiovaskuläre Risiko ist gegenüber Nichtdiabetikern stark erhöht, so ist laut epidemiologischen Studien die Mortalität an Herz-Kreislauf-Krankheiten um das 3-4fache gesteigert (16, 61).

1.2 Insulinwirkung und Insulinresistenz

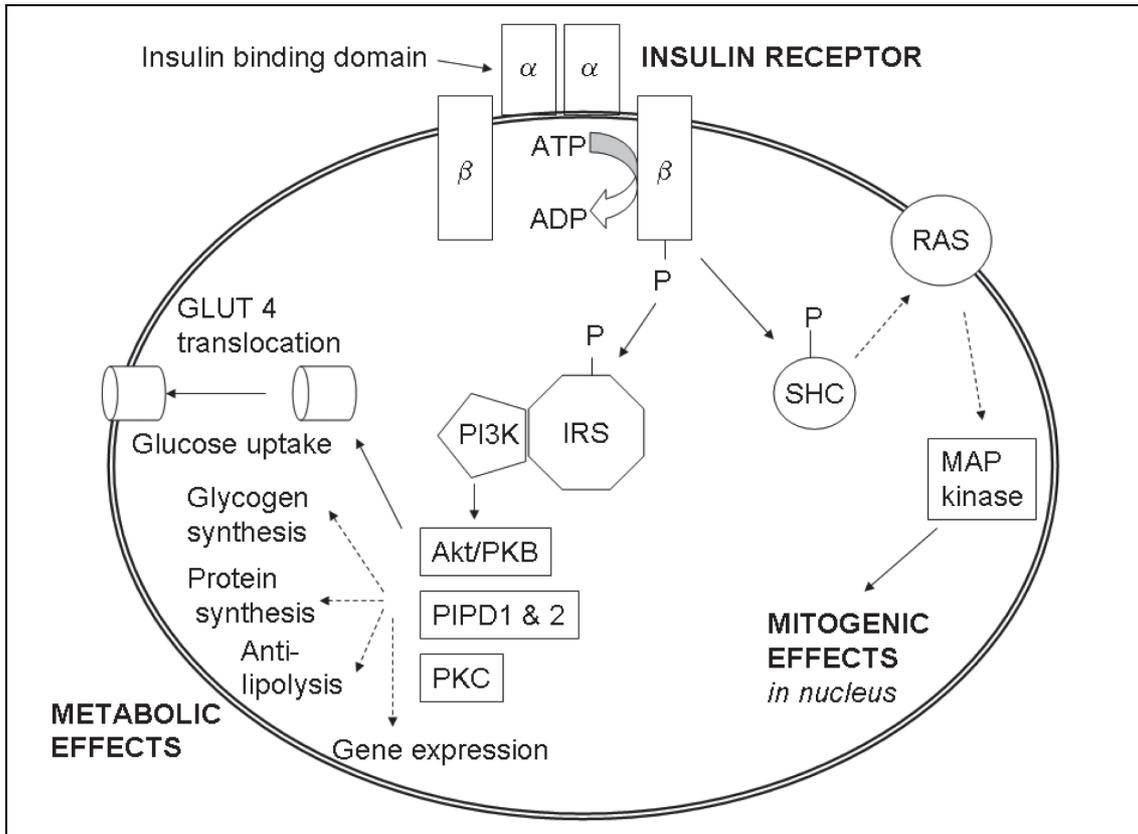
Insulinwirkung

Die Wirkungen von Insulin sind vielfältig: Hauptsächlich wirkt es auf den Blutzuckerspiegel, indem es die Glukoseaufnahme speziell in Muskel- und Fettzelle fördert, die hepatische Glukoneogenese und Glykogenolyse hemmt sowie die Glykogensynthese stimuliert. Daneben hat Insulin als anaboles Hormon Auswirkungen auf den Lipid- und Proteinmetabolismus (29).

Die Insulinwirkung an den Zielzellen wird durch einen spezifischen, membranständigen Rezeptor vermittelt, der durch Autophosphorylierung an Tyrosinresten für die weitere Signalübertragung sorgt (39). Ausgehend von der Autoaktivierung der Rezeptortyrosinkinase werden, vermittelt durch Koppelungsproteine (wie beispielsweise die Insulinrezeptorsubstrate, IRS), die verschiedenen Effekte des Insulins über Tyrosin- und Serinphosphorylierungs-

kaskaden in der Zelle ausgelöst. Auf der Ebene der Postkinasesignaltransduktion spielt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) eine zentrale Rolle. Dieses Enzym wirkt über Serin- und Threoninkinasen wie beispielsweise die Proteinkinase B (PKB/Akt) oder die Proteinkinase C (PKC) auf die Signaltransduktion unter anderem zum Glukosetransportsystem und zur Glykogensynthetase. Neben dem Signalweg über die PI-3-Kinase existiert die MAP-Kinasekaskade (MAP-Kinase = mitogen aktivierte Proteinkinase), die mitunter für die Mitogenese verantwortlich ist (55, 69, 83, 87).

Das Glukosetransportsystem stellt neben verschiedenen Schlüsselenzymen ein wichtiges Effektorsystem der Insulinwirkung dar. Es existieren mehrere verschiedene Isoformen der Glukosetransporter (GLUT-1 bis GLUT-10) mit spezifischen Expressionsmustern. Für die Aufnahme von Glukose in die Muskel- und Fettzelle sind die Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 bedeutsam (29). Neben der durch die Insulinbindung an den Rezeptor ausgelösten Signalkette zum Glukosetransportsystem, löst eine Muskelkontraktion insulinunabhängig durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Translokation von Glukosetransportmolekülen zur Plasmamembran aus (47, 48). Neuere Studien weisen darauf hin, dass Kalzium auch bei der insulinabhängigen Aktivierung des Glukosetransportsystems eine Schlüsselfunktion spielt (86).



PIPD1 & 2 = Phosphatidylinositol dependent protein kinase 1 & 2
 RAS = Rat sarcoma protein
 SHC = adaptor protein with src-homology

Abbildung 1.1: Insulinsignaltransduktion (87)

Insulinresistenz

Die Insulinresistenz ist ein bedeutender Faktor in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 (49). Dabei besteht eine verminderte Ansprechbarkeit der Rezeptoren insulinempfindlicher Gewebe, was insbesondere Skelettmuskel, Fettgewebe und Leber betrifft. Infolgedessen kommt es zu einer herabgesetzten Aufnahme und Verwertung von Glukose in Muskel- und Fettzelle und zu einer unzureichenden Suppression der hepatischen Glukoneogenese mit der Folge eines erhöhten Plasmaglukosespiegels (14).

Neben primär genetischen Resistenzmechanismen sind sekundäre Resistenzmechanismen wie Adipositas und Bewegungsmangel für die Insulinresistenz verantwortlich. Die Korrelation von Adipositas und Insulinresistenz zeigt sich bei einem Anteil von 80% übergewichtiger Patienten mit manifestem Typ-2-Diabetes deutlich. Neben den bei Adipositas erhöhten freien Fettsäuren scheinen vom vergrößerten Fettgewebe vermehrt sezernierte Mediatoren, die sogenannten Adipozytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Leptin, Adiponectin und Resistin, an der Ausprägung der Insulinresistenz beteiligt zu sein (4).

Auf zellulärer Ebene können Störungen auf jeder Stufe der Signaltransduktionskette zur Insulinresistenz führen. Eine reduzierte Aktivität der Rezeptorkinase kann ebenso wie eine gestörte Postkinasesignalübertragung, ein herabgesetzter Glukosetransport in die Zelle, eine verminderte Glukosephosphorylierung oder eine erhöhte Aktivität der Glykogensynthase eine Insulinresistenz zur Folge haben (3, 12, 13, 24, 64).

1.3 Genetische Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2

Bei der Vererbung des Diabetes mellitus Typ 2 wird von einem polygenetischen Erbgang ausgegangen. Bislang durchgeführte Studien legen nahe, dass Mutationen und Polymorphismen in Genen für Insulinsignalmoleküle mit relativ großer Häufigkeit in der Allgemeinbevölkerung existieren. Meistens aber genügen einzelne Defekte alleine nicht, um den Phänotyp der Erkrankung auszuprägen, sondern erst das Zusammenspiel verschiedener Mutationen und sekundärer Faktoren führt zur Manifestation (36, 55).

Die Suche nach Genen, die den Diabetes mellitus Typ 2 verursachen können, schließt diejenigen Gene ein, welche die Insulinsensitivität und die Insulinsekretion steuern. Zu den Kandidatengenen, die eine Rolle bei der Signalübertragung des Insulins oder bei der Adipositasentwicklung spielen, zählen beispielsweise Polymorphismen in den Genen der Insulinrezeptorsubstrate

(IRS), des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor Gamma (PPAR γ), im *KIR6.2*-Gen (einwärts gleichrichtender Kaliumkanal 6.2-Gen) oder im *FTO*-Gen (Fat mass and obesity associated-Gen) (2, 22, 27, 44, 77).

Mit der Methode des Genomscreenings, bei der Teile des Genoms auf diabetesassoziierte Veränderungen untersucht werden, können noch unbekannte Gene aufgefunden werden, die eine potenzielle Rolle bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes spielen. Die bisher identifizierten Gen-Regionen befinden sich auf verschiedenen Chromosomen, so beispielsweise das Human hematopoietically expressed homeobox (*HHEX*)-Gen und das Transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*)-Gen auf Chromosom 10, das CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (*CDKAL1*)-Gen auf Chromosom 6 oder das Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8 (*SLC30A8*)-Gen auf Chromosom 8 (85).

Das menschliche *KCNA3*-Gen auf Chromosom 1, das für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 kodiert, stellt ein mögliches Kandidatengen dar. Im Tiermodell wiesen Knockout-Mäuse eine erhöhte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz auf (88, 89). Analog dazu könnten genetische Varianten im menschlichen *KCNA3*-Gen einen Einfluss auf die Glukosehomöostase haben. Dies soll im Folgenden untersucht werden.

1.4 Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.3

Kaliumsensitive Kanäle machen eine große und sehr unterschiedliche Gruppe von Ionenkanälen aus, die ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vorkommen (30). Spannungsabhängige kaliumsensitive Kanäle (Kv) bilden die größte Gruppe der kaliumsensitiven Kanäle und werden mittels der Sequenzhomologie in zwölf verschiedene Familien eingeteilt (Kv1.x – Kv12.x). Der Kv1.3-Kanal gehört neben acht anderen Kanälen zur Shaker-Subfamilie (Kv1.1 – Kv1.8) (26).

Kv-Kanäle liegen als Hetero- oder Homotetramere vor und bestehen aus vier integralen Plasmamembranproteinen (α -Untereinheiten), die wiederum jeweils

sechs hydrophobe, transmembranäre Segmente (S1-S6) enthalten. Die porenbildenden α -Untereinheiten können mit bis zu vier weiteren Proteinen (β -Untereinheiten) auf der zytoplasmatischen Seite assoziiert sein, die unter anderem die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals beeinflussen (34, 35, 59, 80).

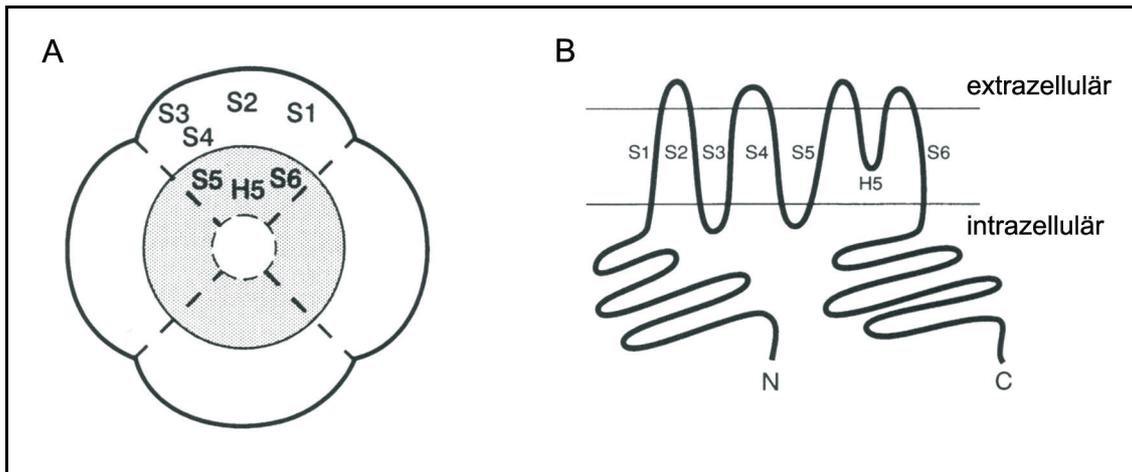


Abbildung 1.2: Membrantopologisches Modell der Kv-Kanäle

(A) Schematische Darstellung der Kanalpore. (B) Strukturelle Elemente der α -Untereinheit (Transmembransegmente S1-S6, Spannungssensor S4, porenbildende H5-Region) (modifiziert nach (34)).

Der Kv1.3-Kanal wird in den insulin sensitiven Geweben Skelettmuskel, Fettgewebe, Leber und Gehirn, aber auch in Lymphozyten, in der Niere, im Hoden, in Spermatozoen und in Osteoklasten exprimiert (88, 89). Im Gehirn ist er in verschiedenen spezifischen Regionen lokalisiert, wobei er in den Neuronen des Bulbus olfactorius einen beträchtlichen Anteil zu den gemessenen Kaliumströmen beiträgt (19).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle regulieren das Zellmembranpotenzial durch Kontrolle des Kaliumausstroms aus der Zelle und können somit eine große Zahl zellulärer Prozesse aufeinander abstimmen (47). Neben der Regulation neuronaler Erregbarkeit durch Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials spielt der Kanal bei der Zellvolumenregulation, bei der Apoptose, bei der T-Zell-Stimulation und bei der renalen Flüssigkeitshomöostase eine Rolle

(7, 11, 15, 47, 75). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass der Kv1.3-Kanal zudem in den Metabolismus, die Glukosehomöostase und die Diskriminationsfähigkeit von Gerüchen involviert ist (20, 25, 88, 89).

