

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

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

**-866G/A Polymorphismus in der Promotorregion von
Uncoupling Protein 2 – Auswirkung auf den
Glukosemetabolismus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martina Guthoff
aus
Darmstadt

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Fritsche

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Neu

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus Typ 2	1
1.2	Insulinsynthese, -sekretion und -wirkung	2
1.3	Genetische Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2.....	4
1.4	Uncoupling Proteine	4
1.5	UCP2 – Rolle bei der Insulinsekretion.....	5
1.6	-866G/A Polymorphismus in der Promotorregion von UCP2.....	7
1.7	Fragestellung und Hypothese.....	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Studienaufbau	9
2.2	Probanden	9
2.2.1	Teilnahmevoraussetzung und Ausschlusskriterien	9
2.2.2	Teilnehmer	10
2.3	Versuchsablauf	12
2.3.1	Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)	12
2.3.2	Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp	12
2.3.3	Hyperglykämischer Clamp.....	13
2.3.4	Indirekte Kalorimetrie	14
2.3.5	Tetrapolare Impedanzmessung (TPI).....	15

2.4	Verwendete Medikamente	15
2.4.1	Oraler Glukosetoleranztest.....	15
2.4.2	Euglykämischer und hyperglykämischer Clamp	16
2.5	Analytik	16
2.5.1	Blutglukose.....	16
2.5.2	Insulin und C-Peptid	17
2.5.3	Indirekte Kalorimetrie	17
2.5.4	Körperfett.....	18
2.5.5	Genotypisierung	18
2.6	Berechnungen.....	19
2.6.1	Allgemein.....	19
2.6.2	OGTT	19
2.6.3	Indirekte Kalorimetrie	20
2.6.4	Hyperglykämischer Clamp.....	21
2.7	Statistische Auswertung	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Ergebnisse der 1. Kohorte aus Tübingen	23
3.1.1	Oraler Glukosetoleranztest.....	23
3.1.2	Euglykämischer Clamp und Kalorimetrie.....	27
3.2	Ergebnisse der 2. Kohorte aus Tübingen und Utrecht	32
3.2.1	OGTT-Charakteristika der Clamp-Teilnehmer	32
3.2.2	Hyperglykämischer Clamp.....	34
3.2.3	Multivariate Regressionsanalyse.....	37

4	Diskussion	39
4.1	UCP2: Kandidatengen für Diabetes mellitus Typ 2.....	39
4.2	-866G/A Polymorphismus und anthropometrische Daten.....	40
4.3	-866G/A Polymorphismus und Plasmaglukose	41
4.4	-866G/A Polymorphismus und Insulinsensitivität.....	41
4.5	-866G/A Polymorphismus und Kohlenhydratoxidation	41
4.6	-866G/A Polymorphismus und Insulinsekretion.....	43
4.6.1	Tübinger Familienstudie, süddeutsche Population: OGTT	43
4.6.2	Kollaborationsstudie: Hyperglykämischer Clamp	44
4.7	Schlußfolgerung.....	48
5	Zusammenfassung.....	50
6	Anhang	52
7	Literaturverzeichnis	55
8	Danksagung.....	62
9	Lebenslauf	63

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Immer mehr Menschen weltweit leiden an Diabetes mellitus. Im Jahr 2000 wurde die Zahl auf 151 Millionen Menschen geschätzt, bis zum Jahr 2010 sollen es 221 Millionen sein und im Jahr 2025 sogar 300 Millionen [71]. Allein in Deutschland leben heute 4 Millionen Diabetiker, davon entfallen 5% auf Diabetes mellitus Typ 1 und andere Diabetes-Formen, die übrigen 95% haben einen Typ 2 Diabetes mellitus.

Der Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 voraus geht eine Reihe von Stoffwechselabnormitäten, die unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden. Dazu gehören Adipositas, Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen, erhöhter Blutdruck und Mikroalbuminurie [24; 71].

Durch die schleichende Entwicklung kommt es zum Auftreten der eigentlichen Krankheit oft erst nach vielen Jahren, meistens sind dann schon Folgen der schlechten Stoffwechsellage vorhanden. Diese Folgeschäden bestehen aus Mikroangiopathien (wie z.B. Retinopathie und Nephropathie) und Makroangiopathien (koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Arteriosklerose), die koronare Herzkrankheit ist die häufigste Todesursache bei Typ 2 Diabetikern [6; 54]. Damit sind die Folgeerkrankungen nicht nur für den Einzelnen im Sinne einer Einschränkung der Lebensqualität und Lebenserwartung ein großes Problem, auch dem Gesundheitswesen fallen erhebliche Kosten an [34].

Um in Zukunft vermehrt präventiv eingreifen zu können, ist es wichtig, die Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2 zu verstehen:

Eine genetische Komponente gilt heute als gesichert. Kinder von Typ 2 Diabetikern haben ein Risiko von 40%, selbst einen Diabetes zu entwickeln [17; 35], bei zwei kranken Elternteilen beträgt es sogar 70% [24].

Der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 wird schon seit langem eine multifaktorielle Genese zu Grunde gelegt [46], das heißt, neben den genetischen Faktoren (s.u.) spielen auch äußere Einflüsse und Umweltfaktoren eine Rolle [71].

Pathophysiologisch entsteht der Diabetes bei einem Ungleichgewicht in der Glukosehomöostase. Eine unzureichende Suppression der hepatischen Glukoseproduktion sowie eine gestörte Verstoffwechselung in der Peripherie lassen den Blutzucker chronisch ansteigen. Die genauen Pathomechanismen, die dazu führen, blieben bisher ungeklärt. Ursächlich scheint eine periphere Insulinresistenz sowie eine Insulinsekretionsstörung der β -Zellen des Pankreas [5; 21; 48; 51; 53; 64].

1.2 Insulinsynthese, -sekretion und -wirkung

Insulin ist ein Proteohormon, das an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der β -Zelle des Pankreas zunächst als Präproinsulin gebildet wird. Nach Abspaltung des Signalpeptides entsteht Proinsulin, welches im Golgi-Apparat in das aktive Insulin und C- (Connecting-) Peptid gespalten wird. Die Insulinmoleküle bilden Komplexe mit Zn-Ionen und werden zusammen mit dem C-Peptid in den Granula der β -Zelle gespeichert [27].

Der wichtigste physiologische Reiz für die Insulinsekretion ist der Anstieg des Blutzuckerspiegels. Überschreitet dieser ein bestimmtes Niveau, wird über nicht-insulinabhängige GLUT2-Transporter Glukose in die Zelle aufgenommen. Sowohl GLUT2 als auch die Glucokinase, dem ersten Enzym der anschließenden Glykolyse, besitzen eine hohe Michaelis-Menten-Konstante, so dass für die Halbsättigung dieser zwei Enzyme eine hohe Glukosekonzentration vorhanden sein muss [27].

Bei der Glykolyse entsteht zunächst Pyruvat, welches dann im Citratcyklus und in der Atmungskette zu ATP verstoffwechselt wird. ATP-sensitive Kaliumkanäle schließen bei einem Anstieg des ATP/ADP-Quotienten, die daraus resultierende Depolarisation führt zum Öffnen von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen, es kommt zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zur Exocytose des in Vesikel gespeicherten Insulins [27].

Die Wirkungen des Insulins sind vielfältig: Hauptsächlich wirkt es auf den Blutzuckerspiegel, indem es über den insulinabhängigen GLUT4-Transporter die Glukoseaufnahme in das Muskel- und Fettgewebe steuert [40]. Neben vielen anderen Angriffspunkten im Organismus hemmt es außerdem die hepatische Gluconeogenese und Glykogenolyse sowie die Lipolyse in den Fettzellen [40]. Insulin ist das einzige Hormon des Menschen, welches den Blutzuckerspiegel senken kann [40].

Wird der Organismus insulinresistent, so versucht er vorerst, dieses durch eine erhöhte Insulinsekretion auszugleichen. Erst wenn sich die Sekretion erschöpft, kommt es zu einem Insulinmangel, und es werden neben einer verminderten Aufnahme der Glukose in die insulinabhängigen Gewebe außerdem die Enzyme der Glykolyse und der Glykogensynthese nicht ausreichend stimuliert beziehungsweise die der Gluconeogenese und der Glykogenolyse nicht ausreichend gehemmt, so dass letztere Stoffwechselprozesse überwiegen. Es resultiert ein erhöhter Plasmaglukosespiegel [27; 40].

Des Weiteren steigen durch den fehlenden antilipolytischen Effekt die freien Fettsäuren im Blut an [27; 40], was sich wiederum negativ auf die Insulinsensitivität und –sekretion auswirken kann [31].

1.3 Genetische Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2

Bei der Vererbung des Diabetes mellitus geht man von einer Polygenie aus, so ist das Vorhandensein von vielen defekten Genen notwendig, um den Phänotyp der Erkrankung auszuprägen [32; 52].

Eine Diabetes-Sonderform, MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young), ist samt seiner zu Grunde liegenden Mutationen mittlerweile gut aufgeklärt [19]. Es liegt auf der Hand, dass man ebenfalls nach Mutationen sucht, die den Diabetes mellitus Typ 2 verursachen könnten, also in Genen, die die Insulinsensitivität und -sekretion steuern.

Für Ersteres sind bisher beispielsweise Mutationen in den Genen der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) oder des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor Gamma (PPAR γ) gefunden worden, die das Risiko für einen Typ 2 Diabetes erhöhen [3; 7; 26; 56; 61].

Mutationen in Genen, die die Insulinsekretion beeinflussen und mit Diabetes mellitus Typ 2 zusammenhängen, hat man ebenfalls entdeckt. Zu nennen sind hier beispielsweise KIR6.2- oder SUR- (Sulfonyl Harnstoff Rezeptor) Polymorphismen [1; 25; 28].

Ein interessantes Gen, welches mit dem Glukosemetabolismus, der Insulinsensitivität und der Insulinsekretion zusammenhängt, ist das Uncoupling Protein 2 (UCP2). Hier ist vor allem der -866G/A Polymorphismus in dessen Promotorregion bekannt. Im Folgenden soll die Auswirkung dieses Polymorphismus auf den Glukosestoffwechsel untersucht werden.

1.4 Uncoupling Proteine

Zur ATP-Gewinnung werden die beim Citratcyklus und der β -Oxidation freiwerdenden Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ in die Atmungskette eingeschleust. Dort wird beim Elektronentransport Energie freigesetzt, welche benutzt wird, um Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Zwischenraum, den Intra-Cristae-Raum, zu pumpen. Dadurch entsteht ein lumennegativer

Gradient von etwa 170 mV. Durch diese „proton-motive force“ werden jetzt die H^+ -Ionen zurück in die Matrix bewegt, wobei sie den Weg über die ATP-Synthetase nehmen, es entsteht Energie in Form von ATP [55].

Uncoupling Proteine gehören zur Familie der inneren mitochondrialen Membranproteine [8; 22]. Sie haben die Fähigkeit zum Protonentransport und stellen daher einen alternativen Weg für die H^+ -Ionen zurück in die Matrix dar. Dabei wird der elektrochemische Gradient verkleinert, ohne dass ATP entsteht, stattdessen wird Wärme frei [47]. Die Entkoppelungsfunktion der UCPs spielt dadurch eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der ATP-Generation und der Wärmebildung.

Mittlerweile sind fünf Uncoupling Proteine bekannt: UCP1, UCP2, UCP3 [9; 68], UCP4 [42] und ein 5. Protein, ein Carrier-Protein in den Mitochondrien des ZNS [57].

UCP1 wird in braunem Fettgewebe gefunden [47], und in kleineren Mengen auch in weißem Fettgewebe und im Skelettmuskel [45]. Es soll eine Rolle spielen bei der zitterfreien Wärmebildung [16].