Die Aktivität des spannungsabhängigen Kv1.3-Kanals wird durch eine komplexe Art und Weise kontrolliert. Neben der quantitativen Regulierung der mRNA- und Proteinkonzentration sind zahlreiche weitere Mechanismen zur Kontrolle der Aktivität und Expression der Kv-Kanäle beschrieben worden. Änderungen des Zellmembranpotenzials führen ebenso wie pH-Wert-Schwankungen, Temperaturveränderungen und Fluktuationen der extra- und intrazellulären Ionenkonzentration zu einer Beeinflussung der Kanalaktivität und -expression (9, 47, 60, 73, 78). Daneben spielt die posttranslationelle Phosphorylierung des Kanalproteins oder assoziierter Proteine durch Proteinkinasen eine wichtige Rolle. Die Aminosäuren-Sequenz des Kv1.3-Kanals enthält mehrere potenzielle Loci zur Phosphorylierung durch Serin/Threonin-Kinasen wie Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) oder Serumglukokortikoidkinase 1 (SGK1) und durch Tyrosinkinassen (8, 18, 28, 53, 62).

1.5 Fragestellung und Hypothese

Im Knockout-Modell bei Mäusen führte die Defizienz des *KCNA3*-Gens zu reduziertem Körpergewicht, erhöhter Insulinsensitivität und niedrigeren Plasmaglukosewerten (88, 89). Zusätzlich konnten durch die Hemmung der Kv1.3-Kanal-Aktivität Effekte auf das Riechsystem in Form eines „super-smeller-Phänotyps“ beobachtet werden (20). Diese im Tierversuch erhobenen Daten lassen eine relevante Bedeutung des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3 in der Glukosehomöostase des Menschen mit wesentlichem Einfluss auf die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz vermuten.

In der folgenden Arbeit soll die Auswirkung von Polymorphismen im menschlichen *KCNA3*-Gen untersucht werden, die durch eine Beeinflussung der Aktivität des Kaliumkanals eine analoge Rolle beim Menschen spielen

könnten. Hierfür wurde bei 50 Nichtdiabetikern die entsprechende Region des *KCNA3*-Gens sequenziert und auf vorhandene Mutationen geprüft. Die dabei identifizierten Polymorphismen wurden daraufhin in einer großen Kohorte auf deren funktionelle Relevanz bezüglich anthropometrischen Daten, Glukosetoleranz, Insulinsensitivität und Insulinsekretion untersucht.

Unsere Hypothese ist, dass genetische Varianten im *KCNA3*-Gen die Insulinwirkung beeinträchtigen und somit die Entstehung eines Typ-2-Diabetes begünstigen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die Versuche fanden im Rahmen der Tübinger Familienstudie für Diabetes mellitus Typ 2 (TÜF-Studie) statt. Hierbei handelt es sich um eine Querschnittsstudie, in der Zusammenhänge zwischen genetischen bzw. serologischen Markern und Insulinresistenz untersucht werden. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen geprüft und genehmigt (Projektnummer des Ethikvotums: 422/2002). Die Teilnehmer der Studie wurden zuvor mündlich und schriftlich über die jeweilige Untersuchung, deren Ablauf, Ziele und mögliche Risiken aufgeklärt. Über die genetische Analyse wurde gesondert unterrichtet. Die Probanden hatten jederzeit die Möglichkeit, ihr schriftlich erteiltes Einverständnis zurückzuziehen und die Studienteilnahme zu beenden.

2.2 Probanden

2.2.1 Teilnahmevoraussetzungen und Ausschlusskriterien

Für die Studie wurden bevorzugt Personen gesucht, die ein erhöhtes Risiko hatten, an einem Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (positive Familienanamnese, Übergewicht, bekannte Glukosetoleranzstörung, Zustand nach einem Gestationsdiabetes). Es wurden aber auch Kontrollpersonen ohne bekannte Risikofaktoren eingeschleust.

Als allgemeine Ausschlusskriterien wurden definiert:

- ein diagnostizierter Diabetes mellitus,

- die Einnahme von Medikamenten, welche bekannte Wirkungen auf Glukosetoleranz, Insulinsekretion oder Insulinsensitivität haben,
- Erkrankungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes, die mit einer Malabsorption der verabreichten Glukose bei dem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) einhergehen würden,
- weniger als 3 Monate zurückliegende Operationen oder akute Erkrankungen,
- eine Schwangerschaft, eine weniger als 3 Monate zurückliegende Entbindung und / oder Stillperiode.

2.2.2 Teilnehmer

Die nachstehende Tabelle zeigt die Daten der 552 am oralen Glukosetoleranztest teilnehmenden Probanden.

Bei 304 Teilnehmern wurde zusätzlich ein euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp durchgeführt.

	OGTT (n = 552)	Clamp (n = 304)
Anzahl (w/m)	320 / 232	154 / 150
BMI (kg/m ²)	26.5 ± 0.3	25.6 ± 0.3
Körperfett (%)	27.6 ± 0.4	25.3 ± 0.5
Alter (Jahre)	37.2 ± 0.5	34.6 ± 0.6
WHR*	0.86 ± 0.004	0.86 ± 0.005
Plasmaglukose nüchtern (mM)	4.96 ± 0.002	4.83 ± 0.03
Plasmainsulin nüchtern (pM)	53 ± 2	47 ± 2

Means (Mittelwerte) ± SEM (Standardabweichung des Mittelwertes)

* Waist-to-hip-ratio

Tabelle 2.1: Teilnehmercharakteristika des OGTTs und des Clamps

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)

Die Versuchsteilnehmer wurden dazu aufgefordert, in den Tagen vor dem Test ihren üblichen Nahrungs- und Bewegungsgewohnheiten nachzugehen und in den 10 Stunden davor keine Nahrung mehr zu sich zu nehmen.

Der OGTT begann morgens um 8:30 Uhr mit der basalen Blutentnahme. Es wurden Glukose, Insulin, freie Fettsäuren sowie weitere Routineparameter wie Blutbild, Elektrolyte und Leberenzyme bestimmt. Nach oraler Gabe von 75 g Glukose gelöst in 300 ml Wasser erfolgten nach 30, 60, 90 und 120 Minuten weitere Blutentnahmen zur Bestimmung von Glukose, Insulin und freien Fettsäuren (FFA). Während des Versuches waren Nahrungsaufnahme, körperliche Anstrengung und Rauchen untersagt.

2.3.2 Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

Der euglykämische hyperinsulinämische Clamp dient der Bestimmung der Insulinsensitivität. 304 der 552 Probanden nahmen daran teil.

Der Versuch startete morgens um 8:00 Uhr und die Probanden wurden dazu angehalten, eine zwölfstündige Nahrungskarenz vor Beginn einzuhalten. Wie beim OGTT waren Nahrungsaufnahme, körperliche Anstrengung und Rauchen während des Versuchs nicht gestattet.

Zur Blutentnahme und zur Bestimmung der Plasmaglukose wurde eine Handrückenvene punktiert. Die „heated-hand“-Methode gewährleistet durch eine Erweiterung arteriovenöser Shunts die Arterialisierung des venösen Blutes (56). Für die Infusionslösungen wurde eine Vene der Ellenbeuge des kontralateralen Armes mit einem peripheren Venenzugang versehen.

Ziel des euglykämischen hyperinsulinämischen Clamps ist es, den Blutzucker-

spiegel auf einem konstanten Wert zu halten (engl.: to clamp = (fest)klemmen), welcher dem Nüchternblutzuckerwert entspricht. Die Konzentration an Nüchternglukose im Blut wurde zu den Zeitpunkten -30, -15 und 0 Minuten bestimmt. Der anschließend verabreichte Insulinbolus von 1.0 U/m^2 und die darauf folgende Insulininfusion von $40 \text{ mU/m}^2/\text{min}$ versetzten die Probanden in einen hyperinsulinämischen Zustand. Nach 3 Minuten wurde eine variable Infusion von 20%iger Glukoselösung gestartet, die einer möglichen Hypoglykämie entgegenwirkte. Alle 5 Minuten wurde Blut entnommen und der Glukosewert bestimmt. Je nach Ergebnis wurde daraufhin die Glukoseinfusionsrate (GIR) verändert und der Blutzucker möglichst konstant auf den Zielwert eingestellt.

Für die Messung der Insulinsensitivität, die aus der Glukoseinfusionsrate und dem Plasmainsulinspiegel berechnet wird (siehe Formeln), wurden steady-state-Bedingungen benötigt (Plasmaglukose und GIR konstant), welche in der Regel zwischen Minute 60 und 120 vorliegen. Die Konzentration an Plasma-insulin wurde im basalen Zustand und im steady-state des Clamps ermittelt.

Nach 120 Minuten wurde die Insulininfusion beendet und die Rate an Glukose unter Fortführung der Messungen und unter Nahrungsaufnahme stetig gesenkt, um eventuelle hypoglykämische Nachwirkungen des Insulins auszuschließen.

2.3.3 Tetrapolare Impedanzmessung (TPI)

Mit dieser Methode lässt sich der Fettgehalt des Körpers ermitteln. Hierfür wurde an den Probanden je eine Elektrode an Hand und Fuß derselben Körperhälfte angebracht und über eine Widerstandsmessung die fettfreie Körpermasse (lean-body-mass, LBM), der Wassergehalt und der prozentuale Fettanteil bestimmt.

2.4 Verwendete Medikamente

2.4.1 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)

Glukoselösung: Dextro® O.G.-T.,
hergestellt von F. Hoffmann-La Roche AG, Mannheim,
Deutschland.

Kochsalzlösung: NaCl-Lösung 0.9%,
hergestellt von Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg,
Deutschland;
Verwendung als Spüllösung.

2.4.2 Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

Glukoselösung: Glucosteril 20%,
hergestellt von Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg,
Deutschland.

Insulin: Insuman Rapid (Normalinsulin),
hergestellt von Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main, Deutschland.

Kochsalzlösung: NaCl-Lösung 0.9%,
hergestellt von Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg,
Deutschland.

2.5 Analytik

2.5.1 **Aufbereitung der Blutentnahmen**

Die Glukosekonzentration wurde jeweils sofort nach der Blutentnahme aus Vollblut ermittelt und in Plasmaglukose umgerechnet. Für die Bestimmung von Plasmainsulin wurde EDTA-Blut und für die Bestimmung der freien Fettsäuren Serum abgenommen.

Die Blutproben wurden gleich nach der Entnahme auf Eis gekühlt und bei 4°C und 4000 upm 7 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abpipetieren des Überstandes wurde das Plasma / Serum bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

2.5.2 **Verfahren zur Ermittlung der einzelnen Blutparameter**

Die Konzentration an Glukose, Insulin und freien Fettsäuren im Plasma wurde während des OGTTs und des euglykämischen hyperinsulinämischen Clamps ermittelt. Dazu wurden folgende Testverfahren angewandt:

Glukose: enzymatisches Testverfahren (Glukose-Oxidase-Methode) mit dem Gerät YSI 2300 STAT plus, hergestellt von Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA.

Insulin: Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA), hergestellt von Abbott Laboratories, Tokio, Japan.

Freie Fettsäuren: enzymatisches Testverfahren, hergestellt von WAKO chemicals, Neuss, Deutschland.

2.5.3 Körperfett

Gerät:	BIA- 101A
Hersteller:	RJL Systems, Detroit, USA
Verfahren:	Bioelektrische Impedanzmessung
Software:	Body Composition Weight Management Program, Body Composition through Impedance Technology, Beta Test Version 0.9, Copyright RJL Systems 1989, RJL Systems 9930 Whithier, Detroit M / 48224, USA

2.5.4 Genotypisierung

Das Blut für die DNA-Analysen wurde bei der basalen Blutentnahme des OGTTs nach Einwilligung der Probanden abgenommen. Die Isolierung der DNA aus Vollblut geschah mithilfe eines kommerziellen Verfahrens (Nucleospin; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Ein ungefähr 4.5 kb großer Abschnitt auf Chromosom 1 (Position 110927146 - 110931517) wurde in 50 Fällen vollständig sequenziert und auf das Vorliegen von Polymorphismen untersucht. Dieser Abschnitt schließt den Promotor / den 5'-nicht-kodierenden Bereich (5'-UTR), die gesamte Länge der kodierenden Region und den 3'-nicht-kodierenden Bereich (3'-UTR) des *KCNA3*-Gens ein. Zunächst wurden für die Vervielfachung des Zielgebietes mehrere spezifische Primer konstruiert, welche Amplifikationsprodukte von ungefähr 230 bis 600 bp Länge ergaben. Zehn überlappende Reaktionen wurden benötigt, um die Ziel-DNA-Sequenz zu vervielfachen. Anschließend wurden die PCR (Polymerase Chain Reaction)-Erzeugnisse mittels direkter Sequenzierung auf Polymorphismen untersucht, wobei durch die Anwendung der bidirektionalen Methode Artefakte vermieden werden konnten.

Testname: ABI PRISM 310
Hersteller: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Verfahren: Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit

Die Genotypisierung der dabei erfassten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) erfolgte bei 552 DNA-Proben. Durch den Einsatz von fluorogenen Sonden bestand die Möglichkeit, während der PCR gezielt nur das gewünschte DNA-Produkt nachzuweisen.

Testname: GeneAmp PCR system 7000
Hersteller: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Verfahren: TaqMan assay

Detektion der Fluoreszenz:

Gerät: ABI PRISM 7000 sequence detector
Hersteller: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Verfahren: Autoradiographie

2.5.5 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Mit dieser Methode, auch „Bandshift-Assay“ genannt, wurde untersucht, wie sich SNPs der Promotorsequenz des *KCNA3*-Gens auf die spezifische DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren auswirken. Zu diesem Zweck wurden in einer anderen Studie durch perkutane Biopsie des Musculus vastus lateralis menschliche Skelettmuskelzellen gewonnen, kulturell vermehrt und differenziert (46). Kernlysate aus den Myotubenkernen und aus C2C12-Zellen der Maus wurden in nüchternem Zustand, nach zweistündiger Stimulation mit 20 nM Insulin, nach zweistündiger Stimulation mit 20 nM IGF-1 und nach zweistündiger Stimulation mit 20% fetalem Kalbserum (FCS) hergestellt (84). Synthetische, mit [α^{32} P]dATP (3000 Ci/mmol) und Klenow-Enzym radioaktiv

markierte Oligonukleotidsonden wurden im nächsten Schritt für 20 Minuten mit 8 µg Kernprotein inkubiert. Zum Nachweis der spezifischen Bindung wurden zusätzliche Proben mit einem Überschuss an nicht markierten Sonden (0.05 mg/ml poly[d(I-C)]) aufgetragen. Auf die Gelelektrophorese folgte die Auswertung anhand der autoradiographischen Analyse.

Verwendete Sonden:

- 5´- AGA GTA GGT CCT AGC CAA **CTT** ATA TTT CTA GC -3´
- 5´- AGA GTA GGT CCT AGC CAA **TTT** ATA TTT CTA GC -3´

Inkubationsmedium:

- 20 µl 7 mM HEPES- KOH (pH 7.9)
- 100 mM KCl
- 3.6 mM MgCl₂
- 10% Glycerol auf Eis

Trägergel:

- 5% nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel

Laufpuffer:

- 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 190 mM Glycin
- 1 mM EDTA

2.6 Berechnungen

2.6.1 Allgemein

- Body-Mass-Index (BMI):

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

- Waist-to-hip-ratio (WHR):

$$\text{WHR} = \frac{\text{Bauchumfang[cm]}}{\text{Hüftumfang[cm]}}$$

2.6.2 Orale Glukosetoleranztest (OGTT)

- Insulinsensitivität:

geschätzt nach dem von Matsuda et al. vorgeschlagenen Index ISI_{est} (54):

$$ISI_{\text{est}} = \frac{10000}{\sqrt{(BZ_{\text{basal}} \cdot Ins_{\text{basal}})(BZ_{\text{mean}} \cdot Ins_{\text{mean}})}}$$

BZ_{basal} = basaler Plasmaglukosespiegel [mmol/l]

Ins_{basal} = basale Plasmainsulinkonzentration [pmol/l]

BZ_{mean} = Mittelwert des Plasmaglukosespiegels über den gesamten Untersuchungszeitraum [mmol/l]

Ins_{mean} = Mittelwert der Plasmainsulinkonzentration über den gesamten Untersuchungszeitraum [pmol/l]

- Phase der Insulinsekretion:

geschätzt nach Stumvoll et al. (76):

$$1. \text{ Phase} = 1283 + 1.829 \times \text{Ins}_{30} - 138.7 \times \text{Gluk}_{30} + 3.772 \times \text{Ins}_0$$

- 2. Phase der Insulinsekretion:

geschätzt nach Stumvoll et al. (76):

$$2. \text{ Phase} = 287 + 0.4164 \times \text{Ins}_{30} - 26.07 \times \text{Gluk}_{30} + 0.9226 \times \text{Ins}_0$$

2.6.3 Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

- Insulinsensitivität:

Berechnet als Insulinsensitivitätsindex (ISI) für das Zeitintervall 60 bis 120 Minuten:

$$\text{ISI} = \frac{\text{mittlere Glukoseinfusionsrate (GIR) } [\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]}{\text{mittlere Plasmainsulinkonzentration } [\text{pmol/l}]}$$

2.6.4 Haplotyp-Analyse

Analysen zur genetischen Kopplung wurden mit dem THESIAS-Programm (Testing Haplotype Effects In Association Studies) durchgeführt (79). Von allen gefundenen Haplotypen wurde die Häufigkeit (Haplotypfrequenz) bestimmt. Haplotypen mit ausreichender Frequenz (> 5%) wurden im Folgenden in einem

additiven Modell auf potenzielle Effekte bezüglich BMI, Insulinsensitivität und Glukosetoleranz hin untersucht. Die Ergebnisse wurden als Vergleich zu den Ergebnissen des am häufigsten vorkommenden Haplotyp dargestellt.

2.7 Statistische Auswertung

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit dem Softwarepaket JMP (SAS Institute INC, CARY, NC, USA). Soweit nicht anders angegeben, sind die Resultate als Mittelwert (Mean) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aufgezeigt. Die Kenngrößen wurden mittels Shapiro-Wilk W-Test auf Normalverteilung untersucht und gegebenenfalls logarithmiert, um annähernd eine Normalverteilung zu erreichen. Statistische Vergleiche normalverteilter, stetiger Zielgrößen zwischen zwei Gruppen erfolgten mithilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben nach Student.

Um für wichtige Kovariaten zu adjustieren und unabhängige Zusammenhänge aufzudecken, wurden multiple Regressionsanalysen durchgeführt. Der Phänotyp wurde in diesem Zusammenhang als abhängige, der Genotyp als unabhängige / nominale Variable festgelegt.

Vergleiche zwischen zwei nominalen Parametern erfolgten anhand einer Vier-Felder-Tafel unter Nutzung des Chi-Quadrat-Tests (χ^2 -Test) bei Likelihood-Verhältnissen. Im Falle von niedrigen Allelfrequenzen wurden heterozygote und homozygote Träger zusammengefasst (dominantes Modell). Ansonsten wurden rezessive, dominante und additive Modelle berücksichtigt.

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

3 Ergebnisse

3.1 Genetische Varianten im *KCNA3*-Gen

Der Transkriptionsstart des *KCNA3*-Gens ist noch nicht bekannt, weswegen im Weiteren der Promotor / 5'-UTR-Bereich als Promotor bezeichnet wird und die Polymorphismen gemäß ihrer Entfernung in Basenpaare vom Startcodon ATG angegeben werden.

In der SNP-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Informations, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) wird von insgesamt 15 Polymorphismen im menschlichen *KCNA3*-Gen berichtet. Zwei davon befinden sich im Exon sechs in der Promotorregion und sieben im oder nahe dem 3'-UTR-Bereich. Drei der Polymorphismen in der 3'-UTR-Region liegen jenseits des Poly-A-Signals und wurden in der Studie nicht analysiert.

Im Falle der 50 Individuen, bei denen die gesamte kodierende Region, der 3'-UTR-Bereich und der Promotor vollständig sequenziert wurden, identifizierten wir fünf Polymorphismen. Diese befanden sich alle in der Promotorregion. Die übrigen sieben SNPs, die laut der NCBI-Datenbank im menschlichen *KCNA3*-Gen auftreten, konnten bei diesen Probanden nicht festgestellt werden, was auf die Seltenheit dieser Allele schließen lässt (Allelfrequenz <5%). In der NCBI-Datenbank war in einigen Fällen dieser Polymorphismen eine Allelfrequenz von etwa 1% vermerkt. Meistens fand sich jedoch keine Angabe, da die Polymorphismen in kleinen Stichproben gefunden wurden, aus denen eine zuverlässige Angabe nicht möglich ist.

Die bei den 50 Teilnehmern detektierten fünf SNPs der Promotorregion wurden sodann in einer Kohorte von 552 Probanden ermittelt. Dabei handelte es sich um die folgenden Polymorphismen:

ERGEBNISSE

- T-548C (rs2840381, Frequenz des seltenen Allels = 26%)
- G-697T (rs2821555, 23%)
- A-845G (rs7528937, 9%)
- T-1645C (rs2821557, 41%)
- G-2069A (rs3762379, 16%)

Nach Genotypisierung fand sich eine Verteilung der verschiedenen Polymorphismen gemäß dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Alle Polymorphismen standen zueinander in Linkage Disequilibrium ($D' \geq 0.51$, $p \leq 0.002$).

Die Ermittlung des Genotyps schlug in zwei Fällen an der Position -845, in einem Fall an der Position -2069 und in 25 Fällen an den Positionen -548 und -697 fehl. Die entsprechenden Probanden wurden bei nachfolgenden Analysen, die diese Polymorphismen mit einschlossen, und bei der Haplotyp-Analyse ausgeschlossen.

3.2 Geneffekte

Die Tabellen 5.1 und 5.2 zeigen die wesentlichen Effekte der fünf Polymorphismen (s. Teil 5 Tabellen).

3.2.1 Adipositasparameter

Weder beim Body-Mass-Index, noch bei dem prozentualen Körperfett oder der Waist-to-hip-ratio bestanden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypgruppen (s. Abbildung 3.1 und Tabelle 5.1 und 5.2).

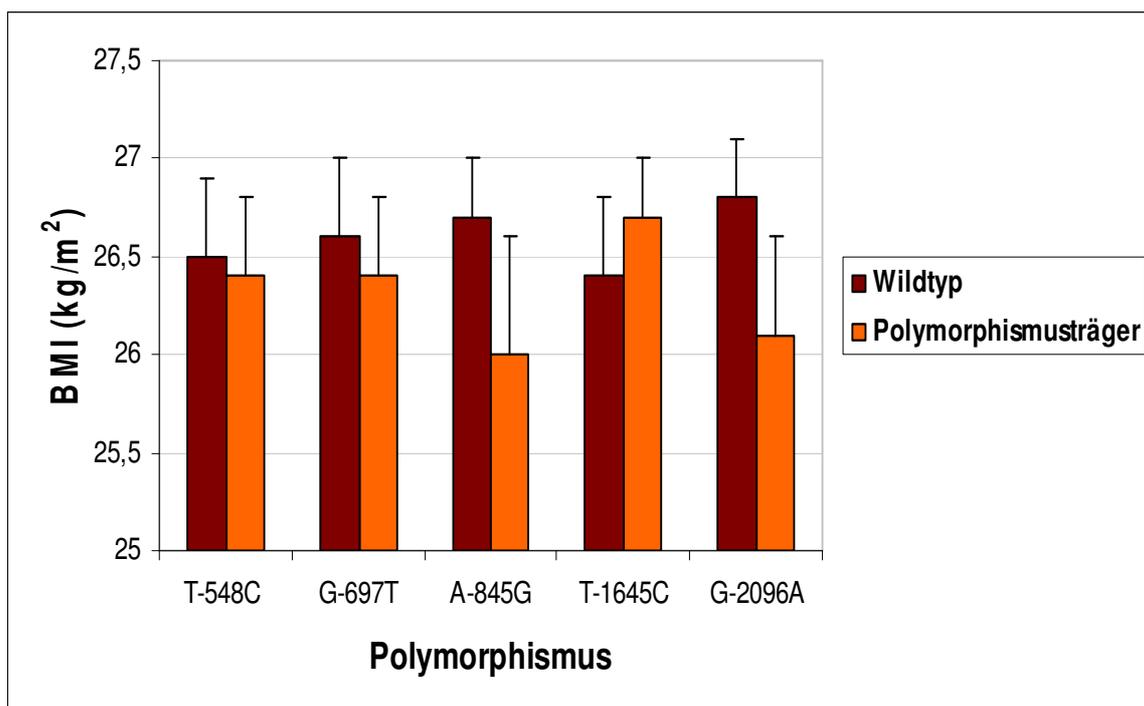


Abbildung 3.1: BMI (Means ± SEM)

3.2.2 Plasmaglukose, Plasmainsulin und freie Fettsäuren im Plasma

Plasmaglukose

Die Polymorphismen G-697T, A-845G und G-2069A zeigten keinen Effekt auf die Blutzuckerwerte, weder basal noch nach 2 Stunden im OGTT (s. Tabelle 5.1).

Träger eines C-Allels an der Position -548 wiesen leicht niedrigere basale Konzentrationen an Plasmaglukose im OGTT im Vergleich zum Wildtyp auf ($p < 0.05$, s. Tabelle 5.1). Allerdings verfehlte dieser Zusammenhang nach Adjustierung für den Altersunterschied zwischen den Genotypgruppen die Signifikanz ($p = 0.08$).

Im Gegensatz dazu fanden sich im oralen Glukosetoleranztest bei CC-Genotypen an der Position -1645 erhöhte Blutzuckerwerte nach 120 min ($p = 0.008$; s. Abbildung 3.2 und Tabelle 5.2).

Erhöhte Konzentrationen an Plasmaglukose nach 2 Stunden erwiesen sich auch bei der Clamp-Untergruppe (Wildtyp TT, 5.55 ± 0.17 ; heterozygote Träger des Polymorphismus TC, 5.46 ± 0.11 ; homozygote Träger des C-Allels CC, 6.27 ± 0.22 ; p (ANOVA) = 0.003, p (TX vs. CC) = 0.0007).

Darüber hinaus war dieser signifikante Zusammenhang bei der multiplen Regressionsanalyse unabhängig von Geschlecht, BMI und Alter ($p = 0.002$).