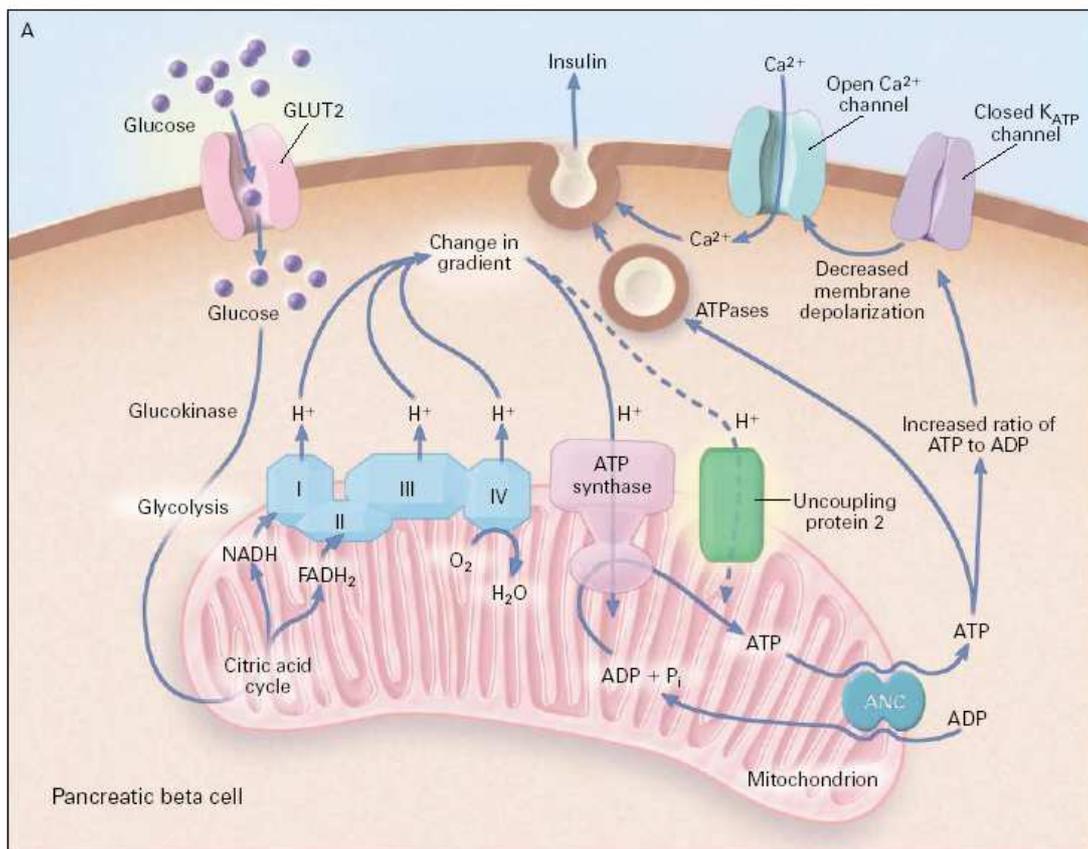
UCP2 wurde 1997 entdeckt [22; 23]. Das Protein besteht aus 309 Aminosäuren und besitzt 6 Transmembrandomänen [39]. Es wird hauptsächlich in weißem Fettgewebe, den β -Zellen des Pankreas und im Gehirn exprimiert [55] und ist beteiligt an der Wärmeregulation, der Stoffwechselregulation und der Infektabwehr [55].

1.5 UCP2 – Rolle bei der Insulinsekretion

Im Glukosestoffwechsel scheint das Uncoupling Protein 2 eine ganz besondere Funktion zu haben [37]:

Wie oben beschrieben kommt es in der β -Zelle bei erhöhtem Blutzuckerspiegel zum Abbau von Glukose und zur ATP-Generierung. Das ATP bewirkt die Schließung von Kaliumkanälen, woraufhin es zur Ausschüttung von Insulin kommt.

Durch die Einlagerung von UCP2 in die Mitochondrienmembran und dem daraus resultierenden vermehrten Protonenfluss über dieses Kanalprotein kommt es zu einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in der β -Zelle, also zu einer Verminderung des ATP/ADP-Quotienten, dadurch zu einer verminderten Schließung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle und resultierend zu einer verminderten Insulinsekretion.



ANC = adenine nucleotide carrier

Abbildung 1.1: Rolle des UCP2 bei der Insulinsekretion

(aus **Langin D** (2001) Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion. New England Journal of Medicine 345: 1772-1774 [37])

Unterstützt wurde diese Theorie von Studien, die zeigten, dass UCP2 – knock-out Mäuse erhöhte ATP-Spiegel und eine erhöhte Insulinsekretion haben [70], und dass auf der anderen Seite eine vermehrte Expression von UCP2 in der β -Zelle einhergeht mit einer verminderten Insulinsekretion [11].

Das Uncoupling Protein 2 stellt somit ein Gen dar, welches in den Glukosemetabolismus eingreift und potentiell die Wahrscheinlichkeit eines Diabetes mellitus Typ 2 beeinflussen könnte.

1.6 -866G/A Polymorphismus in der Promotorregion von UCP2

Mutationen im Gen von UCP2 selbst zeigten keinen Zusammenhang mit Diabetes [8; 14; 49]. Neuere Studien beschreiben jedoch in der Promotorregion von Uncoupling Protein 2 den -866G/A Polymorphismus, der eine Assoziation mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 aufweist [10; 18; 36; 58; 59; 67; 69].

Der Promotor eines Gens steuert die Stärke der Genprodukt-Expression in den verschiedenen Geweben. Eine verminderte UCP2 Expression kann, wie schon aufgeführt, zu einer erhöhten Insulinsekretion führen und umgekehrt eine vermehrte Expression zu verminderter Insulinsekretion [11; 70].

Die Ergebnisse der oben genannten Studien sind jedoch kontrovers bezüglich der Auswirkung des -866G/A Polymorphismus auf die Expression. Esterbauer et al. [18] und Krempler et al. [36] fanden das A-Allel verknüpft mit einer vermehrten mRNA Expression in Adipozyten. In einer japanischen Studie zeigte sich ebenfalls eine höhere Promotoraktivität [58]. Wang et al. hingegen wiesen bei Polymorphismus-Trägern eher niedrigere mRNA-Spiegel nach [69].

Die Studien widersprechen sich außerdem in ihren Aussagen hinsichtlich welcher Genotyp welche phänotypischen Veränderungen hervorruft: In drei Studien gingen Träger des A-Allels einher mit einer eingeschränkten Insulinsekretion [36; 58; 59], während eine neuere Studie das Gegenteil herausfand [69].

Andere Auswirkungen des -866G/A Polymorphismus sind ebenfalls heterogen, so ergab sich in einer Studie bei jugendlichen adipösen Trägern der Mutation eine erhöhte Kohlenhydratoxidation und eine verminderte Fettoxidation [38], eine italienischen Arbeitsgruppe wies eine erhöhte Insulinresistenz nach [12] und in Japan stellte sich heraus, dass unter Diabetikern A-Allel-Träger früher manifest werden und früher Insulin benötigen [58].

1.7 Fragestellung und Hypothese

In der Ursachenforschung des Diabetes mellitus Typ 2 ist es wichtig, potentielle Kandidaten-Gene zu finden und zu untersuchen, wie sich Mutationen in diesen Genen auf den Phänotyp auswirken. Bezüglich des -866G/A Polymorphismus in der Promotorregion von Uncoupling Protein 2 sind die Ergebnisse bisher sehr widersprüchlich.

In der folgenden Arbeit soll die Auswirkung des -866G/A Polymorphismus auf den Glukosestoffwechsel, und hier spezifisch auf Insulinsekretion und Insulinwirkung in einem großen Patientenkollektiv mit normaler und gestörter Glukosetoleranz untersucht werden. Hierfür wurden die Probanden phänotypisch genau charakterisiert (mit Hilfe des oralen Glukosetoleranztests, des hyperglykämischen Clamps, des euglykämischen Clamps und der indirekter Kalorimetrie) und hinsichtlich des -866G/A Polymorphismus genotypisiert.

Unsere Hypothese ist, dass der -866G/A Polymorphismus sowohl Insulinsekretion als auch Insulinwirkung beeinträchtigt und somit die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 begünstigt.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die Versuche fanden im Rahmen der Tübinger Familienstudie für Diabetes mellitus Typ 2 (TÜF-Studie) statt. Die Probanden wurden im Voraus mündlich und schriftlich über die jeweilige Untersuchung, deren Durchführung, Ziele und mögliche Risiken unterrichtet und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Über genetische Analysen wurde gesondert aufgeklärt. Die Teilnehmer hatten jederzeit die Möglichkeit, ihre Einwilligung wieder zurückzunehmen und aus der Studie auszutreten. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen geprüft und zugelassen.

2.2 Probanden

2.2.1 Teilnahmevoraussetzung und Ausschlusskriterien

Für die Studie wurden Personen mit einem erhöhten Risiko für einen Diabetes mellitus Typ 2 gesucht. Dieses Risiko war hauptsächlich durch die erstgradige Verwandtschaft zu einem Typ 2 Diabetes-Patienten definiert.

Als allgemeine Ausschlusskriterien galten:

- Diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2
- Einnahme von Medikamenten, welche einen Einfluss auf Glukosetoleranz, Insulinsensitivität oder Insulinsekretion haben

- Erkrankungen des Gastrointestinal-Trakts, welche eine intakte Resorption nicht gewährleisten würden (dies ist wichtig für die Aussagekraft des oralen Glukosetoleranztest)
- Schwangerschaft
- Weniger als 3 Monate zurückliegende Entbindung und / oder Stillperiode

2.2.2 Teilnehmer

Es wurden zwei Probanden-Kohorten auf verschiedene Weise untersucht:

Die Erste bestand aus 529 normal glukosetoleranten (NGT) Probanden aus Tübingen.

Genotyp	GG	AG	AA	P**
Anzahl (w/m)	198 (133/65)	254 (144/110)	77 (45/32)	0.07
Alter (Jahre)	36 ± 1	34 ± 1	39 ± 2	0.04
BMI (kg/m ²)	26.0 ± 0.4	26.1 ± 0.4	26.3 ± 0.6	0.83

** ANOVA (Analysis of Variance)

Tabelle 2.1: Teilnehmercharakteristika (Probanden mit OGTT)

141 Probanden aus dieser Kohorte nahmen ebenfalls an einem euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamp und einer indirekten Kalorimetrie teil.

Genotyp	GG	AG	AA	P**
Anzahl (w/m)	54 (31/23)	74 (32/42)	13 (9/4)	0.11
Alter (Jahre)	32 ± 1	32 ± 1	38 ± 2	0.07
BMI (kg/m ²)	24.8 ± 0.6	24.8 ± 0.6	26.6 ± 1.4	0.41

** ANOVA

Tabelle 2.2: Teilnehmercharakteristika (Probanden mit euglykämischem Clamp)

Die zweite Kohorte, die mit einem hyperglykämischen Clamp zur genauen Bestimmung der Insulinsekretion untersucht wurde, umfasste 85 normal glukosetolerante (NGT) und 37 eingeschränkt glukosetoleranten (IGT = impaired glucose tolerance) Teilnehmer aus Süddeutschland. Des Weiteren wurden 79 Probanden (59 NGT und 20 IGT) in Kollaboration mit einer anderen Arbeitsgruppe aus Utrecht in den Niederlanden untersucht, um die Ergebnisse mit einer zweiten Population vergleichen und eine bessere Repräsentativität erzielen zu können.

Genotyp	GG	AG	AA	P**
Anzahl (w/m)	42 (25/17)	52 (26/26)	28 (18/10)	0.42
NGT / IGT	32 / 10	31 / 21	22 / 6	0.11
Alter (Jahre)	37 ± 2	39 ± 2	43 ± 3	0.19
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 0.6	25.7 ± 0.8	24.3 ± 1.0	0.40

NGT = normal glukosetolerant / IGT = eingeschränkt glukosetolerant

** ANOVA

Tabelle 2.3: Teilnehmercharakteristika Tübingen, Deutschland (Probanden mit hyperglykämischem Clamp)

Genotyp	GG	AG	AA	P**
Anzahl (w/m)	30 (19/11)	35 (27/8)	14 (13/1)	0.08
NGT / IGT	24 / 6	30 / 5	13 / 1	0.50
Alter (Jahre)	47 ± 1	46 ± 1	46 ± 2	0.96
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 0.8	25.4 ± 0.6	26.2 ± 0.8	0.52

NGT = normal glukosetolerant / IGT = eingeschränkt glukosetolerant

** ANOVA

Tabelle 2.4: Teilnehmercharakteristika Utrecht, Niederlanden (Probanden mit hyperglykämischem Clamp)

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT)

Alle Probanden nahmen an einem oralen Glukosetoleranztest teil. Sie wurden aufgefordert, in den Tagen zuvor ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten beizubehalten und 10 Stunden vor der Untersuchung keine Nahrung mehr zu sich zu nehmen.

Der Test begann morgens um 8.30 Uhr mit einer basalen Blutentnahme zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin und C-Peptid, außerdem der Routinelaborparameter wie Blutbild, Elektrolyte, Blutfette und Leberenzyme. Nach oraler Gabe von 75 g Glukose gelöst in 300 ml Wasser erfolgten weitere Blutentnahmen zu den Zeiten $t = 30, 60, 90$ und 120 Minuten zur Bestimmung von Glukose, Insulin und C-Peptid.

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

2.3.2 Euglykämischer hyperinsulinämischer Clamp

Den euglykämischen Clamp verwendet man in der Regel zur Bestimmung der Insulinwirkung (Sensitivität). Wir haben diesen Clamp benutzt, um zur Durchführung einer indirekten Kalorimetrie (s.u.) eine präprandiale und eine postprandiale Situation zu simulieren. Der Vollständigkeit halber sei hier der Ablauf eines euglykämischen Clamps aufgeführt:

Der Versuch begann morgens um 8:00 Uhr, nachdem die Probanden eine 12-stündige Nahrungskarenz eingehalten hatten.

Jeder Teilnehmer erhielt 2 periphere Venenzugänge:

Zur Blutabnahme wurde eine Vene am Handrücken punktiert. Mit der „heated-hand“-Technik wurde eine Erweiterung der arterio-venösen Shunts und dadurch eine Arterialisierung der entnommenen Blutprobe erreicht [44]. Die

Infusionslösungen wurden über einen zweiten Zugang am kontralateralen Arm appliziert.

Zur Bestimmung der basalen Glukosekonzentration erfolgte eine Mittelung der zu den Zeitpunkten -30 min, -15 min und -5 min gemessenen Blutzuckerwerte. Ziel war es, den Plasmaglukosespiegel auf diesen Nüchternblutzuckerwert zu fixieren (engl.: to clamp = (ein)spannen). Durch konstante Insulininfusion von 1 mU/min/kg Körpergewicht wurde ein hyperinsulinämischer Zustand erreicht, eine gleichzeitige, variabel angepasste Infusion 20%iger Glukose verhinderte die Hypoglykämie. Um zu überprüfen, ob der Plasmaglukosespiegel den geforderten Ausgangswert betrug, wurde alle 5 min Blut abgenommen und je nach Ergebnis die Glukoseinfusionsrate (GIR) variiert. Später kann man dann mit Hilfe der mittleren GIR eine Aussage über die Insulinsensitivität machen (siehe Berechnungen).

Zu den Zeitpunkten 80 min, 100 min und 120 min wurden weitere Blutproben zur Bestimmung der Glukose- und Insulinkonzentrationen entnommen.

Nach Ende der Untersuchung und Abschluss der Insulininfusion wurde die Glukose schrittweise reduziert, den Probanden eine Mahlzeit gegeben und der Blutzuckerspiegel regelmäßig kontrolliert, um eine Hypoglykämie durch die Nachwirkung des Insulins zu vermeiden.

2.3.3 Hyperglykämischer Clamp

Mit diesem Clamp wurden Probanden aus den Niederlanden und die der zweiten Kohorte aus Süddeutschland untersucht.

Der hyperglykämische Clamp dient zur Bestimmung der Insulinsekretion.

Anders als beim euglykämischen Clamp (griech.: eu = gut, normal) wurde hierbei der Blutglukosespiegel auf 10 mmol/l angehoben (griech.: hyper = über) und dort fixiert. Um dies zu erreichen, wurde erst für jeden Probanden ein individueller Glukosebolus errechnet ($\text{Bolusdosis} = \text{Körpergewicht (kg)} \times \text{gewünschter Anstieg der Glukosekonzentration} \times 1,5$) und dieser dann über die

Dauer von 1 Minute injiziert. Danach startete eine Infusion mit 20 %iger Glukose. Zur Kontrolle des Plasmaglukosespiegels wurde alle 5 min Blut aus dem der Infusion kontralateralen Venenzugang entnommen und die Glukoseinfusionsrate entsprechend variiert.

Mit den bei dieser Untersuchung gemessenen Werten für die Plasmainsulinkonzentration ist es später möglich, die Insulinsekretion zu berechnen.

Auch nach Ende dieser Untersuchung wurden die oben genannten Maßnahmen zur Hypoglykämievermeidung ergriffen, da durch die Sekretions-Stimulation selbst nach Beendigung des Versuchs noch hohe Insulinspiegel vorhanden sind.

2.3.4 Indirekte Kalorimetrie

Die indirekte Kalorimetrie wurde sowohl vor Beginn des euglykämischen Clamps durchgeführt, um die basalen Werte zu erhalten, als auch während des Clamps im „steady state“ unter Insulin- und Glukoseinfusion. Dazu wurde den liegenden Probanden jeweils 15 Minuten lang eine Plastikhaube über den Kopf gezogen, welche über ein geschlossenes System an ein Messgerät angeschlossen war. Bestimmt wurden Kohlendioxidabgabe und Sauerstoffaufnahme der Teilnehmer.

Der Quotient aus letzteren beiden ergibt den Respiratorischen Quotienten:

$$RQ = \frac{CO_2 - \text{Abgabe}}{O_2 - \text{Aufnahme}}$$

Dieser ändert sich, je nachdem welches Substrat vom Körper bevorzugt verstoffwechselt wird. Da Fettsäuren weniger Sauerstoff enthalten als Kohlenhydrate, wird zu ihrer Oxidation mehr Sauerstoff benötigt. Demnach ist der RQ kleiner, je größer der Anteil an oxidierten Fettsäuren ist.

2.4.2 Euglykämischer und hyperglykämischer Clamp

Glukoselösung: Name: Glucosteril 20%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg,
Deutschland

Kochsalzlösung: Name: NaCl-Lösung 0,9%
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg,
Deutschland
Verwendung: Spüllösung

Insulin: Name: Insuman Rapid
Hersteller: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main, Deutschland
Insulinart: Normalinsulin

2.5 Analytik

2.5.1 Blutglukose

Der Plasmaglukosespiegel wurde jeweils direkt nach der Blutentnahme bestimmt.

Gerät: YSI 2300 STAT plus
Hersteller: Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA
Verfahren: Glukose-Oxidase-Methode

Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und bei 4°C und 4000 upm 7 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und bis zur weiteren Bestimmung bei -20°C eingefroren.

2.5.2 Insulin und C-Peptid

Die Bestimmung der Parameter Insulin und C-Peptid erfolgte aus dem Plasma.

<u>Insulin:</u>	Hersteller:	Abott Laboratories, Tokio, Japan
	Verfahren:	Microparticle Enzyme Immunoassay
<u>C-Peptid:</u>	Hersteller:	Byk-Sangtec, Dietzenbach, Deutschland
	Verfahren:	Radioimmunoassay

2.5.3 Indirekte Kalorimetrie

Gerät:	DELTATRAC II Metabolic Monitor
Hersteller:	Datex-Engstrom-Division, Instrumentarium Corp, Helsinki, Finnland
Verfahren:	Air-Dilution

2.5.4 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

2.5.5 Genotypisierung

Um das genetische Material der Probanden zu genotypisieren, wurden zuerst die DNA-Fragmente im Bereich des -866G/A Polymorphismus mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) vervielfacht. Die dabei verwendeten Primer waren: 5'-CAC GCT GCT TCT GCC AGG AC-3' (Kodierender Strang) und 5'-AGG CGT CAG GAG ATG GAC CG-3' (Komplementärstrang). Das Vorliegen des Polymorphismus in der Promotorregion von UCP2 wurde dann mit Hilfe bidirektionaler Sequenzierung untersucht.

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

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 OGTT

- Insulinsensitivität:

Geschätzt nach dem von Matsuda et al. vorgeschlagenen Index ISI_{est} [43]:

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

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

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

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

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

- 1. Phase der Insulinsekretion:

Geschätzt nach Stumvoll et al. [63]:

$$1. \text{ Phase} = 1283 + 1.829 \times \text{Ins}(30) - 138.7 \times \text{Gluc}(30) + 3.772 \times \text{Ins}(0)$$

- Disposition Index:

Disposition Index = 1. Phase der Insulinsekretion x Insulinsensitivität

2.6.3 Indirekte Kalorimetrie

Die Herleitung der Berechnungen zur indirekten Kalorimetrie wurde von Ferrannini beschrieben [20]. Die einzelnen Formeln stammen aus der DELTATRAC II Metabolic Monitor Geräteanleitung.

- Respiratorischer Quotient (RQ):

$$\text{RQ} = \frac{\text{CO}_2 - \text{Abgabe (ml/min)}}{\text{O}_2 - \text{Aufnahme (ml/min)}}$$

- Grundumsatz (Energy Production Rate):

$$\text{EPR (kcal/min)} = 5.50 \times \text{O}_2 - \text{Aufnahme} + 1.76 \times \text{CO}_2 - \text{Abgabe} - 1.99 \times \text{Stickstoffausscheidung im Urin (g/24h)}$$

- Lipidoxidation:

$$\text{LipidOx (g/24h)} = 2.432 \times \text{O}_2 - \text{Aufnahme} - 2.432 \times \text{CO}_2 - \text{Abgabe} - 1.943 \times \text{Stickstoffausscheidung im Urin (g/24h)}$$

- Kohlenhydratoxidation:

$$\text{KHOx (g/24h)} = 5.926 \times \text{CO}_2\text{- Abgabe} - 4.189 \times \text{O}_2\text{- Aufnahme} - 2.539 \times \text{Stickstoffausscheidung im Urin (g/24h)}$$

2.6.4 Hyperglykämischer Clamp

- Insulinsensitivität:

Berechnet als Insulinsensitivitätsindex für das Zeitintervall 80 min bis 120 min

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

- 1. Phase der Insulinsekretion:

1.Phase = Summe der Insulinkonzentrationen zu den Zeitpunkten 2.5 min, 5 min, 7.5 min und 10 min

- 2. Phase der Insulinsekretion:

2.Phase = mittlere Plasmainsulinkonzentration im Zeitintervall 60 min bis 120 min

- Disposition Index:

Disposition Index = 1. Phase der Insulinsekretion x Insulinsensitivitätsindex

2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwarepaket JMP (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Soweit nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Um für statistische Analysen annähernd eine Normalverteilung zu erhalten, sind nicht-normalverteilte Parameter logarithmiert worden. Statistische Vergleiche zwischen den Genotyp-Gruppen erfolgten mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA = Analysis of Variance).

Um für wichtige Kovariaten zu adjustieren und unabhängige Zusammenhänge zu identifizieren, wurden multivariate Regressionsanalysen durchgeführt. In der zweiten Kohorte, diejenige welche sich einem hyperglykämischen Clamp unterzog, wurden die Teilnehmer aus Tübingen und Utrecht zusammen analysiert, damit die Probandenanzahl nicht zu klein war. Das Zentrum, an dem der Clamp durchgeführt wurde, ging jedoch als Variable in die Analyse ein, so dass Unterschiede zwischen den Populationen detektiert werden konnten.

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

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der 1. Kohorte aus Tübingen

3.1.1 Oraler Glukosetoleranztest

Genotyp	GG	AG	AA	P**	P***
Anzahl (w/m)	198 (133/65)	254 (144/110)	77 (45/32)	0.07	0.7
Alter (Jahre)	36 ± 1	34 ± 1	39 ± 2	0.04	0.005
BMI (kg/m ²)	26.0 ± 0.4	26.1 ± 0.4	26.3 ± 0.6	0.83	0.54
WHR	0.84 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.21	0.16
Körperfett (%)	27.9 ± 0.7	27.0 ± 0.6	28.5 ± 1.2	0.66	0.56
Glukose basal (mmol/l)	4.85 ± 0.04	4.91 ± 0.04	5.05 ± 0.06	0.03	0.01
Glukose t=2h (mmol/l)	5.41 ± 0.08	5.27 ± 0.07	5.72 ± 0.14	0.01	0.01
Insulin basal (pmol/l)	50 ± 3	51 ± 3	52 ± 3	0.49	0.24
Insulin t=2h (pmol/l)	283 ± 16	279 ± 14	285 ± 22	0.77	0.47
ISI _{est} , OGTT	21.2 ± 0.8	21.0 ± 0.8	18.0 ± 1.1	0.13*	0.055*
1.Phase, OGTT (pmol/l)	1106 ± 42	1108 ± 37	1068 ± 57	0.92*	0.71*
Disposition index	20217 ± 669	19718 ± 647	16471 ± 898	0.087*	0.036*

WHR = Waist-to-hip-ratio

ISI_{est} = Matsuda-Index für Insulinsensitivität

1.Phase = 1.Phase der Insulinsekretion

* für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

** ANOVA

*** GG+GA versus AA

Tabelle 3.1: Ergebnisse des OGTT

Nach Abschluss der Genotypisierung findet sich eine Verteilung der Allel-Träger gemäß dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Anthropometrische Daten:

Weder beim Body-Mass-Index ($p=0.83$), noch bei der Waist-to-hip-ratio ($p=0.21$) oder dem prozentualen Körperfett ($p=0.66$) besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen.

Plasmaglukose:

Im oralen Glukosetoleranztest finden sich basal bei Trägern des A-Allels erhöhte Blutzuckerwerte ($p=0.03$).

Auch nach zwei Stunden haben Probanden mit dem Genotyp AA im Vergleich zum Wildtyp einen signifikant höheren Plasmaglukosespiegel ($p=0.01$).

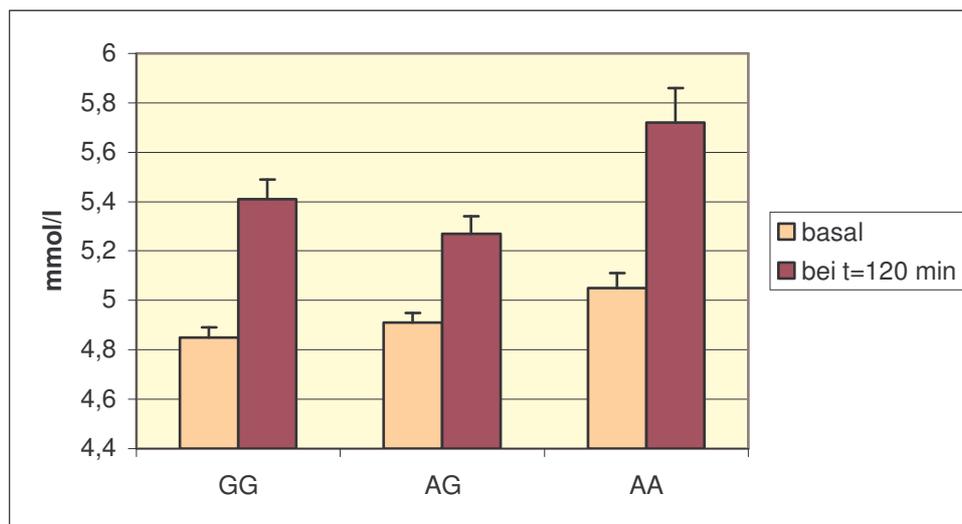


Abbildung 3.1: Plasmaglukose, OGTT

Plasmainsulin:

Beim Insulin hingegen sind weder basal noch nach zwei Stunden im OGTT Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen zu beobachten ($p=0.49$ basal und $p=0.77$ nach $t = 120$ min).