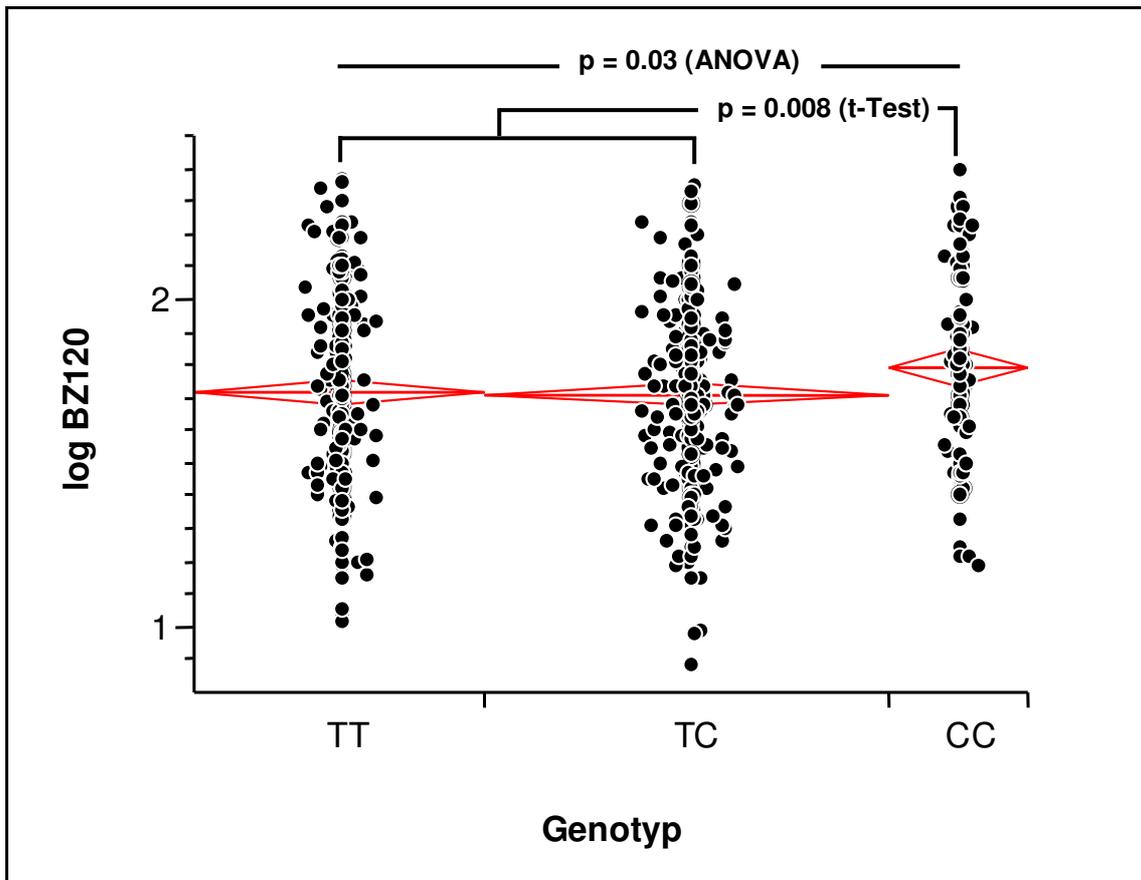


Abbildung 3.2: Plasmaglukose 120 min (OGTT), einzelne Werte der Probanden mit T-1645C-Polymorphismus (Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall sind in Form der Raute wiedergegeben)

Plasmainsulin

Als einziger der fünf Polymorphismen zeigte der A-845G-Polymorphismus eine Assoziation mit erniedrigten Insulinwerten nach 120 min im OGTT (s. Tabelle 5.1). Dieser Zusammenhang war auch nach Durchführung einer multiplen Regressionsanalyse mit den Kovariaten Alter, Geschlecht und BMI signifikant ($p = 0.02$).

Freie Fettsäuren im Plasma

Hinsichtlich der freien Fettsäuren waren weder basal noch nach 2 Stunden im OGTT Unterschiede zwischen den Genotypgruppen zu beobachten (s. Tabelle 5.1 und 5.2).

3.2.3 Insulinsensitivität

Die Insulinsensitivität (berechnet als Insulinsensitivitätsindex ISI aus den Daten des euglykämischen hyperinsulinämischen Clamps) zeigte erniedrigte Werte bei homozygoten T-1645C-Polymorphismus-Trägern im Vergleich zu Probanden mit dem Genotyp TX ($p = 0.01$ nach Anpassung an die Kovariaten Geschlecht, BMI und Alter; s. Abbildung 3.3 und Tabelle 5.2).

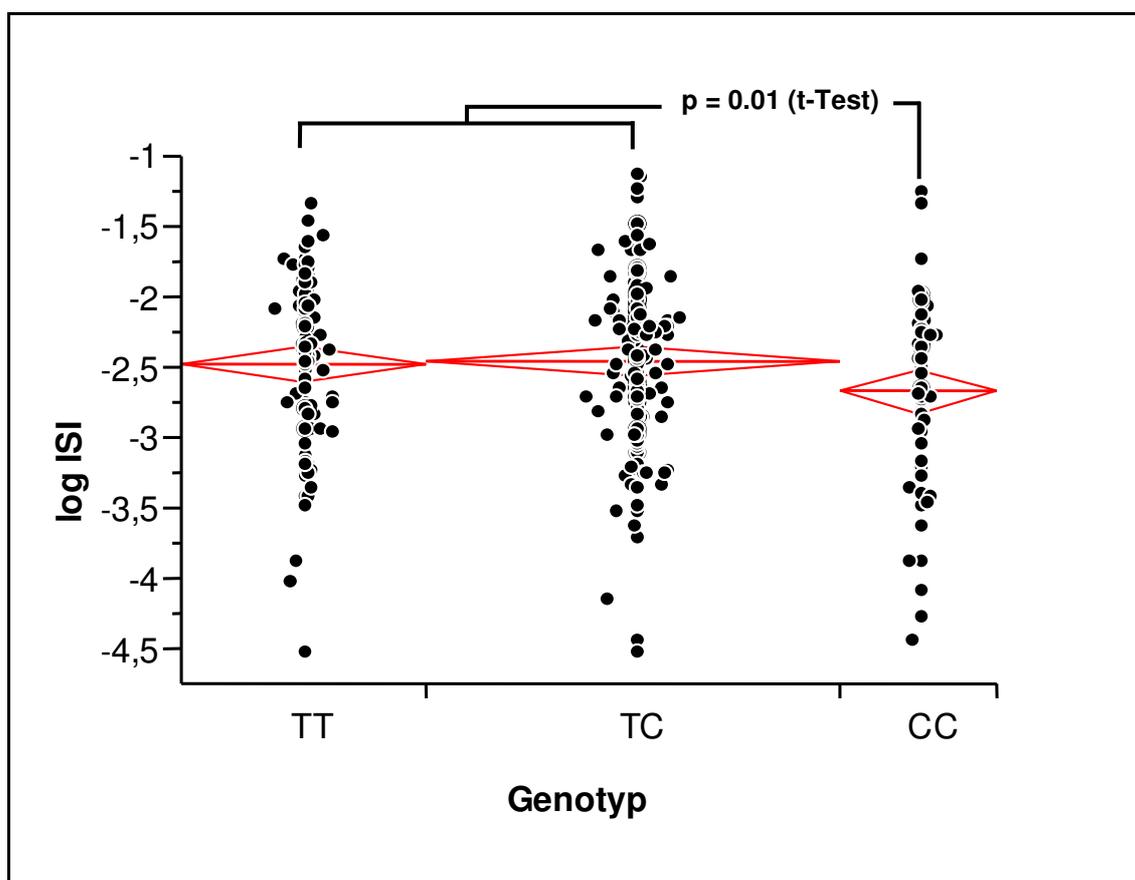
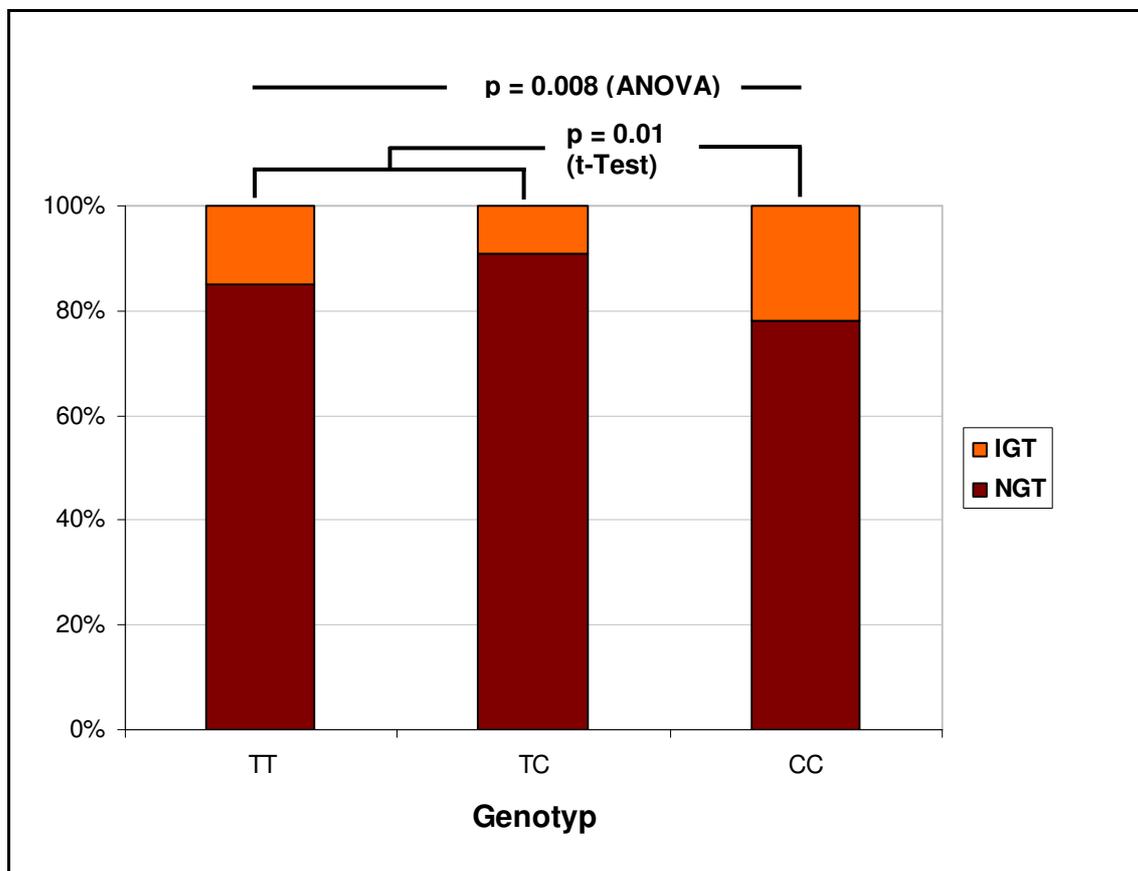


Abbildung 3.3: Insulinsensitivität (Clamp), einzelne Werte der Probanden mit dem Polymorphismus T-1645C (Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall sind in Form der Raute wiedergegeben)

Bei Betrachtung der übrigen vier SNPs ergaben sich keine Differenzen zwischen Wildtypen und Polymorphismusträgern (s. Tabelle 5.1).

3.2.4 Glukosetoleranz

Während die Polymorphismen an den Positionen -548, -697, -845 und -2069 keinen Einfluss auf die Glukosetoleranz hatten (s. Tabelle 5.1), fanden wir in der Gruppe der homozygoten C-Allel-Träger an Position -1645 signifikant mehr Probanden mit eingeschränkter Glukosetoleranz (Plasmaglukose nach 120 min im OGTT zwischen 7.8 und 11.1 mmol/l; $p = 0.01$; s. Abbildung 3.4 und Tabelle 5.2).



NGT = normale Glukosetoleranz
 IGT = eingeschränkte Glukosetoleranz

Abbildung 3.4: Glukosetoleranz (OGTT)

3.2.5 Insulinsekretion

Keiner der fünf Polymorphismen ließ einen Zusammenhang mit der Insulinsekretion erkennen. Weder bei der 1. noch bei der 2. Phase der Insulinsekretion, die aus dem OGTT nach Stumvoll et al. geschätzt wurden, ergab sich eine Differenz zwischen den einzelnen Genotypgruppen (s. Tabelle 5.1 und 5.2).

3.3 Haplotyp-Analyse

Von insgesamt 32 mathematisch möglichen Haplotypen detektierten wir 14 in unserer Studienpopulation. Nur vier der ausgemachten Haplotypen (TGATG, CTACG, TGACA und TGGTG) hatten eine Frequenz von über 5% (s. Tabelle 5.3).

Der häufigste Haplotyp (TGATG) wurde als Referenzwert für unsere Analysen herangezogen und beinhaltete 83% der T-Allele an der Position -1645. Die Mehrheit der C-Allele (95%) an der Position -1645 war in den zweit- und dritthäufigsten Haplotyp aufgespalten. Der Haplotyp CTACG mit einer Frequenz von 0.229 schloss 57% ein, der Haplotyp TGACA mit einer Frequenz von 0.115 38%.

Keiner der Haplotypen mit einer Häufigkeit von über 5% wies einen signifikanten Zusammenhang mit BMI, Insulinsensitivität oder Glukosetoleranz auf (s. Tabelle 5.3).

3.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der EMSA wurde durchgeführt, um die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an veränderten DNA-Sequenzen durch den T-1645C-

Polymorphismus zu beurteilen.