Insulinsensitivität:

Die Insulinsensitivität (geschätzt aus den Daten des OGTT als Matsuda-Index [43]) zeigt einen leicht niedrigeren Wert bei homozygoten Polymorphismusträgern im Vergleich zu Probanden mit GX-Genotyp, das heißt, sie sind etwas insulinresistenter. Dies verfehlt jedoch nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und BMI knapp die Signifikanz ($p=0.055$ bei AA vs. GA+GG).

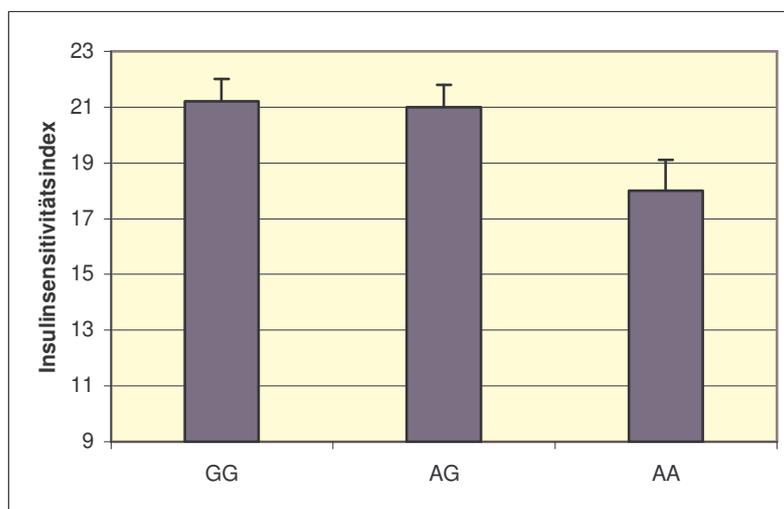


Abbildung 3.2: Insulinsensitivität, OGTT

Insulinsekretion:

Keine Differenz ergibt sich indessen bei der 1. Phase der Insulinsekretion, die aus dem OGTT nach Stumvoll et al. geschätzt wurde (s.o.): $p=0.92$ nach Anpassung an die Kovariaten Geschlecht, Alter und BMI.

Disposition Index:

Der Disposition Index berechnet sich, wie beschrieben, als Produkt aus 1. Phase der Insulinsekretion und Insulinsensitivität. Da letzterer bei AA-Allel-Trägern etwas geringer ist, die Sekretion aber nicht entsprechend erhöht, zeigt sich auch beim Disposition Index ein Unterschied, der in diesem Fall signifikant ist ($p=0.036$ bei AA vs. GX, adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI).

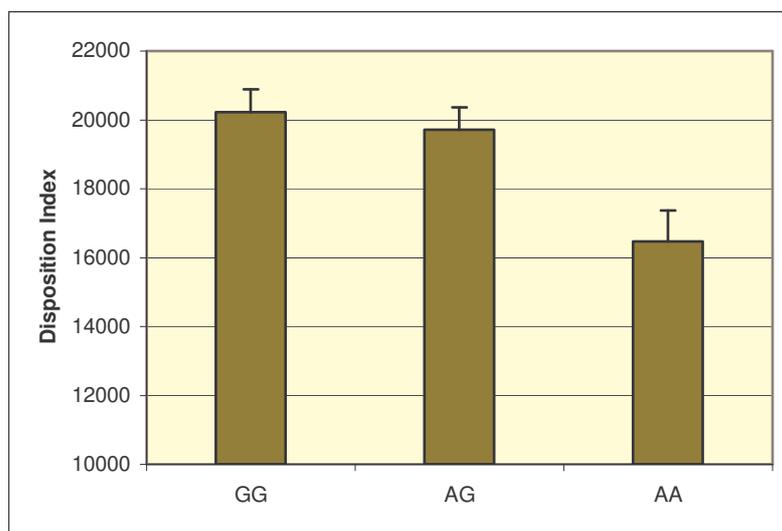


Abbildung 3.3: Disposition Index, OGTT

3.1.2 Euglykämischer Clamp und Kalorimetrie

Von den 529 NGT Probanden der ersten Kohorte aus Tübingen nahmen 141 zusätzlich zum OGTT an einem euglykämischen, hyperinsulinämischen Clamp teil. Dabei wurde zu Beginn und im steady state nach Insulinstimulation eine indirekte Kalorimetrie durchgeführt.

Genotyp	GG	AG	AA	P**	P***
Anzahl (w/m)	54 (31/23)	74 (32/42)	13 (9/4)	0.11	0.24
Alter (Jahre)	32 ± 1	32 ± 1	38 ± 2	0.07	0.02
BMI (kg/m ²)	24.8 ± 0.6	24.8 ± 0.6	26.6 ± 1.4	0.41	0.18
WHR	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.84 ± 0.02	0.65	0.77
Körperfett (%)	23.9 ± 1.3	23.6 ± 0.9	29.6 ± 2.8	0.18	0.07
RQ basal	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.39	0.17
RQ insulin	0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.87	0.92
RQ delta	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.4	0.2
Grundumsatz basal	1710 ± 37	1763 ± 36	1644 ± 56	0.37	0.29
Grundumsatz Insulin	1764 ± 39	1850 ± 37	1690 ± 50	0.12	0.19
Grundumsatz delta	54 ± 21	88 ± 17	46 ± 21	0.4	0.61
LipidOx basal (g/24h)	77 ± 5	79 ± 5	61 ± 7	0.66	0.4
LipidOx Insulin (g/24h)	42 ± 5	48 ± 4	40 ± 9	0.56	0.37
LipidOx delta (g/24h)	- 34 ± 4	- 31 ± 4	- 21 ± 9	0.61	0.63
KHOx basal (g/24h)	161 ± 11	166 ± 10	198 ± 15	0.25	0.1
KHOx Insulin (g/24h)	253 ± 12	263 ± 10	233 ± 24	0.55	0.41
KHOx delta (g/24h)	92 ± 12	96 ± 10	35 ± 28	0.07*	0.03*

WHR = Waist-to-hip-ratio

Grundumsatz in kcal/24h angegeben

RQ = Respiratorischer Quotient

RQ>1 ausgeschlossen

LipidOx = Lipidoxidation

KHOx = Kohlenhydratoxidation

* für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

** ANOVA

*** GG+GA versus AA

Tabelle 3.2: Ergebnisse der indirekten Kalorimetrie

Respiratorischer Quotient:

Der Respiratorische Quotient (RQ) berechnet sich, wie oben aufgeführt, als CO_2 -Produktion dividiert durch O_2 -Verbrauch. Bei ausschließlicher Kohlenhydratverstoffwechslung ergibt der RQ den Wert 1, bei der Lipidoxidation findet sich aufgrund des erhöhten Sauerstoff-Verbrauchs ein RQ kleiner 1 (siehe Kapitel 2.3.4).

In unserer Untersuchung liegt er basal bei 0.84 ± 0.01 (GG), 0.84 ± 0.01 (GA) und 0.86 ± 0.01 (AA), $p=0.39$, und erhöht sich in allen 3 Genotypen auf 0.90 ± 0.01 ($p=0.87$). Da bei homozygoten Trägern des -866G/A Polymorphismus die Glukoseoxidationsrate unter Insulinstimulation nicht so stark ansteigt (s.u.), erhöht sich der RQ auch etwas weniger als beim GX Genotyp. Delta RQ, also die Differenz, zeigt dennoch keine Signifikanz: $p=0.4$ bei ANOVA und $p=0.2$ bei AA versus GA+GG.

Energie-Grundumsatz:

Mit der indirekten Kalorimetrie kann man unter anderem auch den Energie-Grundumsatz der Probanden bestimmen. Dabei ergeben sich bei der basalen Messung vor Beginn des Clamps keine Unterschiede zwischen den Genotypen ($p=0.37$).

Nach Änderung der Substratoxidationsrate (s.u.) durch Stimulation mit Insulin und Gabe von Glukose erhöht sich der Grundumsatz, die Werte weisen aber weiterhin keine Signifikanz auf ($p=0.12$), ebenso wenig die Differenz Grundumsatz nach Insulingabe minus Grundumsatz basal ($p=0.4$).

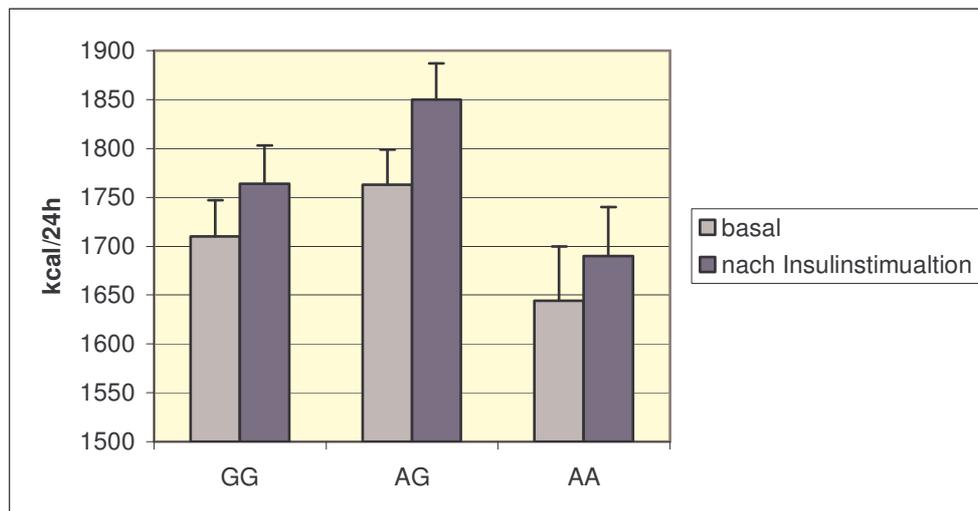


Abbildung 3.4: Energie-Grundumsatz

Lipidoxidation:

Sowohl die basale Lipidoxidationsrate als auch die unter Hyperinsulinämie und somit auch die Differenz, zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (basal: $p=0.66$, nach Insulinstimulation: $p=0.56$, Differenz: $p=0.61$).

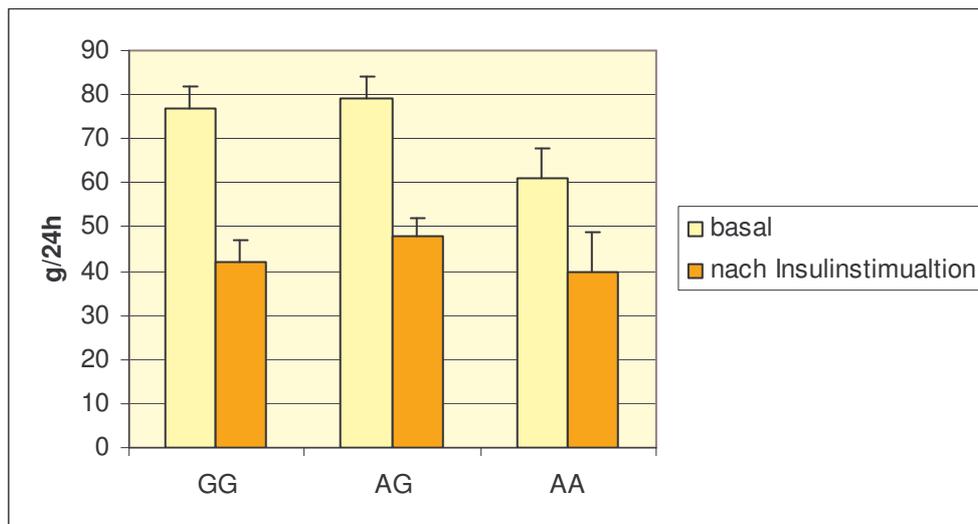


Abbildung 3.5: Lipidoxidation

Kohlenhydratoxidation:

Im Nüchternzustand werden weniger Kohlenhydrate oxidiert als Fette. Die Umsatzrate steigt jedoch, wenn mehr Glukose zur Verfügung steht und durch Insulin die Enzyme des Glukoseabbaus stimuliert werden.

Es zeigt sich, dass homozygote Träger des A-Allels eine deutlich geringere Steigerung der Kohlenhydratoxidation von nur 35 ± 28 g/24h aufweisen, im Gegensatz zu 92 ± 12 g/24h (GG) und 96 ± 10 g/24h (GA) ($p=0.03$ bei AA vs. GX nach Adjustierung für Geschlecht, Alter und BMI). Einerseits haben sie eine etwas höhere basale Oxidationsrate, andererseits eine leicht niedrigere Kohlenhydratverstoffwechselung unter Insulinstimulation. Beides ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0.1$ und $p=0.41$ bei AA vs. GX).

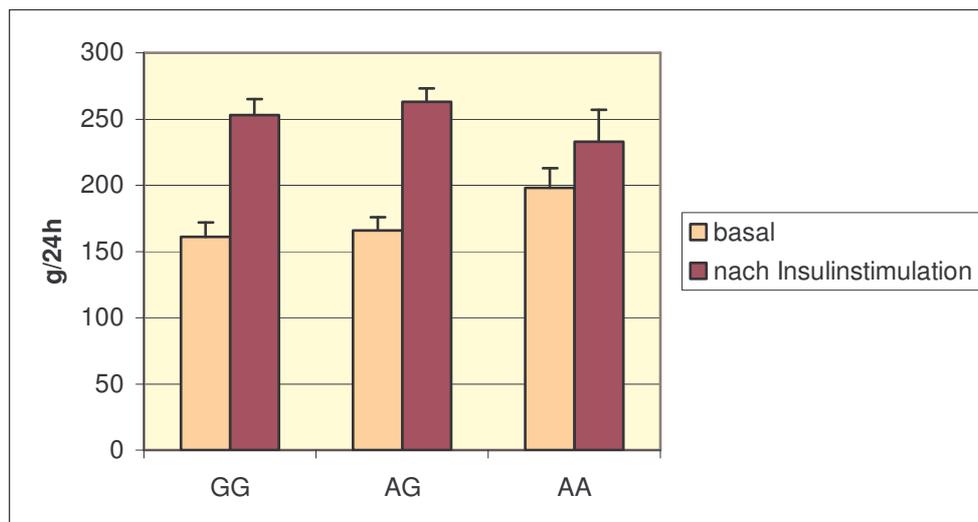


Abbildung 3.6: Kohlenhydratoxidation, Steigerung der KHOx nach Insulinstimulation:

$$p_{\text{KHOx delta}} = 0.03$$

3.2 Ergebnisse der 2. Kohorte aus Tübingen und Utrecht

3.2.1 OGTT-Charakteristika der Clamp-Teilnehmer

Genotyp	GG	AG	AA	P**
Anzahl (w/m)	42 (25/17)	52 (26/26)	28 (18/10)	0.42
NGT / IGT	32 / 10	31 / 21	22 / 6	0.11
Alter (Jahre)	37 ± 2	39 ± 2	43 ± 3	0.19
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 0.6	25.7 ± 0.8	24.3 ± 1.0	0.40
WHR	0.84 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.41
Glukose basal, OGTT (mmol/l)	5.0 ± 0.1	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	0.57
Glukose t=2h, OGTT (mmol/l)	6.4 ± 0.3	6.9 ± 0.3	6.3 ± 0.4	0.36
Insulin basal, OGTT (pmol/l)	54 ± 5	62 ± 8	47 ± 5	0.49
Insulin t=2h, OGTT (pmol/l)	269 ± 23	470 ± 10	297 ± 57	0.15

NGT = normal glukosetolerant / IGT = eingeschränkt glukosetolerant

WHR = Waist-to-hip-ratio

* für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

** ANOVA

**Tabelle 3.3: OGTT-Charakteristika aus Tübingen (Deutschland),
Teilnehmer am hyperglykämischen Clamp**

3 ERGEBNISSE

	GG	AG	AA	P**
Anzahl (w/m)	30 (19/11)	35 (27/8)	14 (13/1)	0.08
NGT / IGT	24 / 6	30 / 5	13 / 1	0.50
Alter (Jahre)	47 ± 1	46 ± 1	46 ± 2	0.96
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 0.8	25.4 ± 0.6	26.2 ± 0.8	0.52
WHR	0.84 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.21
Glukose basal, OGTT (mmol/l)	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.9 ± 0.1	0.22
Glukose t=2h, OGTT (mmol/l)	6.3 ± 0.4	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.3	0.94
Insulin basal, OGTT (pmol/l)	50 ± 7	39 ± 3	37 ± 3	0.39
Insulin t=2h, OGTT (pmol/l)	280 ± 42	344 ± 50	246 ± 28	0.67

NGT = normal glukosetolerant / IGT = eingeschränkt glukosetolerant

WHR = Waist-to-hip-ratio

* für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

** ANOVA

**Tabelle 3.4: OGTT-Charakteristika aus Utrecht (Niederlanden),
Teilnehmer am hyperglykämischen Clamp**

In beiden Kohorten ist die Verteilung der Genotypen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (alle p-Werte > 0.3, Chiquadrat-Test).

Anthropometrische Daten, Plasmaglukose und Plasmainsulin:

Body-Mass-Index, Waist-to-hip-ratio, Plasmaglukose (basal und nach 2 Stunden im OGTT) sowie Plasmainsulin (basal und nach 2 Stunden) unterscheiden sich weder in Tübingen noch in Utrecht signifikant zwischen den Genotyp-Gruppen (alle p-Werte > 0.15).

3.2.2 Hyperglykämischer Clamp

	GG	AG	AA	P**
Insulinsensitivitätsindex	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.20*
1.Phase (pmol/l)	809 ± 100	1037 ± 89	892 ± 122	0.37*
2.Phase (pmol/l)	263 ± 22	354 ± 47	242 ± 24	0.57*
Disposition index	105 ± 9	102 ± 8	175 ± 15	0.12

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

* für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

**ANOVA

Tabelle 3.5: Clamp-Ergebnisse aus Tübingen (Deutschland)

	GG	AG	AA	P**
Insulinsensitivitätsindex	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.09*
1.Phase (pmol/l)	777 ± 79	950 ± 65	1206 ± 192	0.01*
2.Phase (pmol/l)	333 ± 42	430 ± 43	364 ± 66	0.04*
Disposition index	130 ± 15	136 ± 11	167 ± 19	0.13

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

* für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert

**ANOVA

Tabelle 3.6: Clamp-Ergebnisse aus Utrecht (Niederlanden)

Insulinsensitivität:

Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, wurde während des hyperglykämischen Clamps der Blutzuckerspiegel mittels einer individuellen Glukoseinfusion auf 10 mmol/l gehalten. Der Insulinsensitivitätsindex berechnet sich dann als Quotient aus mittlerer Glukoseinfusionsrate und mittlerer Plasmainsulinkonzentration im Zeitintervall von t = 80 min bis t = 120 min. Es ergibt sich kein Unterschied zwischen den Genotyp-Gruppen, weder in der Kohorte aus Tübingen (p=0.2) noch in der aus Utrecht (p=0.09). Die Werte wurden für Geschlecht, Alter und BMI adjustiert.

Insulinsekretion:

In Tübingen ergibt sich bei der 1. Phase der Insulinsekretion (also die Summe der Insulinkonzentrationen zu den Zeitpunkten 2.5 min, 5 min, 7.5 min und 10 min) keine Signifikanz ($p=0.37$ nach Korrektur für die Kovariaten Geschlecht, Alter und BMI).

In Utrecht zeigt sich jedoch eine deutlich höhere Sekretion bei Trägern des -866G/A Polymorphismus im Gegensatz zu Wildtyp-Allelträgern: 777 ± 79 pmol/l (GG), 905 ± 65 pmol/l (AG), 1206 ± 192 pmol/l (AA). Nach Korrektur für die Kovariaten Geschlecht, Alter und BMI ist dieser Unterschied signifikant ($p=0.01$, ANOVA).

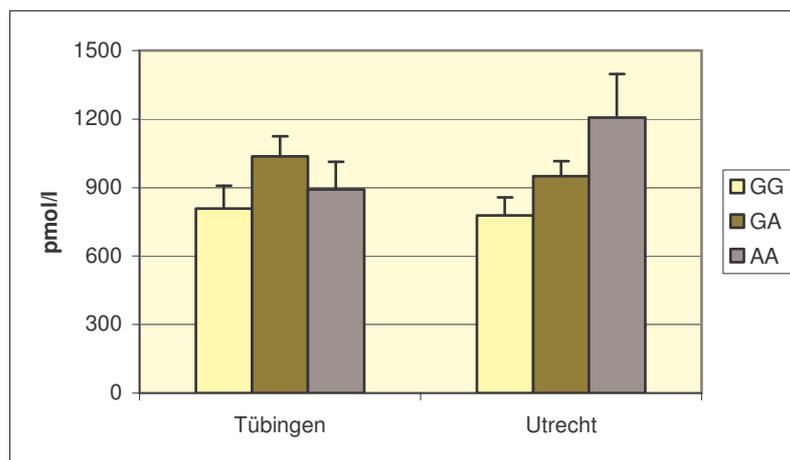


Abbildung 3.7: 1. Phase der Insulinsekretion, hyperglykämischer Clamp

Bei der 2. Phase der Insulinsekretion, berechnet als der Mittelwert der Insulinkonzentrationen im Zeitintervall $t = 60$ min und $t = 120$ min, kann in Tübingen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0.57$, adjustiert für Geschlecht, Alter und BMI), während in der Utrechter Population eine geringe Differenz nachzuweisen ist ($p=0.04$ nach Anpassung an die Kovariaten Geschlecht, Alter und BMI).

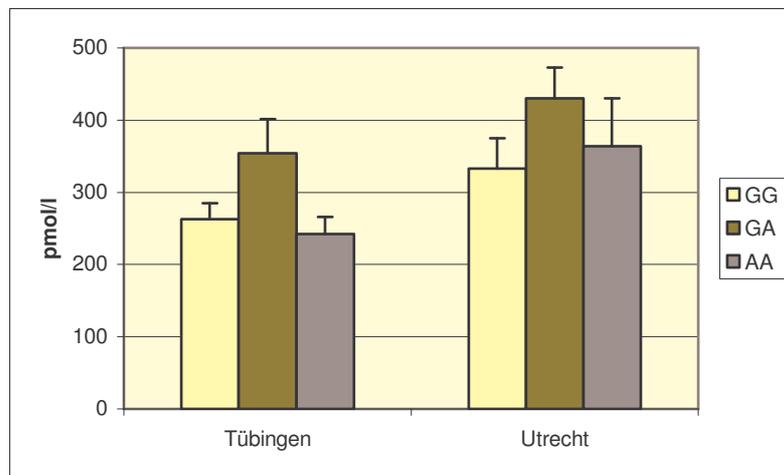


Abbildung 3.8: 2. Phase der Insulinsekretion, hyperglykämischer Clamp

Disposition Index:

Der Disposition Index (1. Phase der Insulinsekretion \times ISI) zeigt weder in Tübingen noch in Utrecht eine statistische Signifikanz ($p=0.12$ in Tübingen und $p=0.13$ in Utrecht). Die etwas höhere Sekretion der A-Allel-Träger aus Utrecht spiegelt sich jedoch auch in einem leicht höheren Disposition Index wider: 167 ± 19 (AA) vs. 136 ± 11 (AG) und 130 ± 15 (GG).

3.2.3 Multivariate Regressionsanalyse

Um die Effekte des -866G/A Polymorphismus weiter zu spezifizieren, haben wir multivariate Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden die Einflüsse, die BMI, Alter, Insulinsensitivität, Zentrum, an dem der hyperglykämische Clamp durchgeführt wurde, und UCP2-Polymorphismus auf die Insulinsekretion haben, unabhängig voneinander erfasst.

Modell $r^2 = 0.65$, $p < 0.0001$ (n=201)

Unabhängige Variable	Sum of Squares	F Ratio	P
BMI	0.3429002	1.4379	0.2320
Alter	3.3449111	14.0263	0.0002
Insulinsensitivität (ISI)	8.0467498	33.7427	<.0001
Zentrum (Tü vs. Utr)	2.3036435	9.6599	0.0022
UCP2	2.9069665	6.0949	0.0027

Tabelle 3.7: Regressionsanalyse Tübingen+Utrecht (1.Phase der Insulinsekretion)

Es zeigt sich auch hier wiederum der Zusammenhang zwischen dem -866G/A Polymorphismus und der ersten Phase der Insulinsekretion ($p=0.0027$). Der bei der Analyse vorhandene Zentrumseffekt ($p=0.0022$) bestätigt die Tatsache, dass dieser Zusammenhang nur in Utrecht, nicht jedoch in Tübingen zu beobachten war.

Abbildung 3.9 zeigt die Zusammenhänge aus der multivariaten Regressionsanalyse nochmals grafisch. Insgesamt findet sich nach Adjustierung für BMI, Alter, Insulinsensitivität und Zentrum eine signifikant höhere Insulinsekretion bei Trägern des A-Allels des -866G/A Polymorphismus ($p=0.0027$).