Interessanterweise enthält der Wildtyp-Promotor des *KCNA3*-Gens eine CCAAT-Box an der Position -1645. Im mutierten Promotor wird die CCAAT-Box durch Austausch des T-Allels durch ein C-Allel zu CCAAC. Um die vermeintliche funktionelle Relevanz des Verlustes der CCAAT-Box zu evaluieren, untersuchten wir, ob das C-Allel an der Position -1645 die Bindung von nukleären Transkriptionsfaktoren an diese Promotorregion beeinträchtigt.

Die EMSAs wurden mit nukleären Extrakten, sowohl aus C2C12-Zellen der Maus, als auch aus menschlichen Myotuben, und mit den komplementären Oligonukleotidsonden durchgeführt. Die Sonden enthielten entweder ein T oder ein C an der Position -1645 (5'-AGAGTAGGTCCTAGCCAAT / CTTATATTTCTAGC-3'). Die Kernextrakte beider Zelltypen wurden zum einen aus nüchternen Zellen gewonnen, zum anderen aus Zellen nach Stimulation mit Insulin, IGF-1 oder fetalem Kalbserum.

Der EMSA zeigte eine spezifische Bindung der nukleären Proteine an die Oligonukleotidsonde mit dem C-Allel (s. Abbildung 3.5, Spuren 1 und 4), die beim T-Allel nicht auftrat. Diese Bindung war spezifisch, da sie sich durch einen 30fachen molaren Überschuss an unmarkierten ("kalten") C-Sonden hemmen ließ (Spur 2), nicht jedoch durch einen 30fachen molaren Überschuss an unmarkierten T-Sonden (Spur 3).

Das Resultat suggeriert ein qualitativ unterschiedliches Bindungsverhalten der Transkriptionsfaktoren an diese Promotorsequenz. Die spezifische Bindung war bei beiden Zelltypen sowohl nach Stimulation mit Insulin als auch mit fetalem Kalbserum reproduzierbar.

Die Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Gel mit Kernproteinen aus C2C12-Zellen. Mit Kernextrakten aus menschlichen Myotuben wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wenn auch weniger ausgeprägt.

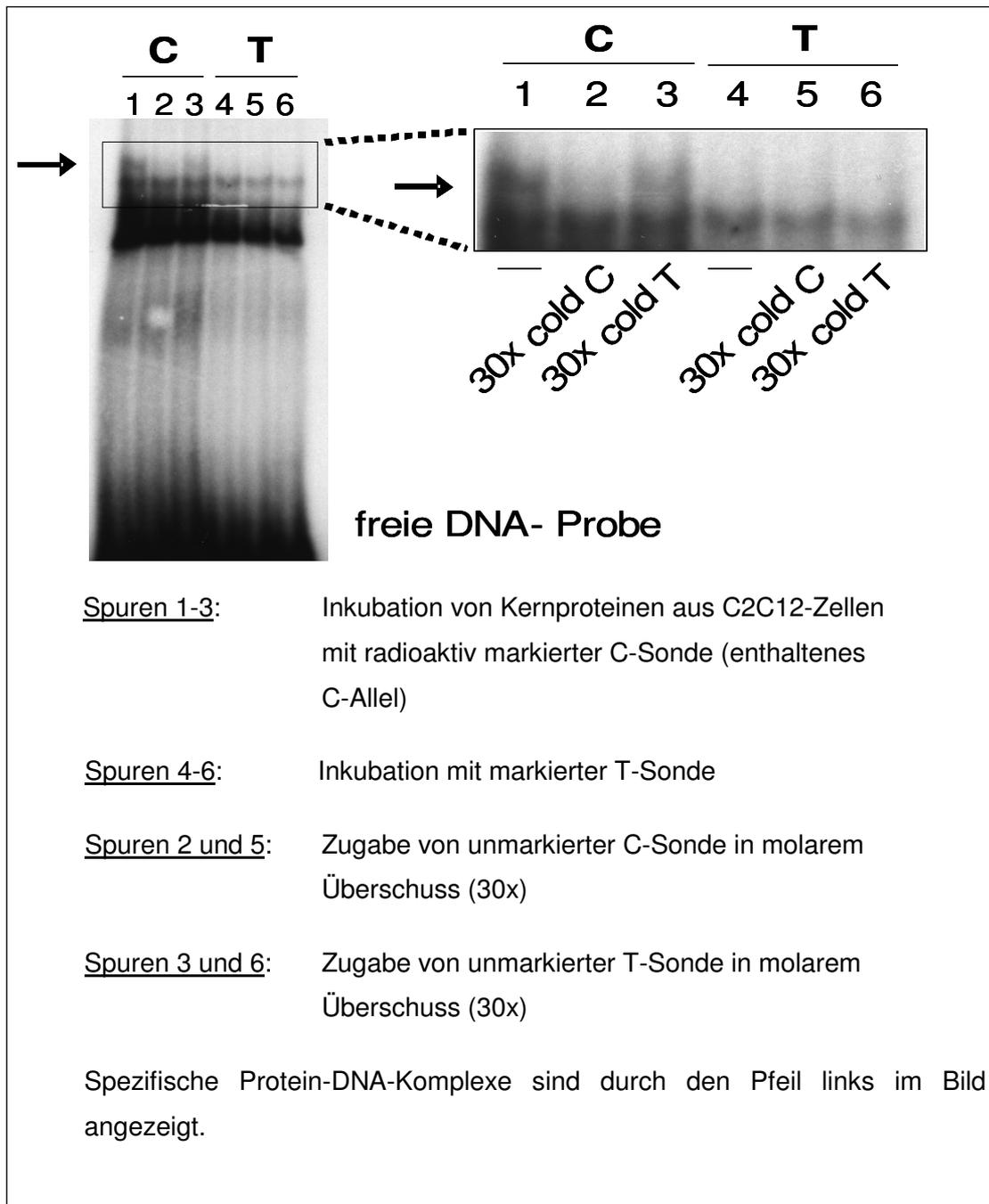


Abbildung 3.5: EMSA

4 Diskussion

4.1 Eigene Ergebnisse

Bei der Suche nach genetischen Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2 hat sich das menschliche *KCNA3*-Gen als mögliches Kandidatengen herausgestellt.

In der Promotorregion dieses Gens identifizierten wir in einer Subgruppe von 50 Probanden fünf Polymorphismen (T-548C, G-697T, A-845G, T-1645C und G-2069A), deren Auswirkungen auf anthropometrische Daten, Glukosetoleranz, Insulinsensitivität und Insulinsekretion in einer Kohorte von 552 Teilnehmern untersucht wurden.

Keiner der fünf Polymorphismen ließ eine Verbindung zu einer gestörten Insulinsekretion erkennen. Dieses Resultat wird von der Tatsache bestätigt, dass eine Expression des *KCNA3*-Gens in menschlichen Betazellen der Bauchspeicheldrüse nicht gefunden wurde (90). Somit scheint das *KCNA3*-Gen keine funktionell relevante Rolle bei der Insulinsekretion zu spielen.

Auch in Bezug auf anthropometrische Daten zeigte keiner der fünf Polymorphismen signifikante Unterschiede.

Die Polymorphismen G-697T und G-2069A wiesen keinerlei Assoziation mit metabolischen Parametern auf, welche für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle spielen. In univariaten Analysen war der T-548C-Polymorphismus von reduzierten Nüchtern glukosewerten begleitet, was allerdings nach Adjustierung für den beobachteten Altersunterschied nicht mehr signifikant war. Der Polymorphismus an der Position -845 ging mit erniedrigten Insulinwerten nach oraler Glukosebelastung einher. Dieser Zusammenhang schlug sich jedoch nicht in den Zielparametern Insulinsensitivität und Glukosetoleranz nieder.

Diese vier Polymorphismen (T-548C, G-697T, A-845G und G-2069A) scheinen den Ergebnissen zufolge keine Auswirkungen auf ein erhöhtes Diabetesrisiko zu haben.

Der T-1645C-Polymorphismus (rs2821557) war mit reduzierter Insulinsensitivität und gestörter Glukosetoleranz assoziiert und scheint somit Einfluss auf den Diabetes mellitus Typ 2 und den damit verbundenen metabolischen Störungen zu haben. Dieser Effekt trat nur bei homozygoten Trägern des C-Allels an dieser Position auf und war nicht einem bestimmten Haplotyp zuzuschreiben. Dies spricht dafür, dass die oben genannten Effekte auf den Polymorphismus selbst und nicht auf einen Haplotyp (Kombination von Polymorphismen) zurückzuführen sind. Dieser fehlende Haplotypeffekt könnte jedoch auch der reduzierten statistischen Leistung zugeschrieben werden, denn die C-Allel-Träger verteilten sich auf mehrere Haplotypen.

Um den Nachweis zu erbringen, dass der T-1645C-Polymorphismus (rs2821557) zu einer veränderten transkriptionellen Aktivität führt, wurde der funktionelle Effekt der Allele T und C untersucht. Der Promotor des Wildtyps (T-Allel) enthält eine CCAAT-Box an der Position -1645, welche im mutierten (C-Allel) Promotor verloren geht und zu CCAAC umgeformt wird.

Die CCAAT-Box ist eine weit verbreitete Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren wie C/EBPs (CCAAT/enhancer binding protein), CUTL1 (cut-like 1) und den nukleären Faktor Y. Der Ausfall der CCAAT-Box könnte zu einer eingeschränkten Affinität oder sogar zu einem Verlust der Bindungsmöglichkeit solcher Transkriptionsfaktoren führen. Andererseits könnten dadurch an dieser Stelle auch neue Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren entstehen.

Der EMSA ließ ein spezifisches Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren am synthetisierten Oligonukleotid mit C-Allel erkennen, dies legt nahe, dass der Polymorphismus an dieser Stelle die Transkription des *KCNA3*-Gens und infolgedessen die Funktion des Kv1.3-Kanals beeinflusst.

Weitere Informationen über die Funktionalität des Promotorpolymorphismus könnten mithilfe eines Supershift-Assay erzielt werden. Dabei kann durch die

Zugabe von spezifischen Antikörpern die Identität des DNA-bindenden Proteins festgestellt und folglich die Art der Auswirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren ausgemacht werden. Diesen Sachverhalt zu untersuchen bedarf es weiterer Studien.

4.2 Kv1.3 in der Literatur

4.2.1 Kv1.3 und Insulinsensitivität

Mäuse, bei denen das *KCNA3*-Gen inaktiviert wurde, haben ein signifikant niedrigeres Körpergewicht als Kontrollmäuse. Dieser Zusammenhang wurde in einer Studie zur Untersuchung der physiologischen Rolle des Kv1.3-Kanals *in vivo* nachgewiesen. Während einer hochkalorischen Diät zeigten die Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine geringere Gewichtszunahme bei im Normbereich bleibenden Blutzuckerwerten und relativ niedrigen Insulinspiegeln. Die Reduzierung des Körpergewichts konnte in erster Linie auf eine höhere basale Metabolisierungsrate und Muskelarbeit zurückgeführt werden und zeigt die Beteiligung des Kanals an der Regulierung der Energiehomöostase (82, 88).

Eine Folgestudie untersuchte die Auswirkungen des Kv1.3-Kanals auf die periphere Glukosehomöostase und Insulinsensitivität. Die beobachteten Knockout-Mäuse wiesen eine höhere periphere Insulinsensitivität und niedrigere Plasmaglukoespiegel auf. Auch bei pharmakologischer Blockade des Kv1.3-Kanals mit Margatoxin (ein selektiv blockierendes Skorpiongift) bzw. Kaliotoxin wurde eine gesteigerte Insulinsensitivität beobachtet (89).

Dies deutet die direkte Einbeziehung des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3 in akute Veränderungen der Insulinsensitivität an und zeigt, dass der Anstieg der Insulinsensitivität nicht nur eine Folge niedrigeren Körpergewichts und reduzierter Fettmenge ist.

Der exakte Mechanismus, durch den die Funktion des spannungsabhängigen Kaliumkanals den Glukosemetabolismus beeinflusst, ist noch nicht genau geklärt. Da der Kv1.3-Kanal eine Vielzahl von Expressionsgeweben wie die Leber, den Skelettmuskel, das Fettgewebe und das Gehirn (88, 89) aufweist, ist eine große Zahl möglicher direkter und indirekter Mechanismen denkbar.

Als Möglichkeiten für die verbesserte Insulinsensitivität kommen eine herabgesetzte Glukoseproduktion in der Leber oder eine verstärkte Glukoseaufnahme in Skelettmuskel und Fettgewebe in Frage. Jianchao Xu et al. zeigten, dass die erhöhte Insulinsensitivität größtenteils durch die stimulierte Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel und in das Fettgewebe erklärt werden kann (89).

4.2.2 Kv1.3 und Glukosetransport

Die Aufnahme von Glukose in die Zelle geschieht über das Glukosetransportsystem. Die Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 sind für die Zuckeraufnahme in Muskel und Fett von besonderer Bedeutung. Ein Anstieg des Glukosetransports kann zum einen durch Aktivierung schon in der Plasmamembran verweilender Carrier geschehen, zum anderen durch Translokation der Transportmoleküle aus intrazellulären Speichern zur Zellmembran (57).

Sowohl die Kv1.3-Defizienz als auch die Blockade des Kanals durch Margatoxin führen zu einer gesteigerten Translokationsrate von GLUT-4 und zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in das Fett- und Muskelgewebe (89).