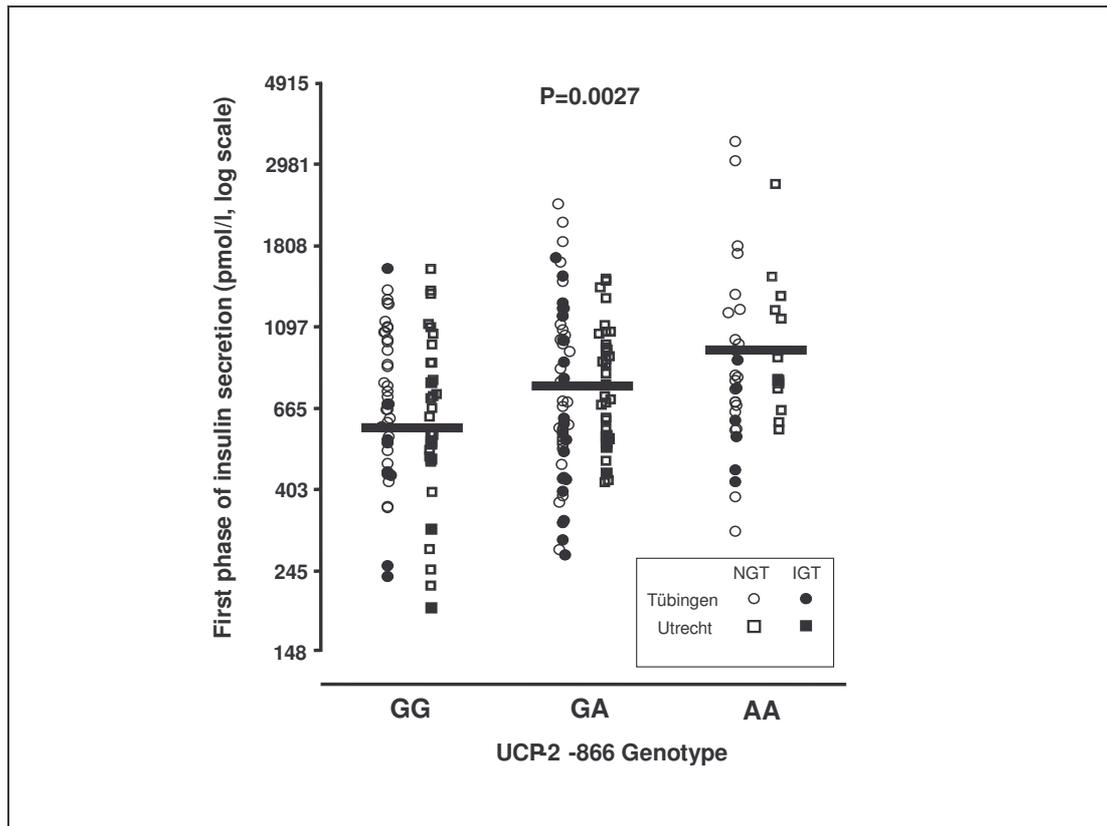


Abbildung 3.9: 1. Phase der Insulinsekretion, einzelne Werte der Probanden

4 Diskussion

4.1 UCP2: Kandidatengen für Diabetes mellitus Typ 2

Bei der Suche nach genetischen Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2 hat sich das Uncoupling Protein 2-Gen als interessantes Kandidaten-Gen herausgestellt. In der Promotorregion dieses Gens wurde der -866G/A Polymorphismus gefunden, der Assoziationen zum Diabetes mellitus Typ 2 und den damit verbundenen metabolischen Störungen zeigt. Die bisherigen Studien widersprechen sich in der Aussage hinsichtlich welches Allel welche Veränderungen hervorruft, die Mehrheit jedoch findet einen Zusammenhang des A-Allels zum Typ 2 Diabetes [12; 36; 58; 59]. Allerdings zeigen andere Studien, wie z.B. die große, so genannte „Botnia-Studie“ aus Schweden und Finnland, dass das G-Allel ein 9-fach erhöhtes Risiko für einen früh manifestierten Typ 2 Diabetes impliziert [10; 67].

Wir haben deswegen in einer Phänotyp-Genotyp-Assoziationsstudie in verschiedenen Populationen die Auswirkungen des Polymorphismus auf anthropometrische Daten, Glukosetoleranz, Insulinsensitivität, Kohlenhydratoxidation und Insulinsekretion untersucht.

Es fand sich in einem großen Kollektiv von 529 nicht-diabetischen Probanden aus dem süddeutschen Raum bei Trägern des A-Allels im OGTT eine schlechtere Glukosetoleranz und eine schlechtere Insulinsensitivität sowie eine verschlechterte Kohlenhydratoxidation bei der indirekten Kalorimetrie. Die Insulinsekretion relativ zur Insulinsensitivität, berechnet als Disposition Index, war im oralen Glukosetoleranztest ebenfalls vermindert.

Um die Insulinsekretion etwas besser zu quantifizieren, haben wir in Kollaboration mit einer niederländischen Arbeitsgruppe zusätzlich einen hyper-

glykämischen Clamp durchgeführt, eine Untersuchung mit einer besonders aufwendigen Technik.

Hierbei zeigte sich in der Tübinger Kohorte kein Einfluss des Polymorphismus auf die Insulinsekretion, in der Kohorte aus Utrecht ging das A-Allel allerdings mit einer besseren Insulinsekretion einher.

4.2 -866G/A Polymorphismus und anthropometrische Daten

Bei den Untersuchungen der Tübinger Familienstudie (n=529) lässt sich keine Assoziationen zwischen dem -866G/A Polymorphismus und dem Body-Mass-Index, der Waist-to-hip-ratio und dem Körperfett in Prozentanteilen feststellen. Dieses Resultat bestätigt eine vergleichbare Studie an französischen Kindern [38] sowie eine japanische [58] und eine dänische Studie [13], steht jedoch im Gegensatz zu anderen Forschungsarbeiten, welche einen deutlichen Zusammenhang des A-Allels mit einem reduzierten Adipositas-Risiko finden [18; 36].

Diese konträren Ergebnisse könnten durch die Tatsache erklärt werden, dass unterschiedliche Populationen untersucht worden sind, so besteht die Kohorte von Esterbauer et al. [18] aus Probanden im Alter von 40-55 Jahren, wohingegen in der Tübinger Familienstudie vorwiegend Teilnehmer zwischen 35-40 Jahren untersucht wurden. Die Arbeit von Krempler et al. [36] beinhaltete die Untersuchung von deutlich Übergewichtigen mit einem BMI von 35-40 kg/m², die Probanden der Tübinger Familienstudie hatten einen mittleren BMI von 26 kg/m². Gerade bei Untersuchungen von genetischen Ursachen für die Körperfettzusammensetzung sind Gen-Umwelt-Interaktionen sehr wichtig [60].

Des Weiteren könnte die Art der Untersuchung eine Rolle spielen: Durch die Fall-Kontroll-Studie von Esterbauer et al. wurden beispielsweise Probandenpaare gebildet, die sich nur im BMI unterschieden; die von uns durchgeführte Phänotyp-Genotyp-Assoziationsstudie ist dagegen eine Querschnittsuntersuchung.

4.3 -866G/A Polymorphismus und Plasma­glukose

In der großen süddeutschen Kohorte der Tübinger Familienstudie, die mit einem oralen Glukosetoleranztest untersucht wurde, findet sich bei Trägern des A-Allels sowohl im Nüchternzustand als auch nach zwei Stunden im OGTT ein signifikant höherer Blutzuckerspiegel. Diese eingeschränkte Glukosetoleranz bestätigt Ergebnisse von Studien, die einen Zusammenhang der Mutation mit Diabetes mellitus Typ 2 zeigen [12; 36; 58; 59]. Allerdings ist in diesen Studien zu berücksichtigen, dass immer nur für Untergruppen eine Assoziation mit Diabetes gefunden worden ist. So können D'Adamo et al. ein mit dem A-Allel verbundenes erhöhtes Diabetes-Risiko nur bei Frauen nachweisen, Krempler et al. nur bei adipösen Probanden [12; 36].

4.4 -866G/A Polymorphismus und Insulinsensitivität

In einigen der vorausgehenden Studien findet sich bei Trägern des A-Allels des -866G/A Polymorphismus-Trägern im Vergleich zum Wild-Genotyp eine schlechtere Insulinsensitivität [12; 36]. Die Ergebnisse der Tübinger Familienstudie weisen in dieselbe Richtung: Mit einem p-Wert von 0.055 (AA vs. GX) verfehlt die Insulinsensitivität, geschätzt als Matsuda-Index aus dem oralen Glukosetoleranztest, hier zwar knapp die Signifikanz, die Tendenz zum insulinresistenteren A-Allel ist jedoch erkennbar.

4.5 -866G/A Polymorphismus und Kohlenhydratoxidation

Im Nüchternzustand werden vom Menschen die körpereigenen Fettreserven verbraucht, und neben Proteinen und Kohlenhydraten werden Lipide als Energiequelle oxidiert. Postprandial wird überwiegend auf Kohlenhydratverstoffwech­selung umgestellt. Dieser Wechsel in der Substratoxidation kann eine Rolle beim Diabetes mellitus Typ 2 spielen: Wird nämlich nicht ausreichend auf Kohlenhydratoxidation umgeschaltet, bleibt die Glukoseverwertung trotz erhöhtem Angebot gering und der Blutzucker steigt. Bekannt ist dieser Effekt

beispielsweise beim Pro12Ala Polymorphismus des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor γ_2 (PPAR γ_2): Männliche Träger des Ala-Allels unterdrücken postprandial die Lipidoxidation besser und verwerten gleichzeitig mehr Glukose als männliche homozygote Pro-Träger. Sie sind dadurch insulinsensibler [65].

Wir haben die verschiedenen Genotypen-Träger des -866G/A Polymorphismus mit Hilfe einer indirekten Kalorimetrie hinsichtlich ihrer Substratoxidationsraten untersucht und zwar sowohl im Nüchternzustand als auch nach Insulin- und Glukoseinfusion im hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp.

Es zeigt sich, dass das A-Allel einhergeht mit einer geringeren Steigerung der Kohlenhydratoxidationsrate, das heißt, während der Hyperinsulinämie wird vom AA-Genotyp weniger Glukose verstoffwechselt als von den GX-Allel-Trägern. Dieser Effekt könnte zu der schlechteren Glukosetoleranz der Mutationsträger beitragen: Durch die geringere Glukoseverwertung ist der Blutzuckerspiegel höher als bei den Vergleichsgruppen.

Eine französische Studie an adipösen Kindern, die ebenfalls die Auswirkung des -866G/A Polymorphismus auf die Substratoxidationsraten untersucht hat, findet das A-Allel assoziiert mit einer vermehrten Kohlenhydratoxidation und einer verminderten Lipidoxidation, beides im basalen Zustand [38].

Der Effekt der Tübinger Familienstudie hinsichtlich der Kohlenhydratoxidation kommt zum einen dadurch zustande, dass die absolute Oxidationsrate während der Hyperinsulinämie beim AA-Genotyp kleiner ist, zum anderen aber auch dadurch, dass im Nüchternzustand schon mehr Kohlenhydrate umgesetzt werden. Diese Gegebenheit deckt sich also mit der französischen Studie. Es wäre interessant gewesen, zu erfahren, inwiefern sich die adipösen Kinder nach Insulinstimulation im euglykämischen Clamp unterschieden hätten.

Es zeigt sich allerdings in der Tübinger Population kein Einfluss des UCP2-Polymorphismus auf die Lipidoxidation. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier statt stark adipöser Kinder (BMI ca. 29 kg/m²) Erwachsene untersucht wurden, die nur leicht übergewichtig waren (BMI ca. 26 kg/m²).

4.6 -866G/A Polymorphismus und Insulinsekretion

4.6.1 Tübinger Familienstudie, süddeutsche Population: OGTT

Die aus dem oralen Glukosetoleranztest nach Stumvoll et al. [63] geschätzten Insulinsekretionen der verschiedenen Genotypen des Polymorphismus unterscheiden sich in den absoluten Zahlen nicht signifikant.

Die Sekretion hängt jedoch von der Insulinsensitivität ab, verschiedentlich wurde von Studien ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Insulinsekretion gezeigt [4; 33; 50]. Der Disposition Index setzt diese zwei Parameter zueinander in Beziehung: Das Produkt aus Insulinsensitivität und Insulinsekretion (eben der Disposition Index) ist bei Gesunden normalerweise konstant. Wird also die Sensitivität schlechter, steigt reaktiv die Sekretion; erst wenn dann die Sekretion nachlässt, wird der Organismus eingeschränkt glukosetolerant [2].

In den Genotyp-Gruppen der Tübinger Population ist also die absolute Insulinsekretion nicht verschieden, jedoch der Disposition Index ist bei homozygoten Polymorphismus-Trägern kleiner als bei Probanden mit dem Wildtyp, das heißt, die Insulinsekretion relativ zur verschlechterten Insulinsensitivität ist eingeschränkt. Mit anderen Worten bedeutet dies, dass die A-Allel-Träger ihre leicht verminderte Insulinsensitivität nicht adäquat mit gesteigerter Insulinsekretion ausgleichen können.

Das Ergebnis einer mit dem A-Allel verbundenen relativ verschlechterten Insulinsekretion ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Gruppe um Sesti et al., die ebenfalls eine eingeschränkte Insulinsekretion bei homozygoten Trägern der Mutation gefunden haben [59]. Neben der Untersuchung von 301 Probanden mittels des oralen Glukosetoleranztests hatte diese Arbeitsgruppe die Möglichkeit, isolierte Pankreas-Inselzellen zu analysieren. Nach Stimulation mit Glukose, Glyburid (eine Substanz aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe) und Arginin zeigte sich bei Inselzellen von Spendern mit A-Allel eine verminderte Sekretion im Gegensatz zu Spenderzellen von homozygoten Wildtyp-Trägern.

Damit bestätigten sich die Ergebnisse aus dem vorausgehenden OGTT. Trotz der kleinen Anzahl an Pankreazellen (insgesamt 10 Spender) geben diese Funde einen Hinweis auf die Assoziation des A-Allels des -866G/A Polymorphismus mit einer eingeschränkten Insulinsekretion.

Eine japanische Gruppe (Sasahara et al, [58]) beschäftigte sich mit der Tatsache, dass in der japanischen Bevölkerung einerseits Adipositas und die Insulinsekretionskapazität geringer ist als bei Kaukasiern, andererseits das A-Allel des -866G/A Polymorphismus häufiger vorkommt. Sie konnten nachweisen, dass unter Diabetikern A-Allel-Träger früher manifest werden und bis zu 20% häufiger Insulin benötigen. In einem intravenösen Glukosetoleranztest fanden sie eine signifikant niedrigere Insulinsekretion bei Trägern der Mutation und sahen damit das vorherige Ergebnis erklärt.

4.6.2 Kollaborationsstudie: Hyperglykämischer Clamp

Der orale Glukosetoleranztest gilt nicht als der Goldstandard, um die Insulinsekretion zu untersuchen [62]. Dies wird damit begründet, dass im OGTT kein reproduzierbar gleicher Glukosereiz zur Stimulierung der Insulinsekretion gegeben wird. Vielmehr ist der Blutzucker während des Tests interindividuell verschieden hoch und verändert sich zudem noch ständig während des Versuchs.

Um eine bessere Quantifizierung zu erhalten und weil andere Studien, wie zum Teil oben schon beschrieben, ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem A-Allel des -866G/A Polymorphismus und einer eingeschränkten Insulinsekretion gefunden haben [36; 58; 59], haben wir eine zweite Gruppe von Probanden mit dem aufwendigen hyperglykämischen Clamp untersucht, bei dem jeder Proband über zwei Stunden einem Blutzucker von 10 mmol/l ausgesetzt wird und dabei die Insulinsekretion gemessen wird. Dieser Clamp gilt als die beste Methode zur Untersuchung der Insulinsekretion [62]. Zudem haben wir diesen hyperglykämischen Clamp in Zusammenarbeit mit einer niederländischen

Arbeitsgruppe durchgeführt, um die Ergebnisse mit einer zweiten Population vergleichen zu können.

In Tübingen ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem -866G/A Polymorphismus und der Insulinsekretion feststellen, bei den niederländischen Probanden hingegen fand sich sogar eine bessere Sekretion der A-Allel-Träger im Vergleich zum Wildtyp. In der kombinierten Analyse von süddeutschen und niederländischen Probanden blieb die Assoziation des A-Allels mit verstärkter Insulinsekretion ebenfalls erhalten (siehe Abbildung 3.8 und Tabelle 3.7).

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild aus den Untersuchungen:

	OGTT-Kohorte Tübinger Familienstudie, (n=529)	Kalorimetrie-Kohorte Tübinger Familienstudie, (n=141)	Hyperglykämischer Clamp-Kohorte süddeutsche (n=122) und niederländische (n=79) Probanden
A-Allel assoziiert mit	<ul style="list-style-type: none"> • erhöhtem postprandialen Blutzucker • verminderter Insulinsensitivität • reduzierter Insulinsekretion relativ zur Insulinsensitivität 	verminderte Steigerung der Kohlenhydratoxidation unter Hyperinsulinämie	verstärkte Insulinsekretion
Bedeutung für Metabolismus	erhöhtes Diabetes-Risiko	erhöhtes Diabetes-Risiko	vermindertes Diabetes-Risiko

Somit zeigt sich ein widersprüchliches Bild: Wir finden in unserer süddeutschen OGTT-Kohorte eine Konstellation, die eher für ein erhöhtes Diabetes-Risiko bei A-Allel-Trägern spricht. Der Hauptfaktor scheint hier eine herabgesetzte Insulinsensitivität mit verminderter Kohlenhydratoxidation zu sein, die nicht durch

Verstärkung der Insulinsekretion ausgeglichen werden kann. Bei den 201 Probanden, die sich einem hyperglykämischen Clamp unterzogen, zeigt sich eher das G-Allel mit einem erhöhten Diabetes-Risiko verknüpft, da die Insulinsekretion hier gegenüber den A-Allel-Trägern herabgesetzt ist. Für dieses Ergebnis ist hauptsächlich die Kohorte aus den Niederlanden verantwortlich.

Zu diesem uneinheitlichen Bild passend sind Befunde aus der Literatur, die sowohl für das G-Allel [10; 67] als auch für das A-Allel ein erhöhtes Diabetes-Risiko zeigen [12; 36; 58; 59].

Für die unterschiedlichen Ergebnisse in unserer Phänotyp-Genotyp-Assoziationsstudie sind nun folgende Gründe denkbar:

1.) Unterschiedlicher genetischer Hintergrund

Die Probanden aus Utrecht gehören einer anderen Population an und könnten deshalb anders reagieren, ein Zentrumseffekt war bei der multivariaten Regressionsanalyse ganz deutlich vorhanden. Obwohl die Niederländer ebenfalls Mitteleuropäer sind und sich wohl kaum genetisch von unserer Bevölkerung unterscheiden, könnten zufällige Unterschiede in der Verteilung zusätzlicher Risikogene für Diabetes mellitus eine Rolle spielen. So scheint für das durch den -866G/A Polymorphismus vermittelte Diabetes-Risiko das Vorhandensein des PPAR γ_2 Pro12Ala Polymorphismus eine Rolle zu spielen: Bulotta et al. finden das G-Allel nur vor dem Hintergrund des PPAR γ_2 Pro12Pro Genotyps mit einem erhöhten Diabetes-Risiko assoziiert [10].

Wang et al. haben in ihrer Arbeit nicht nur die Auswirkungen des -866G/A Polymorphismus untersucht, sondern die Interaktionen mehrerer Genvarianten im UCP2-Gen erforscht [69]: Neben dem -866G/A Polymorphismus in der Promotorregion wurde die Ala55Val-Variante in Exon 4 und die 45 bp Insertion/Deletion-Variante in der 3' nicht translatierten Region (3'UTR I/D) von Exon 8 des UCP2-Gens auf Assoziationen mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 untersucht. Es zeigte sich, wenn auch nur sehr diskret, eine erhöhte Insulin-

sekretion bei Trägern des A-Allels des -866G/A Polymorphismus. Besonders aber bei der Betrachtung der drei Polymorphismen in Kombination finden Wang et al. Belege dafür, dass die verschiedenen Haplotypen (d.h. die Komplexe der gekoppelten Allele) den BMI, die Insulinsekretion, den Triglycerid-Spiegel und das Diabetes-Risiko beeinflussen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass verschiedene Genvarianten miteinander interagieren und dass sich einzelne Polymorphismen bei verschiedenem genetischem Hintergrund unterschiedlich auswirken können. Bei den kleinsten Effekten, die von solchen Mutationen verursacht werden, sollte die Gen-Gen-Interaktion immer mit in Betracht gezogen werden.

2.) Unterschiedliche Gen-Umwelt-Interaktionen

Von einigen Polymorphismen ist bekannt, dass sie sich abhängig vom Gewicht des Trägers ganz unterschiedlich verhalten. So ist der Gly1057Asp Polymorphismus im Insulinrezeptorsubstrat-2 (IRS-2) bei schlanken Personen mit einem verminderten Diabetes-Risiko verknüpft, während er bei übergewichtigen Probanden mit einer eingeschränkten Insulinsekretion und folglich mit einem Diabetes mellitus Typ 2 einhergeht [61]. Ähnliche Phänomene könnten auch beim -866G/A Polymorphismus eine Rolle spielen, die Effekte könnten je nach Subpopulation (also ob Männer oder Frauen, schlanke oder adipöse bzw. alte oder junge Personen etc. untersucht worden sind) verschieden sein. Beispielsweise waren die Probanden aus Utrecht im Schnitt etwa 10 Jahre älter als die Teilnehmer aus dem süddeutschen Raum. Auch Gen-Umwelt-Interaktionen sind bei genetischen Analysen immer mit zu berücksichtigen.

3.) Untersuchungsmethoden

Für die widersprüchlichen Befunde hinsichtlich der Assoziation des -866G/A Polymorphismus mit der Insulinsekretion könnten auch die Untersuchungsmethoden verantwortlich sein. Beispielsweise könnte der hyperglykämische Clamp zur Messung der durch den -866G/A Polymorphismus verursachten

Unterschiede in der Insulinsekretion doch nicht ganz so gut geeignet sein: Dadurch, dass der Plasmaglukosespiegel innerhalb einer Minute relativ unphysiologisch auf 10 mmol/l angehoben wird, werden kleinere Effekte eventuell durch überschießende Sekretion überlagert. Eine stufenweise Erhöhung des Blutzuckers, wie sie von Toffolo et al. beschrieben wurde [66], wäre hier vielleicht besser. Damit könnten dann auch zeitgebundene Effekte, wie z.B. dass β -Zellen von eingeschränkt glukosetoleranten Patienten verzögert auf Glukose reagieren [15], besser detektiert werden.

4.) Probandenanzahl

Zu überlegen wäre außerdem, ob die Anzahl der Probanden, die an unserer Untersuchung teilgenommen haben, nicht ausreicht, um die Effekte der UCP2-Promotor-Mutation darzustellen. Eine Untersuchung von 55 Meta-Analysen von Ioannidis et al. bewies, dass große Studien besser geeignet sind als Kleine, um genetische Effekte zu detektieren [29]. Auch eine Arbeit über die Replizierbarkeit von Studien betont die Notwendigkeit einer ausreichenden Fallzahl und empfiehlt daher die Zusammenarbeit mehrerer Forschungsgruppen [41].

4.7 Schlußfolgerung

Zusammengefasst finden wir in einer süddeutschen Population einen Zusammenhang des A-Allels des -866G/A Polymorphismus im UCP2-Gen mit erhöhten Blutzuckerwerten, Insulinresistenz, verminderter Steigerung der Kohlenhydratoxidation unter Hyperinsulinämie und verminderter Insulinsekretion relativ zur Insulinwirkung. Damit scheint die Assoziation des A-Allels mit Diabetes mellitus Typ 2, die auch andere Arbeitsgruppen gefunden haben [12; 36; 58; 59], erklärt zu werden.

Allerdings sind die Auswirkungen der Mutation weiterhin unklar. Wir finden in einer holländischen Population eine Verbindung des A-Allels des -866G/A Polymorphismus mit einer verbesserten Insulinsekretion; andere Arbeitsgruppen

bestätigen dies [69] und finden eine erhöhtes Risiko für einen früh manifesten Typ 2 Diabetes bei Trägern des G-Allels [67]. Deshalb sind wichtige, noch nicht ganz aufgeklärte Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen (wie z.B. Adipositas) beim Einfluss des -866G/A Polymorphismus auf das Diabetes-Risiko wahrscheinlich.

Das UCP2-Gen mit seinem -866G/A Polymorphismus ist dennoch ein wichtiges Kandidaten-Gen, welches die Entstehung und den Verlauf eines Diabetes mellitus Typ 2 beeinflussen kann.

5 Zusammenfassung

Bei der Suche nach den genetischen Ursachen des Diabetes mellitus Typ 2 hat sich das Uncoupling Protein 2-Gen, welches für ein Kanalprotein der inneren Mitochondrienmembran kodiert, als interessantes Kandidaten-Gen herausgestellt. In der Promotorregion dieses Gens wurde der -866G/A Polymorphismus gefunden, dem zugehörigen A-Allel wurde in einigen vorausgehenden Studien ein Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen.

Wir haben in der Tübinger Familienstudie mittels einer Phänotyp-Genotyp-Assoziationsstudie die Auswirkungen des -866G/A Polymorphismus erforscht, besonders im Hinblick auf den Glukosemetabolismus. Ein Kollektiv von insgesamt 529 Probanden wurde hinsichtlich des Polymorphismus genotypisiert und anschließend mit Hilfe des oralen Glukosetoleranztests bezüglich Plasmaglukose, Insulinsensitivität, und Insulinsekretion untersucht. Eine Untergruppe dieser Kohorte wurde mit der indirekten Kalorimetrie auf Unterschiede in der Substratoxidation getestet. Weiterhin unterzogen sich 201 Probanden aus einer Kollaborationsstudie mit einer niederländischen Arbeitsgruppe einem hyperglykämischen Clamp.

Die Ergebnisse der Tübinger Familienstudie bestätigen größtenteils die oben genannten Forschungsarbeiten: Wir finden in einer süddeutschen Population das A-Allels des -866G/A Polymorphismus assoziiert mit einer erhöhten Plasmaglukose im OGTT (basal: $p=0.03$, nach 2h: $p=0.01$), einer leicht eingeschränkten Insulinsensitivität (OGTT: $p=0.055$ bei AA vs. GX), einer verminderten Steigerung der Glukoseoxidation unter Hyperinsulinämie (euglykämischer Clamp: $p=0.03$ bei AA vs. GX) sowie einer relativ zur Insulinsensitivität eingeschränkten Insulinsekretion (Disposition Index aus dem OGTT: $p=0.036$ bei AA vs. GX). All diese Befunde könnten einen Zusammenhang des A-Allels des

-866G/A Polymorphismus mit einem erhöhten Diabetes mellitus Typ 2-Risiko erklären.

In der niederländischen Population zeigt sich jedoch im hyperglykämischen Clamp bei A-Allel-Trägern eine höhere Insulinsekretion (1. Phase: $p=0.01$, 2. Phase: $p=0.04$). Diese Diskrepanz lässt sich durch Populations- und Untersuchungsunterschiede sowie durch Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen begründen.

Die Ergebnisse der Tübinger Familienstudie haben jedenfalls gezeigt, dass das Uncoupling Protein 2-Gen mit dem -866G/A Polymorphismus in der Promotorregion ein wichtiges Kandidaten-Gen bei der Entstehung des Typ 2 Diabetes mellitus darstellt, und dass die weitere Erforschung dieses Gens einen Teil dazu beitragen kann, die Ursachen dieser Erkrankung besser zu verstehen und frühzeitiger zu behandeln.