Es fand sich eine insulinabhängige Inaktivierung des Kv1.3-Kanals durch Phosphorylierung von Tyrosinresten, was sich in einer reduzierten Leitfähigkeit des Kanals niederschlägt (8, 18, 19, 21). Bedingt durch den verminderten Kaliumausstrom aus der Zelle erfolgt eine Depolarisation der Zellmembran, das wiederum zur Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern führt. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration an Kalzium ließ in zellphysiologischen

Untersuchungen einen Zusammenhang mit einer erhöhten Translokation von GLUT-4 zur Plasmamembran erkennen, wobei der exakte Mechanismus, dem dieser Vorgang unterliegt, noch nicht bekannt ist (47).

Als funktionell relevanter Promotorpolymorphismus könnte T-1645C (rs2821557) durch eine Überexpression an Kv1.3-Kanälen eine Zunahme der aktiven Kanäle in der Zellmembran verursachen und damit die Translokation von GLUT-4 beeinträchtigen. Unter der Annahme einer gain-of-function-Mutation würde dies dann zu einer Herabsetzung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme und zu einer eingeschränkten Insulinsensitivität führen.

4.2.3 Kv1.3 und inflammatorische Zytokine

Frühere Studien beweisen, dass Adipozyten eine Reihe von Molekülen sezernieren, unter anderem Leptin, Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) und Resistin (58, 67). Die Hemmung des Kv1.3-Kanals in T-Lymphozyten bewirkt eine verminderte Synthese von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und Interleukin 2 (6, 23, 50, 52). Durch pharmakologische Blockade des Kanals konnte dieser Bezug für TNF- α und IL-6 auch in Adipozyten von diabetischen Mäusen nachgewiesen werden (89).

TNF- α

Die TNF- α -Produktion ist wie im Tiermodell auch bei adipösen Menschen in positiver Korrelation zu BMI und Hyperglykämie deutlich erhöht (32, 33).

Viele Studien deuten darauf hin, dass TNF- α in Adipozyten von Menschen und Mäusen mit dem Signalweg des Insulins durch Blockade der Tyrosinkinase-Aktivität interferiert. Die Tyrosinkinase wird durch Serinphosphorylierung von Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) in ihrer Aktivität eingeschränkt (32, 37, 51, 63).

Eine bedeutsame Rolle hierbei könnte die JNK (c-Jun NH₂-terminale Kinase) spielen, die zu der Familie der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) zählt und durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α aktiviert wird (91). Die JNK ist bei Adipositas vermehrt wirksam und die Blockade des Kv1.3-Kanals mit Margatoxin führt zu einer herabgesetzten Aktivität der Kinase in Zellen von Mäusen (31, 89). Im Tiermodell vermittelt die JNK die Phosphorylierung des Serinrestes 307 von IRS-1 (Ser³⁰⁷, entspricht Ser³¹² beim Menschen), die an dieser Stelle das Zusammenspiel zwischen der PTB (Phosphotyrosinbindung)-Domäne und der katalytischen Einheit des Insulinrezeptors stört (1).

Allerdings zeigten nachfolgende Untersuchungen, dass die TNF- α -vermittelte Phosphorylierung von Ser³⁰⁷ nicht über eine Aktivierung der JNK geschieht. Welche anderen Kinasen bei diesem Vorgang die vermittelnde Rolle übernehmen ist noch nicht geklärt. Möglicherweise könnte die MEK1 (MAPK-/ERK-Kinase) eine Rolle spielen (68).

Anderen Ergebnissen zufolge führt TNF- α nicht wie zuvor beschrieben zu einer Modifikation der IR-Autophosphorylierung, sondern zu einer Hemmung des Insulinsignals auf Ebene der Phosphatidylinositol-3-Kinase (P-I3-K) (51). Häring und Mitarbeiter zeigten eine Regulierung auf Ebene der Phosphotyrosin-Phosphatase (45).

IL-6

IL-6 wird in vivo in großen Mengen vom Fettgewebe sezerniert. Produktion und systemische Konzentration steigen mit dem Grad der Adipositas an (58). Die Plasmakonzentrationen an IL-6 sind bei adipösen Menschen im Vergleich zur Kontrollgruppe um das zwei- bis dreifache erhöht und mit erhöhter Plasmaglukose, erniedrigter Glukosetoleranz und reduzierter Insulinsensitivität assoziiert (41, 65). Eine neuere prospektive Studie ergab, dass zirkulierendes IL-6 mit dem Risiko, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln korreliert, unabhängig vom Körperfettanteil (66).

Auf menschliche Adipozyten übt IL-6 langfristig eine Herabregulierung der Gentranskription von IRS-1, GLUT-4 und PPAR γ aus, wohingegen eine transiente Erhöhung an systemisch zirkulierendem IL-6 keinen Einfluss auf die Glukosehomöostase zu haben scheint (67, 74). Folge der verminderten Gentranskription ist eine gestörte Vermittlung des Insulinsignals durch die reduzierte Proteinexpression von IRS-1 und die dadurch resultierende beeinträchtigte Tyrosinphosphorylierung von IRS-1. Vereinbar mit der verminderten Produktion an GLUT-4-mRNA ergibt sich eine verringerte Glukoseaufnahme in die Zelle. Senn et al., die die Rolle von IL-6 auf Hepatozyten untersuchten, kamen zu dem Ergebnis, dass IL-6 mit dem Insulinsignalweg sowohl proximal als auch distal interferiert und zudem die insulininduzierte Glykogensynthese hemmt. In einer folgenden Studie wurde als möglicher Vermittler der IL-6-Wirkung die Familie der suppressors of cytokine signaling (SOCS) identifiziert (70, 71).

Alternativ zu einem direkten Effekt an Skelettmuskulatur und Fettgewebe wäre auch denkbar, dass die Blockade des Kv1.3-Kanals durch die verminderte Produktion an TNF- α und IL-6 durch Adipozyten zu einer verbesserten Insulinsensitivität führt.

Entsprechend der Funktion des Kv1.3-Kanals, das Ruhemembranpotenzial aufrechtzuerhalten, wäre es vorstellbar, dass die Zytokinsynthese und -sekretion mittels veränderter intrazellulärer Kalziumkonzentration gelenkt wird. Die Abnahme der Sekretion von IL-6 und TNF- α könnte für die herabgesetzte Aktivität der JNK verantwortlich sein. Andererseits könnte auch die Kalziummenge in der Zelle durch noch nicht bekannte Mechanismen auf die Aktivität der Kinase Einfluss haben.

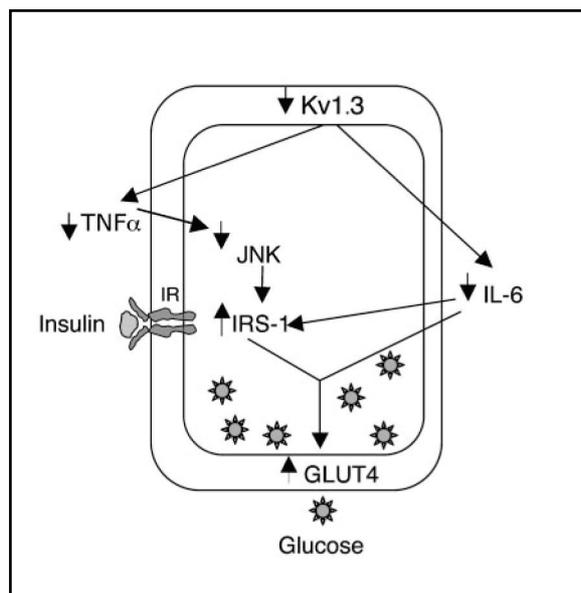


Abbildung 4.1: Zelluläre Mechanismen der erhöhten Glukoseaufnahme bei Blockade des Kv1.3-Kanals (die Pfeile zeigen Zunahme und Abnahme der Aktivität an) (modifiziert nach (89)).

4.2.4 Effekte auf das Riechsystem

Zusätzlich zu den metabolischen Konsequenzen der gestörten Funktion des Kv1.3-Kanals fand sich bei Knockout-Mäusen ein „super-smeller“-Phänotyp. Dieser ist charakterisiert durch eine signifikant herabgesetzte Schwelle für die Wahrnehmung von Gerüchen und durch eine vermehrte Fähigkeit ähnliche Gerüche zu diskriminieren (20). Eine jüngste Studie untersuchte die Auswirkungen des T-1645C-Polymorphismus (rs2821557) im *KCNA3*-Gen auf den Geruchssinn bei gesunden Probanden (25). Dabei konnte festgestellt werden, dass Träger des Polymorphismus eine eingeschränkte Riechfunktion aufweisen und diese von minimalen Änderungen der Glukosekonzentration abhängig zu sein scheint.

Fadool et al. beschrieben in Neuronen des Bulbus olfactorius eine insulin-abhängige Phosphorylierung von Tyrosinresten des Kv1.3-Kanals mit daraus

resultierender Inaktivierung der Kanalfunktion (21). Weiterhin zeigte eine Verstärkung des Insulinsignals im Gehirn eine Assoziation mit peripherer Insulinresistenz, beeinträchtigtem Glukosemetabolismus und Adipositas (10, 81). Diese Daten lassen einen Zusammenhang zwischen den Auswirkungen des Kv1.3-Kanals auf Gewicht und Glukosemetabolismus und der Insulinwirkung im ZNS vermuten.

Eine gain-of-function-Mutation im *KCNA3*-Gen könnte für die herabgesetzte Riechfunktion verantwortlich sein. Derartige Effekte wären in der Lage, das Essverhalten und die Energiehomöostase zu beeinflussen. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um festzustellen, inwiefern genetische Veränderungen im *KCNA3*-Gen mit den Effekten auf das olfaktorische System und die Glukosehomöostase assoziiert sind.

Daten zu den Auswirkungen auf den Geruchsinn sind in unserer Studienpopulation nicht verfügbar. Da keiner der Polymorphismen in unserer Studie einen Effekt auf das Gewicht und den BMI verzeichnete, erscheint ein direkter Zusammenhang der Wirkungen des Kanals in diesen Organsystemen (Skelettmuskulatur, Geruchsinn, Gewichtsregulation) eher unwahrscheinlich.

4.3 Schlussfolgerung

Entsprechend den Daten im Tierversuch lassen die Ergebnisse dieser Untersuchung einen Zusammenhang zwischen dem T-1645C-Polymorphismus (rs2821557) in der Promotorregion des *KCNA3*-Gens mit erniedrigter Insulinsensitivität und gestörter Glukosetoleranz erkennen. Dies legt eine Assoziation genetischer Varianten im *KCNA3*-Gen mit Diabetes mellitus Typ 2 nahe.

Es wäre denkbar, dass eine gain-of-function-Mutation über eine erhöhte Aktivität des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3 zu derartigen Ver-

DISKUSSION

änderungen im Glukosemetabolismus führt. Die genauen Mechanismen sind bislang allerdings unklar. Der Kv1.3-Kanal scheint sowohl über Auswirkungen auf den Glukosetransport in insulin-sensitive Zellen als auch über Veränderungen der Zytokinsynthese und -sekretion und Modifikationen des Geruchssinnes einen Einfluss auf die Glukosehomöostase zu haben.

Das menschliche *KCNA3*-Gen stellt demzufolge ein potenzielles Kandidatengen bei der Suche nach genetischen Ursachen des Typ-2-Diabetes dar, und es bedarf weiteren Untersuchungen, die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären.

Position (von ATG)	- 548	- 697	- 845	- 2069				
Genotyp (n)	TT (286)	XC (240)	GG (303)	XT (223)	AA (455)	XG (95)	GG (385)	XA (166)
NGT / IGT n / n (% / %)*	241 / 45 (16% / 84%)	216 / 24 (10% / 90%)	256 / 47 (16% / 84%)	201 / 22 (10% / 90%)	393 / 62 (86% / 14%)	83 / 12 (87% / 13%)	340 / 45 (88% / 12%)	138 / 28 (83% / 17%)
Geschlecht (w/m)	168 / 118	140 / 100	179 / 124	129 / 94	266 / 189	54 / 41	220 / 165	100 / 66
BMI (kg/m ²)	26.5 ± 0.4	26.4 ± 0.4	26.6 ± 0.4	26.4 ± 0.4	26.7 ± 0.3	26.0 ± 0.6	26.8 ± 0.3	26.1 ± 0.5
Körperfett (%)	28.3 ± 0.6	26.8 ± 0.6	28.4 ± 0.6	26.6 ± 0.6	27.9 ± 0.5	26.3 ± 1.0	27.6 ± 0.5	27.7 ± 0.8
Alter (Jahre)	38.2 ± 0.8	36.0 ± 0.8 §	37.8 ± 0.7	36.5 ± 0.8	37.1 ± 0.6	37.1 ± 1.3	37.5 ± 0.6	36.4 ± 1.0
WHR	0.86 ± 0.005	0.85 ± 0.006	0.86 ± 0.005	0.86 ± 0.006	0.86 ± 0.004	0.86 ± 0.010	0.86 ± 0.004	0.85 ± 0.006
Plasmaglukose nüchtern (mM, OGTT)	5.01 ± 0.03	4.89 ± 0.03 §	4.99 ± 0.03	4.90 ± 0.04	4.97 ± 0.03	4.89 ± 0.05	4.93 ± 0.06	4.95 ± 0.04
Plasmaglukose 120 min (mM, OGTT)	5.84 ± 0.10	5.81 ± 0.09	5.82 ± 0.10	5.82 ± 0.10	5.87 ± 0.07	5.70 ± 0.18	5.84 ± 0.08	5.82 ± 0.14
Plasmainsulin nüchtern (pM, OGTT)	55 ± 3	50 ± 2	55 ± 3	49 ± 2	53 ± 2	54 ± 6	53 ± 2	54 ± 4
Plasmainsulin 120 min (pM, OGTT)	347 ± 20	320 ± 19	351 ± 20	312 ± 18	348 ± 15	268 ± 24 §	335 ± 16	326 ± 22

Tabelle 5.1: Polymorphismen ohne relevanten metabolischen Effekt (Fortsetzung nächste Seite)

Position (von ATG)	- 548	- 697	- 845	- 2069				
Genotyp (n)	TT (286)	XC (240)	GG (303)	XT (223)	AA (455)	XG (95)	GG (385)	XA (166)
Freie Fettsäuren im Plasma (μM , OGTT)**	507 \pm 14	529 \pm 16	510 \pm 13	527 \pm 17	516 \pm 11	528 \pm 25	520 \pm 12	511 \pm 19
ISI ($\mu\text{M} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{pM}^{-1}$, Clamp)***	0.102 \pm 0.005	0.093 \pm 0.004	0.100 \pm 0.005	0.095 \pm 0.005	0.096 \pm 0.004	0.104 \pm 0.007	0.097 \pm 0.004	0.099 \pm 0.006
1. Phase (pM, OGTT)	1105 \pm 36	1104 \pm 40	1120 \pm 35	1083 \pm 42	1130 \pm 31	1017 \pm 51	1099 \pm 32	1134 \pm 49
2. Phase (pM, OGTT)	294 \pm 8	293 \pm 9	297 \pm 8	289 \pm 10	300 \pm 7	274 \pm 12	293 \pm 7	301 \pm 11

Means \pm SEM,

NGT = normale Glukosetoleranz / IGT = eingeschränkte Glukosetoleranz,

WHR = Waist-to-hip-ratio,

ISI = Insulinsensitivitätsindex,

1./2. Phase = 1./2. Phase der Insulinsekretion,

* Chiquadrat-Test, ** N = 514, *** N = 304,

§ p < 0.05.

Fortsetzung Tabelle 5.1: Polymorphismen ohne relevanten metabolischen Effekt

Position (von ATG)		- 1645		p (ANOVA)		p (TX vs. CC)	
Genotyp (n)	TT (193)	TC (268)	CC (91)				
NGT / IGT n / n (% / %)	164 / 29 (85% / 15%)	243 / 25 (92% / 9%)	71 / 20 (78% / 22%)				0.010*
Geschlecht (w/m)	109 / 84	159 / 109	52 / 39				1.00
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 0.4	26.7 ± 0.4	26.9 ± 0.7				0.74
Körperfett (%)	27.8 ± 0.8	27.5 ± 0.6	27.6 ± 1.1				0.98
Alter (Jahre)	38.2 ± 0.9	36.8 ± 0.8	36.4 ± 1.4				0.33
WHR (Waist-to-hip-ratio)	0.86 ± 0.006	0.86 ± 0.005	0.86 ± 0.010				0.66
Plasmaglukose nüchtern (mM, OGTT)	5.00 ± 0.04	4.94 ± 0.04	4.94 ± 0.05				0.74
Plasmaglukose 120 min (mM, OGTT)	5.81 ± 0.12	5.72 ± 0.09	6.26 ± 0.18				0.008
Plasmainsulin nüchtern (pM, OGTT)	54 ± 3	52 ± 3	53 ± 3				0.30
Plasmainsulin 120 min (pM, OGTT)	351 ± 26	309 ± 16	367 ± 33				0.120
Freie Fettsäuren im Plasma (µM, OGTT)**	505 ± 17	522 ± 15	526 ± 27				0.59
Freie Fettsäuren im Plasma 120 min (µM, OGTT)**	73 ± 4	73 ± 5	73 ± 5				0.49
ISI (µM x kg ⁻¹ x min ⁻¹ x pM ⁻¹ , Clamp)***	0.099 ± 0.005	0.102 ± 0.005	0.084 ± 0.007				0.017
1. Phase der Insulinsekretion (pM, OGTT)	1089 ± 42	1108 ± 41	1155 ± 64				0.22
2. Phase der Insulinsekretion (pM, OGTT)	291 ± 10	294 ± 9	306 ± 15				0.24

Means ± SEM.

TT = Wildtyp-Individuen, TC = heterozygote Träger des Polymorphismus, CC = homozygote Träger des Polymorphismus,

NGT = normale Glukosetoleranz / IGT = eingeschränkte Glukosetoleranz,

ISI = Insulinsensitivitätsindex,

* Chiquadrat-Test, ** N = 514, *** N = 304 (92 TT, 153 TC, 59 CC).

Tabelle 5.2: Metabolische Effekte des T-1645C-Polymorphismus (rs2821557)

Haplotyp	Frequenz	Effekt	BMI (kg/m ²)*	p	ISI**	p	Glukose 120 min ***	p
TGATG	0.498	Referenz	13.10 ± 0.21		0.024 ± 0.003		2.62 ± 0.06	
CTACG	0.229	Differenz	0.02 ± 0.49	0.59	-0.006 ± 0.007	0.08	0.14 ± 0.14	0.40
TGACA	0.155	Differenz	-0.25 ± 0.54	0.23	0.006 ± 0.008	0.97	0.14 ± 0.13	0.65
TGGTG	0.076	Differenz	-0.71 ± 0.77	0.79	0.006 ± 0.011	0.07	0.11 ± 0.17	0.63
CGGTG	0.011	nicht ausgewertet						
CGACG	0.007	nicht ausgewertet						
TGACG	0.006	nicht ausgewertet						
CGATG	0.006	nicht ausgewertet						
TGGCA	0.004	nicht ausgewertet						
TTACG	0.003	nicht ausgewertet						
TGATA	0.002	nicht ausgewertet						
CGACA	0.001	nicht ausgewertet						
CTATG	0.001	nicht ausgewertet						
TTATG	< 0.001	nicht ausgewertet						

Die Reihenfolge der bestimmten Polymorphismen folgt deren Abstand zum ATG-Start, beginnend mit dem am nächsten liegenden (T-548C). Bei der Analyse trägt jeder Haplotyp zu einer Hälfte des Phänotyps bei. Der häufigste Haplotyp wurde als Referenz festgelegt; die Effekte der anderen Haplotypen als Differenz angegeben.

Means ± SEM,

* adjustiert für Geschlecht und Alter,

** ISI = Insulinsensitivitätsindex; adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI (N = 304),

*** adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI.

Tabelle 5.3: Haplotyp-Analyse

6 Zusammenfassung

Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.3 (*KCNA3*) kann in vielen verschiedenen Geweben einschließlich der insulin sensitiven Gewebe Skelettmuskel, Fettgewebe, Leber und Gehirn nachgewiesen werden. Im Tiermodell wiesen die Knockout-Mäuse ein reduziertes Körpergewicht, eine erhöhte Insulinsensitivität, eine gesteigerte Glukosetoleranz und zusätzlich dazu einen „super-smeller-Phänotyp“ mit niedrigerer Wahrnehmungsschwelle und verbesserter Diskriminationsfähigkeit für Gerüche auf. Diese im Tierversuch erhobenen Daten lassen eine bedeutende Rolle des Kv1.3-Kanals in der Glukosehomöostase des Menschen mit wesentlichem Einfluss auf die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz vermuten.

Im Rahmen der Tübinger Familienstudie für Diabetes mellitus Typ 2 (TÜF) wurde bei 50 Nichtdiabetikern ein etwa 4.5 kb großer Teil des Chromosom 1 sequenziert und auf vorhandene Mutationen im *KCNA3*-Gen geprüft. Die dabei identifizierten SNPs wurden im Folgenden mittels einer Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie in einer Kohorte von 552 Probanden bezüglich ihrer funktionellen Relevanz im Glukosemetabolismus untersucht. Die 552 nicht an Diabetes mellitus erkrankten Probanden wurden mithilfe des oralen Glukosetoleranztests, eine Untergruppe von 304 Probanden zusätzlich mit dem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp in Hinsicht auf Glukosetoleranz und Insulinsensitivität getestet.

In der Promotorregion des *KCNA3*-Gens identifizierten wir fünf SNPs (T-548C, G-697T, A-845G, T-1645C und G-2069A) mit einer Frequenz des seltenen Allels von jeweils 26, 23, 9, 41 und 16%. In Bezug auf anthropometrische Daten und Insulinsekretion ließ keiner der fünf Polymorphismen eine Verbindung erkennen. Die Polymorphismen T-548C (rs2840381), G-697T (rs2821555), A-845G (rs7528937) und G-2069A (rs3762379) zeigten auch bezüglich der Zielparameter Insulinsensitivität und Glukosetoleranz keine signifikanten

ZUSAMMENFASSUNG

Unterschiede. Der T-1645C-Polymorphismus (rs2821557) ging mit reduzierter Insulinsensitivität und eingeschränkter Glukosetoleranz einher: Wir fanden das -1645C-Allel assoziiert mit einer erhöhten Plasmaglukose im 2-Stunden-OGTT ($p = 0.03$), unabhängig von Geschlecht, BMI und Alter ($p = 0.002$) und einer eingeschränkten Insulinsensitivität ($p = 0.01$ bei CC vs. TX, nach Anpassung an die Kovariaten Geschlecht, BMI und Alter). Zusätzlich ließen funktionelle Analysen *in vitro* mithilfe des EMSAs ein verändertes Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren am synthetisierten Oligonukleotid mit C-Allel erkennen.

Eine gain-of-function-Mutation im *KCNA3*-Gen könnte durch eine erhöhte Aktivität des Kv1.3-Kanals zu oben beschriebenen Veränderungen im Glukosemetabolismus führen. Die genauen Mechanismen sind bislang allerdings unklar. Laut bisheriger Studien scheint die Aktivität des Kv1.3-Kanals sowohl auf den Glukosetransport in insulinsensitive Gewebe als auch auf die Zytokinsynthese und -sekretion und den Geruchssinn Einfluss zu haben.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Studie nahe, dass das menschliche *KCNA3*-Gen ein potenzielles Kandidatengen bei der Suche nach genetischen Ursachen des Typ-2-Diabetes darstellt. Nun ist es daran, die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären und das *KCNA3*-Gen weiter zu erforschen, um die Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2 besser verstehen und frühzeitiger eingreifen zu können.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-nicht-kodierender Bereich
5'-UTR	5'-nicht-kodierender Bereich
A-845G	SNP im <i>KCNA3</i> -Gen an der Position -845
ANOVA	Analysis of Variance
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutzucker
<i>CDKAL1</i>	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1-Gen
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
CUTL1	Cut-like 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fetales Kalbserum
FFA	Freie Fettsäuren
<i>FTO</i>	Fat mass and obesity associated-Gen
G-2069A	SNP im <i>KCNA3</i> -Gen an der Position -2069
G-697T	SNP im <i>KCNA3</i> -Gen an der Position -697
GIR	Glukoseinfusionsrate
GLUT	Glukosetransporter
<i>HHEX</i>	Human hematopoietically expressed homeobox-Gen
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGT	eingeschränkte Glukosetoleranz
IL-6	Interleukin 6
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISI	Insulinsensitivitätsindex
ISI _{est}	Insulinsensitivitätsindex aus OGTT geschätzt nach Matsuda

ANHANG

JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
<i>KCNA3</i>	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3-Gen
KIR6.2	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal 6.2
Kv(1.3)	spannungsabhängiger Kaliumkanal (1.3)
LBM	Lean-Body-Mass
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK1	MAPK/ERK-Kinase 1
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Informations
NGT	normale Glukosetoleranz
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
p	p-Wert
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIPD 1&2	Phosphatidylinositol dependent protein kinase 1&2
PKA	Proteinkinase A
PKB/Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PPAR γ	Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor Gamma
PTB	Phosphotyrosinbindung
RAS	Rat sarcoma protein
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SGK1	Serumglukokortikoidkinase 1
SHC	adaptor protein with src-homology
<i>SLC30A8</i>	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8-Gen
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS	Suppressors of cytokine signaling
T-1645C	SNP im <i>KCNA3</i> -Gen an der Position -1645
T-548C	SNP im <i>KCNA3</i> -Gen an der Position -548
<i>TCF7L2</i>	Transcription factor 7-like 2-Gen

THESIAS	Testing Haplotype Effects In Association Studies
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TPI	Tetrapolare Impedanzmessung
TÜF	Tübinger Familienstudie
WHR	Waist-to-hip-ratio

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Insulinsignaltransduktion.....	4
Abbildung 1.2: Membrantopologisches Modell der Kv-Kanäle.....	7
Abbildung 3.1: BMI (Means \pm SEM).....	24
Abbildung 3.2: Plasmaglukose 120 min (OGTT), einzelne Werte der Probanden mit T-1645C- Polymorphismus.....	26
Abbildung 3.3: Insulinsensitivität (Clamp), einzelne Werte der Probanden mit T-1645C-Polymorphismus.....	28
Abbildung 3.4: Glukosetoleranz (OGTT).....	29
Abbildung 3.5: EMSA.....	32
Abbildung 4.1: Zelluläre Mechanismen der erhöhten Glukoseaufnahme.....	40

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Teilnehmercharakteristika des OGTTs und des Clamps.....	11
Tabelle 5.1: Polymorphismen ohne relevanten metabolischen Effekt.....	43
Tabelle 5.2: Metabolische Effekte des T-1645C-Polymorphismus	45
Tabelle 5.3: Haplotyp-Analyse	46

8 Literaturverzeichnis

1. **Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF** 2002 Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of biological chemistry* 277:1531-1537
2. **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. *Nature genetics* 26:76-80
3. **Andreelli F, Laville M, Ducluzeau PH, Vega N, Vallier P, Khalfallah Y, Riou JP, Vidal H** 1999 Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia* 42:358-364
4. **Arner P** 2005 Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Current molecular medicine* 5:333-339
5. **Beck-Nielsen H, Groop LC** 1994 Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 94:1714-1721
6. **Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E** 2001 Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13942-13947
7. **Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, B SA, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG** 2006 Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:17414-17419

8. **Bowlby MR, Fadool DA, Holmes TC, Levitan IB** 1997 Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *The Journal of general physiology* 110:601-610

9. **Bregestovski P, Redkozubov A, Alexeev A** 1986 Elevation of intracellular calcium reduces voltage-dependent potassium conductance in human T cells. *Nature* 319:776-778

10. **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 New York, NY* 289:2122-2125

11. **Colley BS, Biju KC, Visegrady A, Campbell S, Fadool DA** 2007 Neurotrophin B receptor kinase increases Kv subfamily member 1.3 (Kv1.3) ion channel half-life and surface expression. *Neuroscience* 144:531-546

12. **Comi RJ, Grunberger G, Gorden P** 1987 Relationship of insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes. *The Journal of clinical investigation* 79:453-462

13. **Damsbo P, Vaag A, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H** 1991 Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34:239-245

14. **DeFronzo RA** 2004 Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Medical clinics of North America* 88:787-835, ix

15. **Deutsch C, Chen LQ** 1993 Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10036-10040

16. **Donahue RP, Orchard TJ** 1992 Diabetes mellitus and macrovascular complications. An epidemiological perspective. *Diabetes care* 15:1141-1155

17. **Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L** 1989 Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 321:337-343
18. **Fadool DA, Holmes TC, Berman K, Dagan D, Levitan IB** 1997 Tyrosine phosphorylation modulates current amplitude and kinetics of a neuronal voltage-gated potassium channel. *Journal of neurophysiology* 78:1563-1573
19. **Fadool DA, Levitan IB** 1998 Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 18:6126-6137
20. **Fadool DA, Tucker K, Perkins R, Fasciani G, Thompson RN, Parsons AD, Overton JM, Koni PA, Flavell RA, Kaczmarek LK** 2004 Kv1.3 channel gene-targeted deletion produces "Super-Smeller Mice" with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron* 41:389-404
21. **Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ, Simmen JA** 2000 Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *Journal of neurophysiology* 83:2332-2348
22. **Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI** 2007 A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science New York, NY* 316:889-894
23. **Freedman BD, Price MA, Deutsch CJ** 1992 Evidence for voltage modulation of IL-2 production in mitogen-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 149:3784-3794

24. **Garvey WT, Huecksteadt TP, Matthaei S, Olefsky JM** 1988 Role of glucose transporters in the cellular insulin resistance of type II non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 81:1528-1536

25. **Guthoff M, Tschritter O, Berg D, Liepelt I, Schulte C, Machicao F, Häring HU, Fritsche A** 2009 Effect of genetic variation in Kv1.3 on olfactory function. *Diabetes/metabolism research and reviews* 25:523-527

26. **Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X** 2005 International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57:473-508

27. **Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, Froguel P** 1998 Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* 41:1511-1515

28. **Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F** 2004 Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Journal of cellular physiology* 199:194-199

29. **Hepp K, Häring HU** 2003 Einführung in die Biochemie und Pathophysiologie des Stoffwechsels. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH, Häring HU ed. *Diabetologie in Klinik und Praxis*, 5. Auflage. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag; 1-42

30. **Hille B** 1992 Evolution and Diversity. In: *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc; 525-544

31. **Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS** 2002 A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336

32. **Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM** 1994 Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:4854-4858
33. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM** 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science New York, NY 259:87-91
34. **Jan LY, Jan YN** 1997 Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. Annual review of neuroscience 20:91-123
35. **Jan LY, Jan YN** 1992 Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. Annual review of physiology 54:537-555
36. **Kahn CR, Vicent D, Doria A** 1996 Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. Annual review of medicine 47:509-531
37. **Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A** 1995 Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. The Journal of biological chemistry 270:23780-23784
38. **Kapellen TM, Galler A, Bottner A, Kiess W** 2004 [Epidemiology, treatment and prevention of type 2 diabetes in children and adolescents]. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946) 129:1519-1523
39. **Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR** 1982 Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. Science New York, NY 215:185-187
40. **Kellerer M, Häring HU** 2003 Epidemiologie, Klinik, Ätiologie und Pathogenese des Typ-2-Diabetes. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH, Häring HU ed. Diabetologie in Klinik und Praxis, 5. Auflage. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag; 68-80

41. **Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G** 2001 Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E745-751

42. **Kobberling J, Creutzfeldt W** 1970 Comparison of different methods for the evaluation of the oral glucose tolerance test. *Diabetes* 19:870-877

43. **Köbberling J, Tillil H** 1982 Empirical risk figures for first degree relatives of non-insulin dependent diabetics. In: Köbberling J, Tattersall R ed. *The genetics of diabetes mellitus*. London - New York: Academic press; 201-209

44. **Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU** 1999 The PPARgamma2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 42:758-762

45. **Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Muhlhofer A, Berti L, Horikoshi H, Ullrich A, Häring H** 1996 Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *The Journal of clinical investigation* 97:1471-1477

46. **Krutzfeldt J, Kausch C, Volk A, Klein HH, Rett K, Häring HU, Stumvoll M** 2000 Insulin signaling and action in cultured skeletal muscle cells from lean healthy humans with high and low insulin sensitivity. *Diabetes* 49:992-998

47. **Li Y, Wang P, Xu J, Desir GV** 2006 Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a Ca²⁺-dependent mechanism. *American journal of physiology* 290:C345-351

48. **Li Y, Wang P, Xu J, Gorelick F, Yamazaki H, Andrews N, Desir GV** 2007 Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. *Biochemical and biophysical research communications* 362:658-664

49. **Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C** 1993 Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *The New England journal of medicine* 329:1988-1992
50. **Lin CS, Boltz RC, Blake JT, Nguyen M, Talento A, Fischer PA, Springer MS, Sigal NH, Slaughter RS, Garcia ML, et al.** 1993 Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 177:637-645
51. **Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J** 1998 Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47:515-522
52. **Liu QH, Fleischmann BK, Hondowicz B, Maier CC, Turka LA, Yui K, Kotlikoff MI, Wells AD, Freedman BD** 2002 Modulation of Kv channel expression and function by TCR and costimulatory signals during peripheral CD4(+) lymphocyte differentiation. *The Journal of experimental medicine* 196:897-909
53. **Martel J, Dupuis G, Deschenes P, Payet MD** 1998 The sensitivity of the human Kv1.3 (hKv1.3) lymphocyte K⁺ channel to regulation by PKA and PKC is partially lost in HEK 293 host cells. *The Journal of membrane biology* 161:183-196
54. **Matsuda M, DeFronzo RA** 1999 Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes care* 22:1462-1470
55. **Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Häring HU** 2000 Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine reviews* 21:585-618
56. **McGuire EA, Helderan JH, Tobin JD, Andres R, Berman M** 1976 Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *Journal of applied physiology* 41:565-573

57. **Michelle Furtado L, Poon V, Klip A** 2003 GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta physiologica Scandinavica* 178:287-296
58. **Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW** 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82:4196-4200
59. **Mourre C, Chernova MN, Martin-Eauclaire MF, Bessone R, Jacquet G, Gola M, Alper SL, Crest M** 1999 Distribution in rat brain of binding sites of kaliotoxin, a blocker of Kv1.1 and Kv1.3 alpha-subunits. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 291:943-952
60. **Pahapill PA, Schlichter LC** 1990 Modulation of potassium channels in human T lymphocytes: effects of temperature. *The Journal of physiology* 422:103-126
61. **Panzram G** 1987 Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30:123-131
62. **Payet MD, Dupuis G** 1992 Dual regulation of the n type K⁺ channel in Jurkat T lymphocytes by protein kinases A and C. *The Journal of biological chemistry* 267:18270-18273
63. **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y** 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 272:29911-29918
64. **Pendergrass M, Koval J, Vogt C, Yki-Jarvinen H, Izzo P, Pipek R, Ardehali H, Printz R, Granner D, DeFronzo RA, Mandarino LJ** 1998 Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM. *Diabetes* 47:387-394
65. **Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D** 2000 Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life sciences* 67:291-300

66. **Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM** 2001 C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* 286:327-334
67. **Rotter V, Nagaev I, Smith U** 2003 Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *The Journal of biological chemistry* 278:45777-45784
68. **Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF** 2001 Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *The Journal of clinical investigation* 107:181-189
69. **Saltiel AR, Kahn CR** 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806
70. **Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA** 2002 Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51:3391-3399
71. **Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA** 2003 Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 278:13740-13746
72. **Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, Savoye M, Rieger V, Taksali S, Barbetta G, Sherwin RS, Caprio S** 2002 Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *The New England journal of medicine* 346:802-810
73. **Somodi S, Hajdu P, Gaspar R, Panyi G, Varga Z** 2008 Effects of changes in extracellular pH and potassium concentration on Kv1.3 inactivation. *Eur Biophys J* 37:1145-1156
74. **Steensberg A, Fischer CP, Sacchetti M, Keller C, Osada T, Schjerling P, van Hall G, Febbraio MA, Pedersen BK** 2003 Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. *The Journal of physiology* 548:631-638

75. **Storey NM, Gomez-Angelats M, Bortner CD, Armstrong DL, Cidlowski JA** 2003 Stimulation of Kv1.3 potassium channels by death receptors during apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 278:33319-33326
76. **Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haefen T, Renn W, Gerich J** 2000 Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes care* 23:295-301
77. **t Hart LM, Nijpels G, Dekker JM, Maassen JA, Heine RJ, van Haefen TW** 2002 Variations in insulin secretion in carriers of gene variants in IRS-1 and -2. *Diabetes* 51:884-887
78. **Teisseyre A, Mozrzymas JW** 2006 The inhibitory effect of copper ions on lymphocyte Kv1.3 potassium channels. *J Physiol Pharmacol* 57:301-314
79. **Tregouet DA, Escolano S, Tired L, Mallet A, Golmard JL** 2004 A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Annals of human genetics* 68:165-177
80. **Trimmer JS** 1998 Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Current opinion in neurobiology* 8:370-374
81. **Tschritter O, Preissl H, Hennige AM, Stumvoll M, Porubska K, Frost R, Marx H, Klosel B, Lutzenberger W, Birbaumer N, Häring HU, Fritsche A** 2006 The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12103-12108
82. **Tucker K, Overton JM, Fadool DA** 2008 Kv1.3 gene-targeted deletion alters longevity and reduces adiposity by increasing locomotion and metabolism in melanocortin-4 receptor-null mice. *International journal of obesity (2005)* 32:1222-1232
83. **Virkkamaki A, Ueki K, Kahn CR** 1999 Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 103:931-943

84. **Weigert C, Brodbeck K, Sawadogo M, Häring HU, Schleicher ED** 2004 Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF-beta1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells: up-regulation of USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway. *The Journal of biological chemistry* 279:15908-15915
85. **Weijers RNM** 2009 Risk loci for type 2 diabetes - quo vadis? *Clin Chem Lab Med* 47:383-386
86. **Whitehead JP, Molero JC, Clark S, Martin S, Meneilly G, James DE** 2001 The role of Ca²⁺ in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry* 276:27816-27824
87. **Wilcox G** 2005 Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist* 26:19-39
88. **Xu J, Koni PA, Wang P, Li G, Kaczmarek L, Wu Y, Li Y, Flavell RA, Desir GV** 2003 The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human molecular genetics* 12:551-559
89. **Xu J, Wang P, Li Y, Li G, Kaczmarek LK, Wu Y, Koni PA, Flavell RA, Desir GV** 2004 The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3112-3117
90. **Yan L, Figueroa DJ, Austin CP, Liu Y, Bugianesi RM, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Kohler MG** 2004 Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes* 53:597-607
91. **Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, Kyriakis JM** 1998 Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *The Journal of biological chemistry* 273:22681-22692

LITERATURVERZEICHNIS

92. **Zimmet P** 2003 The burden of type 2 diabetes: are we doing enough? *Diabetes & metabolism* 29:6S9-18
93. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J** 2001 Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Fritsche und Dr. Otto Tschritter für die Überlassung des Themas sowie das Engagement und die unablässige Unterstützung bei der Betreuung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der TÜF-Studie, allen voran bei Anna Bury, Barbara Horrer, Ellen Kollmar und Heike Luz für die sehr gute Zusammenarbeit. Dank ihrer Hilfestellungen war die Einarbeitung in die Methodik, die Organisation der Untersuchungen und die Lösung technischer Probleme gut in den Griff zu bekommen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei allen Probanden, die durch ihre bereitwillige Teilnahme die Durchführung dieser Studie überhaupt ermöglichen haben.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mir immer zur Seite standen, meinen Geschwistern, Julia Kottmann, Lena Wölfle und all den geduldigen Menschen, die mich tatkräftig unterstützen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Katharina Kienzle
Geburtstag 04.04.1982
Geburtsort Stuttgart

Schulbildung

1988-1992 Geschwister-Scholl-Schule Crailsheim
1992-2001 Albert-Schweitzer-Gymnasium Crailsheim
06/2001 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

08/2001-05/2002 FSJ an der Kinderklinik der Universität Heidelberg

Hochschulausbildung

10/2002 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
09/2004 Ärztliche Vorprüfung
03-04/2005 Famulatur Allgemeinmedizin und Pädiatrie (Crailsheim)
03-04/2006 Famulatur Innere Medizin (KKH Reutlingen)
01-02/2007 Famulatur Gynäkologie (Cobán, Guatemala)
08-09/2007 Famulatur Pädiatrie (Universitätsklinik Tübingen)
2008/2009 Praktisches Jahr am KKH Reutlingen (Wahlfach Pädiatrie)
19/05/2009 Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)

Berufliche Tätigkeit

Seit 12/2009 Assistenzärztin Innere Medizin, Filderklinik, Filderstadt