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

3' UTR	3' nicht translatierte Region
-866G/A	-866G/A Polymorphismus im UCP2-Gen
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
ANC	adenine nucleotide carrier
ANOVA	Analysis of Variance
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar
BZ	Blutzucker
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
C-Peptid	Connecting-Peptide
EPR	energy production rate
FADH ₂	reduziertes Flavin-adenin-dinucleotid
G	Guanin
GIR	Glukoseinfusionsrate
GLUT	Glukose-Transport-Protein
Gly	Glycin

H ⁺ -Ionen	Wasserstoffionen
IGT	impaired glucose tolerance
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISI	Insulinsensitivitätsindex
ISI _{est}	Insulinsensitivität aus OGTT geschätzt nach Matsuda
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KHOx	Kohlenhydratoxidationsrate
KIR6.2	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal 6.2
LBM	Lean-Body-Mass
LipidOx	Lipidoxidationsrate
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NGT	normal glucose tolerance
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
P	p-Wert
PCR	Polymerase Chain Reaction
P _i	nicht-organisches Phosphat
PPAR _γ	Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptor Gamma
Pro	Prolin
RQ	Respiratorischer Quotient
SUR	Sulfonyl-Harnstoff-Rezeptor
TPI	Tetrapolare Impedanzmessung
TÜF	Tübinger Familienstudie

UCP	Uncoupling Protein
Val	Valin
WHR	Waist-to-hip-ratio
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

1. **Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA** (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426
2. **Ahrén B, Pacini G** (2004) Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *Eur J Endocrinol* 150: 97-104
3. **Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES** (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26: 76-80
4. **Bagdade JD, Porte D Jr, Brunzell JD, Bierman EL** (1974) Basal and stimulated hyperinsulinism: reversible metabolic sequelae of obesity. *J Lab Clin Med* 83: 563-569
5. **Beard JC, Ward WK, Halter JB, Wallum BJ, Porte D Jr** (1987) Relationship of islet function to insulin action in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 59-64
6. **Beck-Nielsen H, Henriksen JE, Alford F, Hother-Nielson O** (1996) In vivo glucose metabolism, insulin secretion and, insulin action in Europeans with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) and their first-degree relatives. *Diabet Med* 13: S78-S84
7. **Bell GI, Polonsky KS** (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature* 414: 788-791
8. **Boss O, Hagen T, Lowell BB** (2000) Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 49: 143-156
9. **Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP** (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408: 39-42

10. **Bulotta A, Ludovico O, Coco A, Di Paola R, Quattrone A, Carella M, Pellegrini F, Prudente S, Trischitta V** (2005) The common -866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1176-1180
11. **Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsumishima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB** (2001) Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50: 1302-1310
12. **D'Adamo M, Perego L, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, Andreozzi F, Sciacqua A, Lauro D, Sbraccia P, Federici M, Paganelli M, Pontiroli AE, Lauro R, Perticone F, Folli F, Sesti G** (2004) The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1905-1910
13. **Dalgaard LT, Andersen G, Larsen LH, Sorensen TI, Andersen T, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Fleckner J, Hansen T, Din N, Pedersen O** (2003) Mutational analysis of the UCP2 core promoter and relationships of variants with obesity. *Obes Res* 11: 1420-1427
14. **Dalgaard LT, Pedersen O** (2001) Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and type II diabetes. *Diabetologia* 44: 946-965
15. **Ehrmann DA, Breda E, Cavaghan MK, Bajramovic S, Imperial J, Toffolo G, Cobelli C, Polonsky KS** (2002) Insulin secretory responses to rising and falling glucose concentrations are delayed in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 45: 509-517
16. **Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP** (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387: 90-94
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. *N Engl J Med* 321: 337-343
18. **Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, Ebenbichler C, Paulweber B, Sandhofer F, Ladurner G, Hell E, Strosberg AD, Patsch JR, Krempler F, Patsch W** (2001) A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-age humans. *Nat Gen* 28: 178-183

19. **Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS** (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345: 971-980
20. **Ferrannini E** (1988) The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 37: 287-301
21. **Ferrannini E** (1998) Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477-490
22. **Fleury C, Neverora M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH** (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Gen* 15: 269-272
23. **Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA** (1997) Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog. A potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46: 900-906
24. **Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M** (1997) Characterization of the pre-diabetic state. *Am J Hypertens* 10: 172S-180S
25. **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
26. **Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, Viswanathan M, Snehalatha C, Ramachandran A, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Nissinen A, Pedersen O** (1995) Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. *Diabetologia* 38: 481-486
27. **Hofmann E:** Hormone und Stoffwechsel. 566-568, In Hofmann E: Medizinische Biochemie systematisch 3.Auflage 2001, Uni-Med-Verlag, Bremen
28. **Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffman M, Mayorga R, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner R, Province M, Bryan J, Permutt MA, Aguilar-Bryan L** (1996) Sequence variants in the sulfonyleurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes* 45: 825-831

29. **Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG** (2003) Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 361: 567-571
30. **Jacot E, DeFronzo RA, Jequier E, Maeder E, Felber JP** (1982) The effect of hyperglycemia, hyperinsulinemia, and route of glucose administration on glucose oxidation and glucose storage. *Metabolism* 31: 922-930
31. **Kahn BB, Flier JS** (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481
32. **Kahn CR, Vicent D, Doria A** (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 47: 509-531
33. **Karam JH, Grodsky GM, Forsham PH** (1963) Excessive insulin response to glucose in obese subjects as measured by immunochemical assay. *Diabetes* 12: 197-204
34. **King H, Aubert RE, Herman WH** (1998) Global burden of diabetes 1995-2025. *Diabetes Care* 21: 1414-1431
35. **Köbberling J, Tillil H**: Empirical risk figures for first degree relatives of non-insulin dependent diabetics. 201-209, In: Köbberling J, Tattersall R: *The genetics of diabetes mellitus*, 1982, Academic Press, London, New York
36. **Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R, Ebenbichler C, Patsch JR, Miller K, Xie M, Linnemayr V, Oberkofler H, Patsch W** (2002) A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-age humans. *Diabetes* 51: 3331-3335
37. **Langin D** (2001) Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion. *N Engl J Med* 345: 1772-1774
38. **Le Fur S, Le Stunff C, Don Santos C, Bougnères P** (2004) The common -866G/A polymorphism in the promoter of uncoupling protein 2 is associated with increased carbohydrate and decreased lipid oxidation in juvenile obese. *Diabetes* 53: 235-239
39. **Lentes KU, Tu N, Chen H, Winnikes U, Reinert I, Marmann G, Pirke KM** (1999) Genomic organization and mutational analysis of the human UCP2 gene, a prime candidate gene for human obesity. *J Recept Signal Transduct Res* 19: 229-244

40. **Löffler G, Kellerer M, Häring HU:** Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. 838-864, In: Löffler G, Petrides P: Biochemie und Pathobiochemie 7.Auflage 2003, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
41. **Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN** (2003) Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33: 177-182
42. **Mao W, Yu ZZ, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G** (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 443: 326-330
43. **Matsuda M, DeFronzo RA** (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 22: 1462-1470
44. **McGuire EA, Helderman JH, Tobin JD, Andres R, Berman M** (1976) Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol* 41: 565-573
45. **Nagase I, Yoshida T, Kumamoto K, Umekawa T, Sakane N, Nikami H, Kawada T, Saito M** (1996) Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenetic β 3-adrenergic agonist. *J Clin Invest* 97: 2898-2904
46. **National Diabetes Data Group** (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039-1057
47. **Nicholls DG, Locke RM** (1984) Thermogenetic mechanism in brown fat. *Physiol Rev* 64: 1-64
48. **Nijpels G** (1998) Determinants for the progression from impaired glucose tolerance to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 28: 8-13
49. **Otabe S, Clement K, Rich N, Warden C, Pecqueur C, Neverova M, Raimbault S, Guy-Grand B, Basdevant A, Ricquier D, Froguel P, Vasseur F** (1998) Mutation screening of human UCP 2 gene in normoglycemic and NIDDM morbidly obese patients. Lack of association between new UCP 2 polymorphism and obesity in French Caucasians. *Diabetes* 47: 840-842
50. **Perley M, Kipnis DM** (1966) Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* 15: 867-874

51. **Pimenta W, Korytkowski M, Mitrakou A, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Evron W, Dailey G, Gerich J** (1995) Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. *JAMA* 273: 1855-1861
52. **Polonsky KS, Sturis J, Bell GI** (1996) Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334: 777-783
53. **Reaven GM** (1988) Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607
54. **Rett K** (1999) The relation between insulin resistance and cardiovascular complications of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Obes Metab* 1: S8-S16
55. **Saleh MC, Wheeler MB, Chan CB** (2002) Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia* 45: 174-187
56. **Saltiel AR, Kahn CR** (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806
57. **Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Goubern M, Huang Q, Neverova M, Gregoire F, Easlick J, Raimbault S, Levi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D** (1998) BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 273; 34611-34615
58. **Sasahara M, Nishi M, Kawashima H, Ueda K, Sakagashira S, Furuta H, Matsumoto E, Hanabusa T, Sasaki H, Nanjo K** (2004) Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in β -cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53: 482-485
59. **Sesti G, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, D'Adamo M, Del Guerra S, Lauro D, De Nicolais P, Sbraccia P, Del Prato S, Gambardella S, Federici M, Marchetti P, Lauro R** (2003) A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose-tolerant subjects. *Diabetes* 52: 1280-1283
60. **Stefan N, Fritsche A, Häring H, Stumvoll M** (2001) Effects of experimental elevation of free fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity in healthy carriers of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ_2 gene. *Diabetes* 50: 1143-1148

61. **Stefan N, Fritsche A, Machicao F, Tschritter O, Haring HU, Stumvoll M** (2004) The Gly1057Asp polymorphism in IRS-2 interacts with obesity to affect beta cell function. *Diabetologia* 47: 759-761
62. **Stumvoll M, Fritsche A, Häring HU** (2002) Clinical characterization of insulin secretion as the basis for genetic analyses. *Diabetes* 51: S122-S129
63. **Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haefen T, Renn W, Gerich J** (2000) Use of oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23: 295-301
64. **Taylor SI, Accili D, Imai Y** (1994) Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes* 43: 735-740
65. **Thamer C, Haap M, Volk A, Maerker E, Becker R, Bachmann O, Machicao F, Häring HU, Stumvoll M** (2002) Evidence for greater oxidative substrate flexibility in male carriers of the Pro12Ala polymorphism in PPAR γ ₂. *Horm Metab Res* 34: 132-136
66. **Toffolo G, Breda E, Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS, Cobelli C** (2001) Quantitative indexes of beta-cell function during graded up&down glucose infusion from C-peptide minimal models. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E2-E10
67. **Valeriya Lyssenko, Peter Almgren, Dragi Anevski, Maerketa Sjögren, Tiinamaija Tuomi, Leif Groop** Genetic prediction of future type 2 diabetes. 2004, *Diabetes* 53, Seite A30
68. **Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB** (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 79-82
69. **Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA, Elbein SC** (2004) Uncoupling protein 2 polymorphism in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E1-E7
70. **Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB** (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta-cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105: 745-755
71. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J** (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787

8 Danksagung

Zuerst einmal möchte ich ganz, ganz herzlich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. A. Fritsche für seine hervorragende Betreuung und seine unablässige Unterstützung danken. Ich habe mich während des Verlaufs der gesamten Doktorarbeit sehr gut aufgehoben gefühlt.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. med. F. Shirkavand, Frau L. Joel, Herrn Dr. med. K. Rittig, Herrn Dr. med. Jan Stock, Herrn Dr. med. M. Haap und Herrn Dr. med. Claus Thamer für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Elke Maerker, Frau Heike Luz und Frau Anna Bury für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Hilfestellungen bei der Untersuchung der Probanden.

Zu guter Letzt gilt mein Dank allen Probanden, die durch ihre bereitwillige Teilnahme an den Versuchen die Durchführung dieser Studie überhaupt erst ermöglichten.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Martina Guthoff
Geburtstag: 30.04.1981
Geburtsort: Darmstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1987 – 1991 Engelbergschule Stuttgart-Weilimdorf
1991 – 2000 Solitude-Gymnasium Stuttgart-Weilimdorf
6/2000 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/2000 Beginn des Studiums der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
9/2002 Ärztliche Vorprüfung
8/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/2003 Famulatur an der Kinderklinik der Universität Tübingen
3/2004 Famulatur in einer Kinderarzt-Praxis in Bremen
9/2004 – 11/2004 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin am Grey Bruce Health Services, Owen Sound, Ontario, Kanada

3/2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2007 – 6/2007	Praktisches Jahr in der Abteilung für Innere Medizin am Royal Brisbane and Women's Hospital, Brisbane, Queensland, Australien
7/2007 – 8/2007	Praktisches Jahr in der Abteilung für Innere Medizin der Universitätsklinik Tübingen
8/2006 – 12/2006	Praktisches Jahr in der Kinderklinik der Universität Tübingen
12/2007 – 3/2007	Praktisches Jahr in der Abteilung für Chirurgie der Universitätsklinik Tübingen
16.05.2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung