

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Campus Innenstadt – Diabetes Zentrum  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke



**Untersuchungen des Stoffwechselerhaltens von nicht-  
diabetischen Trägern der Diabetes-assoziierten Genvarianten  
von FTO und TCF7L2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Anna Kirchhofer**

aus Peißenberg

**2014**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Seißler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Uwe Janka

Prof. Dr. Eberhard Standl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. C. Then

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
I.1 Diabetes mellitus Typ 2.....	11
I.1.1 Grundlagen und Klassifikation .....	11
I.1.2 Epidemiologie und Folgeerkrankungen .....	12
I.1.3 Pathogenese des Typ 2 Diabetes.....	15
I.1.3.1 Die Insulinresistenz.....	15
I.1.3.2 Die $\beta$ -Zell-Funktionsstörung.....	22
I.1.4 Genpolymorphismen und Typ 2 Diabetes .....	26
I.1.4.1 Assoziation des Fat Mass and Obesity (FTO) – Genlocus mit Typ 2 Diabetes.....	28
I.1.4.2 Assoziation des Transkriptionsfaktor 7-like 2 (TCF7L2) – Genlocus mit Typ 2 Diabetes.....	29
<b>II. Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>III. Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
III.1 Studiendesign und Untersuchungsablauf.....	32
III.1.1 Rekrutierung der Probanden .....	32
III.1.2 Erhebung der Anamnese und der anthropometrischen Daten .....	33
III.2 Verwendete Medikamente, Materialien und Geräte .....	34
III.3 Metabolische Untersuchungen.....	36
III.3.1 Intravenöser Glukosetoleranztest (ivGTT) .....	36
III.3.2 Hyperinsulinämischer euglykämischer Glukose-Clamp-Test.....	36
III.4 Laboruntersuchungen .....	38
III.4.1 Routine-Labor.....	38
III.4.2 Experimenteller Teil im Labor .....	39
III.4.2.1 Bestimmung von C-Peptid .....	39

III.4.2.2 Bestimmung von Glukagon .....	40
III.4.2.3 Bestimmung von Insulin .....	41
III.4.2.4 Bestimmung von Proinsulin.....	41
III.4.2.5 Bestimmung freier Fettsäuren.....	42
III.5 Berechnungen.....	43
III.5.1 Parameter für die Insulinsensitivität.....	43
III.5.2 Parameter für die Insulinsekretion .....	44
III.6 Statistische Auswertung.....	45
<b>IV. Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
IV.1 Grundcharakterisierung der Studienpopulation .....	46
IV.2 Metabolische Charakterisierung der Probanden.....	48
IV.2.1 Intravenöser Glukosetoleranztest.....	48
IV.2.1.1 Analyse der frühen Phase der Insulinsekretion nach intravenöser Glukosegabe.....	50
IV.2.1.2 Analyse der späten Phase der Insulinsekretion nach intravenöser Glukosegabe.....	53
IV.2.1.3 Analyse der Proinsulinspiegel.....	53
IV.2.2 Hyperinsulinämischer euglykämischer Glukose-Clamp-Test .....	57
IV.2.2.1 Assoziation zwischen Genpolymorphismen und Insulinsensitivität... 57	
IV.2.2.2 Assoziation zwischen Genpolymorphismen und Glukagonspiegel ... 58	
IV.2.2.3 Assoziation zwischen Genpolymorphismen und Lipidmetabolismus 59	
IV.2.3 Unterschiede zwischen homozygoten und heterozygoten TCF7L2- Merkmalsträgern.....	61
<b>V. Diskussion .....</b>	<b>65</b>
V.1 Diskussion der Ergebnisse des TCF7L2-Polymorphismus .....	65
V.2 Diskussion der Ergebnisse des FTO-Polymorphismus.....	72
<b>VI. Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>VIII. Danksagung.....</b>	<b>90</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
AIR	Acute insulin response
Akt	Protein Kinase B (PKB)
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP1	Activator protein 1
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATMs	Adipose tissue macrophages
AUC	Area under the curve
B0	Maximale Bindung
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMI	Body-Mass-Index
CHOP-10	C/EBP-homologous protein-10
CoA	Coenzym-A
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerin
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DI	Disposition Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFAs	Free fatty acids
FPIR	First phase insulin response
FTO	Fat Mass and Obesity
GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide
GIR	Glukoseinfusionsrate
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT-4	Glukosetransporter 4
Grb2 Protein	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 $\beta$	Glykogen synthase kinase 3 $\beta$
$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GWASs	Genome-wide Association Studies

HbA <sub>1c</sub>	Glykohämoglobin
HFD	High-fat-diet
HDL	High density lipoprotein
HOMA	Homeostatic model assessment
HOMA-%B	Homeostatic model assessment of beta-cell function
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of insulin resistance
IKK	IκB-Kinase
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IRE1	Inositol requiring 1
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
ISI	Insulinsensitivitätsindex
ivGTT	Intravenöser Glukosetoleranztest
JNK	C-jun N-terminal kinase
KCNJ11	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LDL	Low density lipoprotein
LPA	Lysophosphatidsäure
MAP	Mitogen-activated protein
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NEFA	Non-esterified fatty acids
NF-κB	Nuclear transcription factor-κB
NSB	Nicht-spezifische Bindung
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PA	Phosphatidsäure
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PI <sub>3</sub> K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PKB/Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Quicki	Quantitative insulin sensitivity check index
ROS	Reactive oxygen species
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
TA	Totalaktivität
TCF7L2	Transkriptionsfaktor 7-like 2
TGs	Triglyceride
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF <sub>α</sub>	Tumornekrosefaktor α
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UKPDS	UK Prospective Diabetes Study Group
UPR	Unfolded protein response
VLDL	Very low density lipoprotein
WNT	Wingless-type MMTV Integration Site Family Member 1

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1** *Der Insulin-Signalweg. Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor löst die Autophosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors und die Tyrosinphosphorylierung des IRS aus. Phosphoryliertes IRS fungiert als Andockstation für andere Signalproteine wie die  $PI_3K$  und Grb2. Während der Signalweg über die  $PI_3K$  eine Rolle für die Glukoseaufnahme sowie für die Synthese von Lipiden, Glykogen und Proteinen einnehmen soll, setzt Grb2 eine Kaskade in Gang, die maßgeblich an Zellwachstum und -proliferation beteiligt ist (Olivares-Reyes et al., 2009).....* 17

**Abbildung 2** *Metabolismus der freien Fettsäuren in Zusammenhang mit der Wirksamkeit von Insulin im Skelettmuskel oder in der Leber. Aktivierte FFAs werden vor allem über zwei Wege verwertet, durch Oxidation oder Speicherung als Triglyceride. Übersteigt das Angebot an FFAs die Kapazität der Zelle, diese weiter zu verarbeiten, häufen sich Zwischenprodukte wie DAG, PA oder LPA an. Diese können über die Aktivierung bestimmter Serinkinasen die Insulinsensitivität der Zelle beeinflussen. Ceramide können die Insulinwirksamkeit auch durch Interaktion mit PKB/Akt beeinträchtigen. Die Unfähigkeit, FFAs in den Mitochondrien komplett zu oxidieren, führt zur Akkumulation von Acylcarnithin, das eventuell ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung einer Insulinresistenz spielt (Schenk et al., 2008).....* 19

**Abbildung 3** *Beispiel für den Verlauf des hyperinsulnämischen euglykämischen Glukose-Clamp-Tests; Dargestellt ist die Plasmaglukosekonzentration über die Zeit. Die gestrichelten Pfeile zeigen die Blutentnahmen an.....* 38

**Abbildung 4** *Plasma-Glukosespiegel und Plasma-Insulinspiegel während des ivGTT .....* 49

**Abbildung 5** *Darstellung der ersten Phase der Insulinsekretion (FPIR) in den Studiengruppen .....* 50

**Abbildung 6** *Darstellung der akuten Insulin Response AIR (AUC Plasma-Insulinspiegel 0 – 10 Minuten) in den Studiengruppen .....* 51

**Abbildung 7** *Darstellung der Area under the Curve (AUC) für Insulin dividiert durch AUC für Glukose für die frühe Phase des ivGTT (0 – 10 Minuten).....* 51

**Abbildung 8** *Darstellung von Delta Insulin / Delta Glukose im ivGTT als Maß für die Insulinsekretion zum Zeitpunkt 3 Minuten.....* 52

**Abbildung 9** *Darstellung von Delta Insulin / Delta Glukose im ivGTT als Maß für die Insulinsekretion zum Zeitpunkt 5 Minuten.....* 52

**Abbildung 10** *Plasma-Proinsulinspiegel und Proinsulin / Insulin – Ratio während des ivGTT.....* 54

<b>Abbildung 11</b> Risikoindex (HOMA-IR dividiert durch FPIR) bei FTO-, TCF7L2-Risikoträgern und Kontrollpersonen.....	57
<b>Abbildung 12</b> Vergleich des Plasma-Glukagonspiegels (nüchtern) bei Risikoträgern und Kontrollpersonen.....	58
<b>Abbildung 13</b> Vergleich des Plasma-Glukagonspiegels während des Clamp-Tests bei Risikoträgern und Kontrollpersonen.....	59
<b>Abbildung 14</b> Verlauf der Cholesterin-, der Triglyceridwerte und der Konzentration von freien Fettsäuren (FFA) während des Clamp-Tests (Basal = nüchtern, SS = „Steady State“ – Bedingungen) .....	60

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> <i>Verteilung der Risikogenpolymorphismen bei den Teilnehmern der Studie</i> .....	33
<b>Tabelle 2</b> <i>In der Studie benutzte Materialien</i> .....	35
<b>Tabelle 3</b> <i>In der Studie benutzte Geräte</i> .....	36
<b>Tabelle 4</b> <i>Grundcharakterisierung der Studienpopulation</i> .....	46
<b>Tabelle 5</b> <i>Basale Laborparameter in den verschiedenen Studiengruppen</i> .....	47
<b>Tabelle 6</b> <i>Basale Indices für Insulinsekretion und Insulinsensitivität</i> .....	48
<b>Tabelle 7</b> <i>Ergebnisse des ivGTT</i> .....	56
<b>Tabelle 8</b> <i>Ergebnisse des Glukose-Clamp-Tests in den verschiedenen Studiengruppen</i> .....	57
<b>Tabelle 9</b> <i>Vergleich der Merkmale zur Grundcharakterisierung der Probanden und der basalen Laborparameter zwischen homo- und heterozygoten Merkmalsträgern von TCF7L2 rs7903146</i> .....	62
<b>Tabelle 10</b> <i>Vergleich der basalen Indices für Insulinsekretion und –sensitivität, der Ergebnisse des ivGTT und des Glukose-Clamp-Tests zwischen homo- und heterozygoten Merkmalsträgern von TCF7L2 rs7903146</i> .....	64

# I. Einleitung

---

## I.1 Diabetes mellitus Typ 2

### I.1.1 Grundlagen und Klassifikation

Die Erkrankung Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe metabolischer Veränderungen, deren gemeinsames Merkmal die Hyperglykämie darstellt, welche aus einem Defekt der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder einer Kombination beider resultiert (Association, 2007).

Die „American Diabetes Association“ (ADA), an deren Kriterien sich die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) weitgehend orientiert, teilt die Erkrankung Diabetes mellitus bezüglich ihrer Ätiologie und Pathogenese in vier verschiedene Untergruppen ein:

1. Typ 1 Diabetes (idiopathische oder immunologisch vermittelte Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen mit meist daraus resultierendem absolutem Insulinmangel)
2. Typ 2 Diabetes
3. Andere spezifische Diabetestypen (genetische Defekte der  $\beta$ -Zelle, genetische Defekte der Insulinwirkung, Krankheiten des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, drogen- und medikamenteninduzierter Diabetes, infektionsassoziiertes Diabetes, Diabetes assoziiert mit genetischen Syndromen)
4. Gestationsdiabetes (Manifestation oder Erstdiagnose des Diabetes während der Schwangerschaft)

Als Kriterien für die Diagnose Diabetes mellitus definiert die ADA entweder das Vorhandensein klassischer Diabetessymptomatik – Polyurie, Polydipsie und unerklärbarer Gewichtsverlust – plus die Messung eines Gelegenheitswerts der Glukosekonzentration  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) oder einen Wert der Nüchternglukose  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l) oder Werte von  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) innerhalb von zwei Stunden nach oraler Glukosebelastung (75g).

Des Weiteren benennt die ADA Vorstufen des Diabetes mellitus, sogenannte Prädiabetesformen, und zwar die gestörte Nüchtern glukose (100-125 mg/dl bzw. 5,6-6,9 mmol/l) und die gestörte Glukosetoleranz, wobei hier der Wert zwei Stunden nach oraler Glukosebelastung 140-199 mg/dl (7,8-11,1 mmol/l) beträgt. Demzufolge definiert sich die normale Nüchtern glukose als Wert < 100 mg/dl (5,6 mmol/l) und die normale Glukosetoleranz als Wert zwei Stunden nach oraler Glukosebelastung von < 140 mg/dl (7,8 mmol/l) (Association, 2007).

Der Diabetes mellitus Typ 2, früher auch als „nicht-Insulin-abhängiger“ Diabetes oder „Altersdiabetes“ bezeichnet, findet sich bei etwa 90-95% der Diabetiker. Bei dessen Entstehung spielen unter anderem Alter, Adipositas, Bewegungsmangel, Bluthochdruck, Dyslipidämie, früherer Gestationsdiabetes sowie genetische Prädisposition eine Rolle (Association, 2007, Lyssenko et al., 2005, Wiener et al., 2008). Zu den Symptomen einer ausgeprägten Hyperglykämie zählen Müdigkeit, Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, Sehstörungen und selten Polyphagie. Außerdem ist die chronische Hyperglykämie mit Wachstumsverzögerung und einer Prädisposition für bestimmte Infektionen assoziiert. Allerdings sind die Symptome beim Typ 2 Diabetes oft nicht besonders stark ausgeprägt, vielmehr verläuft die Erkrankung anfangs meist klinisch inapparent, weshalb sie häufig über viele Jahre unentdeckt bleibt. Lebensbedrohliche Folgen eines unkontrollierten Diabetes sind die diabetische Ketoazidose beim Typ 1 Diabetes und das nicht-ketoazidotische hyperosmolare Koma beim Typ 2 Diabetes. Beide Zustände zeichnen sich durch hohe Glukosewerte, starke Elektrolytverschiebungen und Kreislaufstörungen bis hin zu komatösen Bewusstseinszuständen aus. Auf lange Sicht verursacht die metabolische Dysregulation sekundäre Schäden in multiplen Organsystemen (Association, 2007, Scherbaum and Kiess, 2004a).

### **I.1.2 Epidemiologie und Folgeerkrankungen**

Weltweit ist eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit an Diabetes mellitus zu beobachten (Scherbaum and Kiess, 2004b). Die weltweite Prävalenz betrug im Jahr 2000 zwischen 147 und 154 Millionen (Scherbaum and Kiess, 2004a). Dieser Trend setzt sich offensichtlich fort, sodass die Zahl der Erkrankten bis zum Jahr 2025 vermutlich auf über 300 Millionen ansteigen wird (Lyssenko et al., 2005). Zudem stellt der Typ 2 Diabetes die häufigste Komorbidität des Alters dar. Daten aus Süddeutschland des Jahres 2000 belegen eine Prävalenz des Diabetes mellitus

unter den 65- bis 69-Jährigen von 22,2% bei Männern und 16,4% bei Frauen. Bei den 70- bis 74-Jährigen waren 23,1% der Männer und 17,0% der Frauen betroffen (Rathmann et al., 2003). Darüber hinaus ist zu bedenken, dass der Typ 2 Diabetes aufgrund seiner klinischen Inapparenz häufig lange Zeit unentdeckt bleibt und häufig erst anhand von spezifischen Diabeteskomplikationen diagnostiziert wird. Eine populationsbasierte Untersuchung im Raum Augsburg ergab unter Verwendung des oralen Glukosetoleranztests in der Altersgruppe von 55 bis 74 Jahren eine Prävalenz des unentdeckten Diabetes von 8,2%, was in etwa der Häufigkeit des bekannten Diabetes von 8,4% entsprach (Rathmann et al., 2003).

Hauptsächlich verursacht wird diese Entwicklung durch Zunahme von Adipositas und reduzierter physischer Aktivität im Rahmen des gesteigerten Wohlstands eines Landes. Somit entwickelt sich der Typ 2 Diabetes zum globalen Problem, da nicht mehr nur Australien und die Länder Europas und Nordamerikas betroffen sind, sondern im Hinblick auf die zunehmende Industrialisierung ebenfalls Staaten in Asien, Afrika und Lateinamerika. So erklärt sich auch, warum die Prävalenz des Typ 2 Diabetes viel stärker ansteigt als jene des Typ 1 Diabetes, da letztere Form eine Autoimmunerkrankung darstellt und Adipositas und Bewegungsmangel nicht dafür prädisponieren (Wiener et al., 2008). Abgesehen von den jeweiligen Lebensgewohnheiten und dem Wohlstand eines Landes variiert die Erkrankungswahrscheinlichkeit ebenfalls mit der Zugehörigkeit zu einer speziellen ethnischen Gruppe (Wiener et al., 2008). Als Beispiel hierfür lässt sich der Volksstamm der Pima-Indianer in Arizona anführen, der eine der höchsten Diabetes-Prävalenzen weltweit aufweist (Weyer et al., 1999). Aber auch die „African Americans“ und die „Hispanic Americans“ sind beispielsweise stärker betroffen als europäischstämmige Amerikaner (Association, 2007). Zusätzlich erweist sich die frühere, etwas beschönigende Bezeichnung „Alterszucker“ heute als obsolet, da sich der Typ 2 Diabetes zunehmend bei jüngeren Menschen und sogar bei Jugendlichen und Kindern findet. Während heutzutage die meisten Erkrankten über 60 Jahre alt sind, geht man davon aus, dass sich bereits im Jahr 2030 die größte Anzahl der Diabetes-Patienten zwischen 45 und 64 Jahren bewegen wird (Wiener et al., 2008). Die Ausbreitung des Diabetes mellitus bringt nicht nur gesundheitspolitische Probleme mit sich, sondern steht gleichzeitig für erhebliche finanzielle Einbußen durch die Behandlung der Krankheit und ihrer schwerwiegenden Spätfolgen sowie die daraus in vielen Fällen resultierende Berufsunfähigkeit.

Die chronischen Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus sind die Hauptursache für die gesteigerte Morbidität und Mortalität (Wiener et al., 2008). Daten aus einem Distrikt in Wales ergaben einen Verlust an Lebensjahren im Mittel von sieben bei Männern und siebeneinhalb bei Frauen, wobei eine starke Abhängigkeit vom Alter bei Diagnosestellung zu verzeichnen war (Morgan et al., 2000).

Besondere Bedeutung kommt den durch makroangiopathische Veränderungen verursachten Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus zu. Die Makroangiopathie manifestiert sich bei Diabetikern überwiegend als koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Insuffizienz (Scherbaum and Kiess, 2004b). Die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen ist bei älteren Diabetikern gegenüber Personen ohne Diabetes zwei- bis vierfach höher (Kannel, 1997). Ungefähr 75-80% der Diabetes-Patienten sterben an kardiovaskulären Ereignissen (Olivares-Reyes et al., 2009). In den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft von 2004 finden sich Angaben über das Auftreten einer pAVK bei Patienten mit Diabetes mellitus von 20,9% im Vergleich zu 7,0% bei Nichtdiabetikern (Beks et al., 1995). Ferner haben epidemiologische Studien eine zwei- bis dreifach erhöhte Inzidenz für Schlaganfälle bei Menschen mit Diabetes mellitus aller Altersgruppen gegenüber Nichtdiabetikern aufgezeigt (Kannel and McGee, 1979, Stegmayr and Asplund, 1995).

Neben den makroangiopathischen Erkrankungen verursacht Diabetes mellitus ebenfalls mikroangiopathische Komplikationen.

Zunächst ist die diabetische Retinopathie zu nennen, die die häufigste mikrovaskuläre Komplikation und gleichzeitig die häufigste diabetesspezifische Augenerkrankung darstellt (Scherbaum and Kiess, 2004a). Sie zählt zu den häufigsten Erblindungsursachen, und konkordant dazu ist bei Personen mit Diabetes mellitus das Erblindungsrisiko etwa fünfmal höher als in der nichtdiabetischen Bevölkerung (Icks et al., 1997).

Des Weiteren ist der Typ 2 Diabetes die führende Ursache für chronische Niereninsuffizienz in Deutschland (Scherbaum and Kiess, 2004b). Das erste klinische Zeichen der diabetischen Nephropathie ist die Mikroalbuminurie, die bei Diagnosestellung bereits häufig vorhanden ist (Adler et al., 2003). Nach zehn Jahren Diabetesdauer hatten 5% der Typ 2 Diabetiker in der „UK Prospective Diabetes Study Group“ (UKPDS) eine Makroalbuminurie entwickelt, bei 0,8% lag schon eine Niereninsuffizienz vor (Adler et al., 2003).

Eine weitere Folge der chronischen Hyperglykämie stellt die diabetische Neuropathie dar. Auch hier wird über eine Entstehung durch mikroangiopathische Veränderungen spekuliert. In einer klinikbasierten Querschnittsstudie mit über 1100 Patienten aus 22 deutschen, österreichischen und schweizerischen Diabeteszentren waren bei 35% der Typ 2 Diabetiker eine periphere Neuropathie und bei 22% eine kardiovaskuläre autonome Neuropathie in Form einer verminderten Herzfrequenzvariabilität nachweisbar (Ziegler et al., 1993). Die häufigste Ausprägung der diabetischen Neuropathie ist die distale symmetrische Polyneuropathie, bei der ein Sensibilitätsverlust und eine Abschwächung der Reflexe im Vordergrund stehen. Die autonome Neuropathie spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle, da sie multiple Organsysteme betreffen kann und dadurch unter anderem zu Tachykardie und orthostatischer Hypotension sowie zu verzögerter Magenentleerung, Blasenentleerungsstörungen und erektiler Dysfunktion führt (Wiener et al., 2008). Speziell im Hinblick auf die gastrointestinale Neuropathie leiden Diabetiker häufiger als Gesunde unter Diarrhö, Obstipation, Bauchschmerzen, Sodbrennen und Meteorismus (Bytzer et al., 2001).

Obgleich die genannten Langzeitschäden eine hohe Prävalenz unter Diabetikern aufweisen, kann deren Entstehung oder Ausprägungsgrad doch stark durch eine normnahe Blutzuckereinstellung beeinflusst werden (Tkác, 2009). Nach Daten der UKPDS-Studie ist eine Senkung des HbA<sub>1c</sub> um 1% mit einer signifikant niedrigeren Inzidenz von Myokardinfarkten (14%) und Schlaganfällen (12%) assoziiert (Stratton et al., 2000). In der Nachbeobachtungsphase waren bei den ehemals intensiviert mit Metformin eingestellten Diabetikern eine Senkung der Myokardinfarktrate um 33% und der Mortalität um 27% zu beobachten (Holman et al., 2008).

### **I.1.3 Pathogenese des Typ 2 Diabetes**

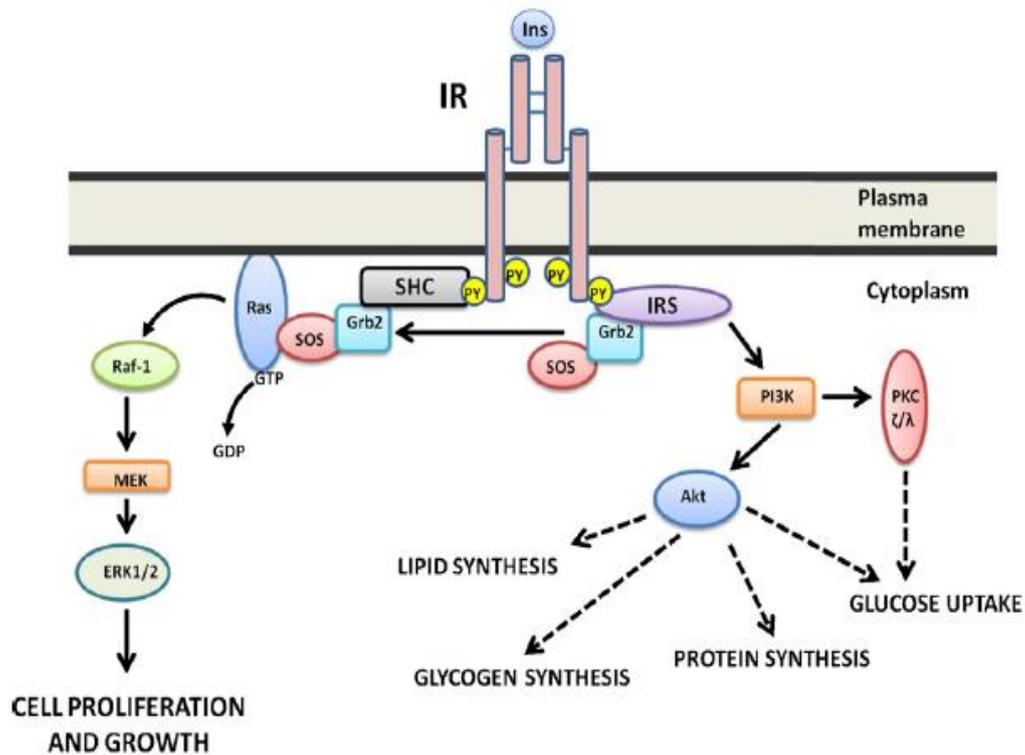
#### ***I.1.3.1 Die Insulinresistenz***

Der Begriff der Insulinresistenz definiert sich als eine inadäquate Antwort der Zielgewebe wie Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe auf physiologische Konzentrationen zirkulierenden Insulins (Schenk et al., 2008). Zusammen mit einer gestörten Insulinsekretion stellt die Insulinresistenz eine zentrale Veränderung bei der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes dar. Welcher von beiden der primäre Defekt ist, wird heute kontrovers diskutiert, jedoch unterstützen die meisten Studien die

Ansicht, dass die Insulinresistenz der Insulinsekretionsstörung voraus geht und dass Diabetes nur dann entsteht, wenn die pankreatische  $\beta$ -Zelle erschöpft ist und die gesteigerte Nachfrage an Insulin nicht mehr kompensieren kann (Schenk et al., 2008, Wiener et al., 2008). Demzufolge fungiert die Insulinresistenz als Vorläufer für Typ 2 Diabetes und stellt zusätzlich ein definierendes Charakteristikum des metabolischen Syndroms dar, welches eine Konstellation verschiedener Merkmale wie Dyslipidämie, arterielle Hypertonie, abdominale Adipositas und Glukosestoffwechselstörungen umfasst und häufig begleitet wird von Hyperinsulinämie, Schlafapnoesyndrom und anderen Störungen (Schenk et al., 2008).

Als anaboles Hormon ist Insulin maßgeblich an der Aufnahme, dem Verbrauch und der Speicherung zellulärer Nährstoffe beteiligt (Olivares-Reyes et al., 2009). Wichtige Stoffwechselprozesse werden durch die Insulinresistenz abgeschwächt. Zu diesen gehören die durch Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in Skelettmuskelzellen, die Inhibierung der hepatischen Glukoneogenese und die verminderte Lipolyse im Fettgewebe (Schenk et al., 2008). Insulin fördert nicht nur die vermehrte Speicherung von Triglyceriden und Glykogen, sondern auch die Proteinbiosynthese (Olivares-Reyes et al., 2009).

Auf molekularer Ebene zeichnet sich die Insulinresistenz durch eine gestörte intrazelluläre Signalkaskade aus (Olivares-Reyes et al., 2009). Durch die Bindung an den Insulinrezeptor werden komplexe Signalwege in Gang gesetzt. Etwas vereinfacht führt die rezeptorvermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats (IRS) zur Aktivierung zweier Signalwege. Zum Einen bewirkt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>K) über die Proteinkinase B (Akt-Kinase) und die Proteinkinase C den Einbau des Glukosetransporters 4 (GLUT-4) in die Plasmamembran und steuert die Synthese von Proteinen, Glykogen und Lipiden. Zum Anderen setzt die Aktivierung des Proteins Grb2 die MAP-Kinase-Kaskade in Gang, die Zellwachstum und -proliferation kontrolliert (Olivares-Reyes et al., 2009, Schenk et al., 2008, Zeyda and Stulnig, 2009).



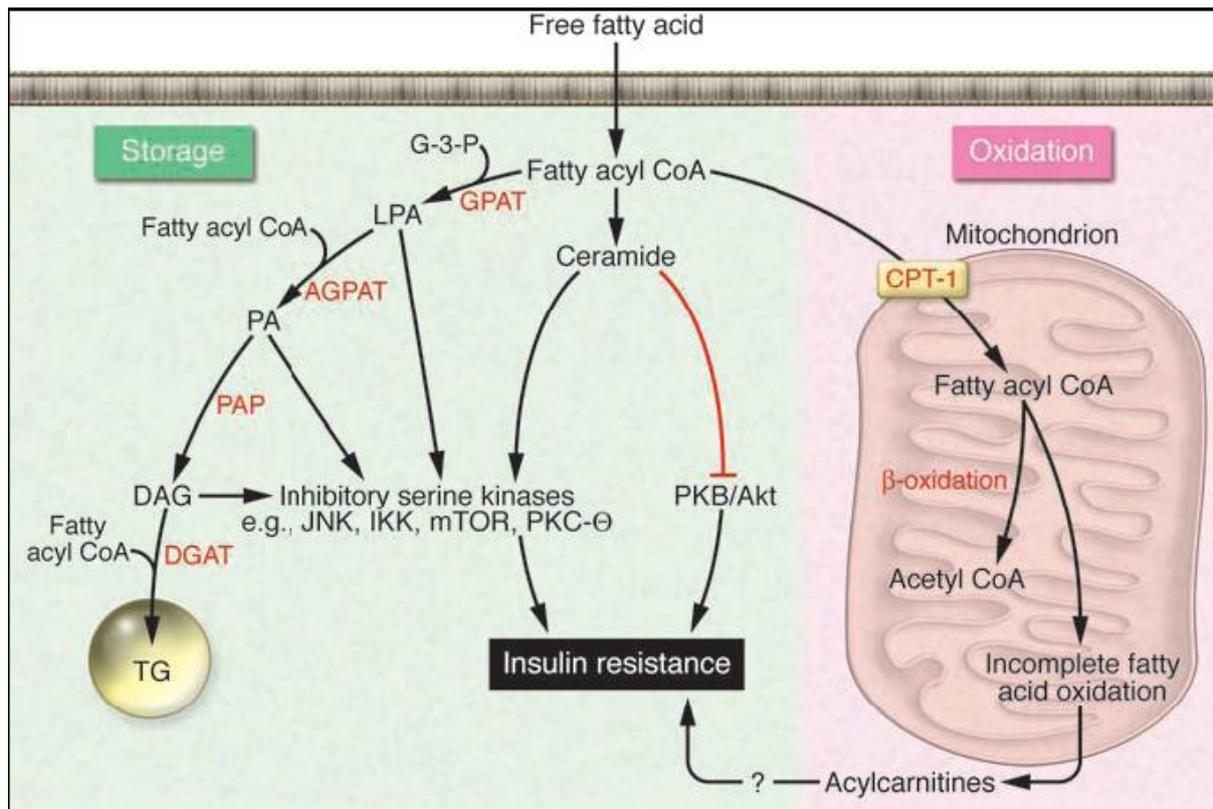
**Abbildung 1** Der Insulin-Signalweg. Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor löst die Autophosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Insulinrezeptors und die Tyrosinphosphorylierung des IRS aus. Phosphoryliertes IRS fungiert als Andockstation für andere Signalproteine wie die  $PI_3K$  und Grb2. Während der Signalweg über die  $PI_3K$  eine Rolle für die Glukoseaufnahme sowie für die Synthese von Lipiden, Glykogen und Proteinen einnehmen soll, setzt Grb2 eine Kaskade in Gang, die maßgeblich an Zellwachstum und -proliferation beteiligt ist (Olivares-Reyes et al., 2009).

Ein bedeutender Mechanismus, um die Signalwege zu blockieren, verläuft über die Phosphorylierung bestimmter Serinreste auf IRS-1, was dazu führt, dass sich IRS-1 nicht an den Insulinrezeptor anlagert (Schenk et al., 2008).

Nun stellt sich die Frage, wie es zur Entwicklung einer Insulinresistenz kommt. Dazu bietet die Literatur verschiedene Ansätze. Bisher konnte kein allgemein gültiger Mechanismus identifiziert werden, vielmehr herrscht die Auffassung, dass verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen, die sich bezüglich Individuen und Bevölkerungsgruppen unterscheiden (Schenk et al., 2008).

Schenk et al. geben als entscheidende Gründe für deren Entstehung in westlichen Kulturen Adipositas, körperliche Inaktivität und Altern an (Schenk et al., 2008). Zeyda et al. bezeichnen vor allem zentrale Adipositas als bedeutenden Risikofaktor für das Auftreten der Insulinresistenz (Zeyda and Stulnig, 2009). Während Überernährung schnell eine Insulinresistenz des Skelettmuskels und der Leber induziert, verbessert eine kalorische Restriktion die Insulinsensitivität der genannten Gewebe. Tatsächlich reagieren einige Signalkaskaden direkt auf Änderungen in der Energiebalance oder des Nahrungsangebots und schränken daraufhin die Aufnahme von Nährstoffen ein. Zu diesen zählt unter anderem der  $PI_3K$ -Signalweg (Schenk et al., 2008). Auf diese Art verbleibt mehr Glukose in der Blutbahn und verursacht auf lange Sicht die schwerwiegenden Folgeerkrankungen des Typ 2 Diabetes.

Eine weitere Hypothese unterstreicht die Bedeutung der freien Fettsäuren (FFAs) in der Pathogenese der Insulinresistenz. Dass bei übergewichtigen Personen ein gesteigerter Umsatz und damit auch Fluss der FFAs zu finden ist und dieser mit der Insulinsensitivität in Verbindung steht, lässt sich durch die Anwendung einer Lipid-Heparin-Infusion beweisen, welche bei den Versuchsprobanden eine Insulinresistenz erzeugt. Umgekehrt bewirkt eine pharmakologische Hemmung der Lipolyse einen verminderten FFA-Fluss und steigert auf diese Weise die Insulinsensitivität. Schließlich führt ebenfalls eine Gewichtsreduktion zu einem herabgesetzten FFA-Fluss und zu einer Erhöhung der Insulinsensitivität (Schenk et al., 2008). Werden die freien Fettsäuren nun von Skelettmuskelzellen oder Hepatozyten aufgenommen, stehen zwei Möglichkeiten der Weiterverarbeitung zur Verfügung, zum Einen die  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien, zum Anderen die Speicherung als Triglyceride (TGs). Übersteigt jedoch das Angebot an FFAs die Fähigkeit der Zellen, diese zu verwerten, häufen sich verschiedene Zwischenmetabolite an, wie z.B. Diacylglycerin (DAG), Phosphatidsäure (PA), Lysophosphatidsäure (LPA) und Ceramide. Diese aktivieren wiederum eine Reihe verschiedener Serinkinasen, unter anderem mTOR, JNK, IKK und PKC, welche eine Serin-Phosphorylierung von IRS-1 zur Folge haben und sich so negativ auf die Insulinsensitivität auswirken. Ceramid kann darüber hinaus den Insulinsignalweg durch Hemmung der Akt-Kinase blockieren. Besonders JNK und IKK stellen zusätzlich Komponenten zweier bedeutender proinflammatorischer Signalwege dar und bringen dadurch Insulinresistenz mit Entzündung in Verbindung (Schenk et al., 2008).



**Abbildung 2** Metabolismus der freien Fettsäuren in Zusammenhang mit der Wirksamkeit von Insulin im Skelettmuskel oder in der Leber. Aktivierte FFAs werden vor allem über zwei Wege verwertet, durch Oxidation oder Speicherung als Triglyceride. Übersteigt das Angebot an FFAs die Kapazität der Zelle, diese weiter zu verarbeiten, häufen sich Zwischenprodukte wie DAG, PA oder LPA an. Diese können über die Aktivierung bestimmter Serinkinasen die Insulinsensitivität der Zelle beeinflussen. Ceramide können die Insulinwirksamkeit auch durch Interaktion mit PKB/Akt beeinträchtigen. Die Unfähigkeit, FFAs in den Mitochondrien komplett zu oxidieren, führt zur Akkumulation von Acylcarnithin, das eventuell ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung einer Insulinresistenz spielt (Schenk et al., 2008).

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Wolf et al., die feststellten, dass durch eine Anhäufung intrazellulärer Lipide eine verminderte Translokation des GLUT-4 in die Plasmamembran stattfindet (Wolf, 2008). Ein anderer Ansatz beschäftigt sich mit einer potenziellen mitochondrialen Dysfunktion und behauptet, dass eine höhere Kapazität der Myozyten, die FFAs in den Mitochondrien zu oxidieren, die oben beschriebene Anhäufung der Zwischenmetabolite verhindern und so die Entwicklung einer Insulinresistenz aufhalten könnte. Allerdings konnten klinische Studien nicht bestätigen, dass adipöse, insulinresistente oder an Diabetes erkrankte Menschen eine reduzierte Fähigkeit zur Fettsäureoxidation besitzen. Eine gegensätzliche

Hypothese erkennt gerade in einer exzessiven  $\beta$ -Oxidation die Gefahr mitochondrialer Überladung mit Acetyl-CoA-Molekülen, woraus kurzkettige, inkomplett oxidierte Fettsäureprodukte entstehen, die über bisher unbekannte Mechanismen die Insulinsensitivität beeinträchtigen (Schenk et al., 2008).

Es ist seit einigen Jahren evident, dass eine Assoziation zwischen Adipositas, Insulinresistenz und einer chronischen Entzündungsreaktion existiert (Zeyda and Stulnig, 2009, Schwarz, 2009). Viele Studien haben nachgewiesen, dass die chronische Aktivierung proinflammatorischer Signalwege in Zielgeweben von Insulin zur Adipositas-vermittelten Insulinresistenz führt (Schenk et al., 2008). So finden sich beispielsweise erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und CRP bei insulinresistenten Personen (Schenk et al., 2008, Zeyda and Stulnig, 2009). Des Weiteren schützt eine Neutralisierung von TNF- $\alpha$  im Tierversuch vor der Entwicklung einer Insulinresistenz trotz genetischer oder fütterungsbedingter Adipositas (Uysal et al., 1997). JNK- und IKK-Signalwege, die über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF- $\kappa$ B die Transkription von Genen der Entzündungskaskade fördern, sind beim insulinresistenten Individuum hochreguliert (Schenk et al., 2008). Die Entzündungsmediatoren IL-1 sowie JNK und IKK führen zur Phosphorylierung eines Serinrests von IRS-1, während IL-6 den Insulinsignalweg über ein SOCS-Protein blockiert (Zeyda and Stulnig, 2009). Einen wichtigen Initiator der Entzündungsantwort stellt das Fettgewebe dar, dessen Zellen einige Zytokine und Chemokine wie IL-6, IL-1 $\beta$ , MIF und TNF- $\alpha$  freisetzen können. Durch welche Mechanismen entsteht die gesteigerte subklinische Entzündungsreaktion?

Postuliert wird, dass durch eine starke Zunahme des Fettgewebes die Adipozyten unter einer relativen Hypoperfusion leiden und sich so Gebiete regionaler Mikrohypoxie ausbilden. Hypoxisches Gewebe zeigt sowohl verstärkte Aktivität von JNK1 und IKK/NF- $\kappa$ B, als auch verstärkte Expression von Genen, die in inflammatorische Prozesse involviert sind. Hieraus resultiert eine Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, was zur Rekrutierung von Makrophagen führt, die wiederum selbst proinflammatorische Zytokine freisetzen (Schenk et al., 2008). Über 40% des Fettgewebes adipöser Menschen sind von Makrophagen durchsetzt, verglichen mit 10% bei normalgewichtigen Probanden (Schenk et al., 2008). Weitere Studien belegen einen Zusammenhang zwischen dem BMI und der Anzahl an

„adipose tissue macrophages“ (ATMs) (Zeyda and Stulnig, 2009). Die Rolle der Makrophagen konnte auch im Tierversuch eindrucksvoll nachgewiesen werden. Durch spezifische Blockierung der IKK $\beta$ - und JNK1-Signalwege in Knochenmarkzellen und damit in Makrophagen waren die Mäuse vor der Entstehung einer Insulinresistenz geschützt, obgleich sie auf eine „high-fat-diet“ (HFD) gesetzt worden waren. Das legt die Vermutung nahe, dass ohne die von Makrophagen beigesteuerte Entzündungskomponente Adipositas alleine keine Insulinresistenz auszulösen vermag (Arkan et al., 2005, Solinas et al., 2007). Zudem besitzen FFAs die Fähigkeit, Makrophagen über den „toll-like receptor 4“ (TLR4) zu aktivieren (Zeyda and Stulnig, 2009). In der Leber finden sich ebenfalls aus dem Knochenmark generierte, makrophagen-ähnliche Zellen, sogenannte Kupffer-Zellen. Man nimmt an, dass die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege in Kupffer-Zellen eine zentrale Bedeutung für die Entstehung der hepatischen Insulinresistenz bei Adipositas hat (Schenk et al., 2008).

Ferner kommt eine Beeinträchtigung des endoplasmatischen Retikulums (ER), das als Cholesterin- und Nährstoffsensor fungiert, als Ursache in Betracht. Unter Bedingungen der Hypoxie und der exzessiven Lipidakkumulation reagiert das ER mit Einbußen seiner Funktion, was zur Ansammlung nicht- oder falschgefalteter Proteine im ER-Lumen führt (Schenk et al., 2008, Zeyda and Stulnig, 2009). Die Aktivierung eines Signalnetzwerks, genannt UPR, bringt eine Entzündungsreaktion in Gang (Zeyda and Stulnig, 2009). Außerdem resultiert die Stressantwort ebenfalls in einer Erhöhung der IKK $\beta$ - und JNK-Wirkung, welche über oben beschriebene Mechanismen zu einer Insulinresistenz führt (Schenk et al., 2008). ER-Stress bedingt auch die Downregulation der Expression von GLUT-4 (Zeyda and Stulnig, 2009). Insgesamt induziert ER-Stress die Entstehung einer Entzündungsreaktion und der Insulinresistenz, ausgelöst durch Nährstoffüberladung (Schenk et al., 2008).

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Insulinresistenz richtet sein Augenmerk auf vom Fettgewebe sezernierte Hormone wie z.B. Adiponectin. Erniedrigte Konzentrationen dieses Botenstoffs finden sich bei Individuen mit Adipositas, metabolischem Syndrom und koronarer Herzkrankheit, wohingegen dessen Konzentration nach längerdauernder kalorischer Restriktion ansteigt. Offensichtlich begünstigen niedrige Adiponectinspiegel die Entwicklung einer Insulinresistenz.

Zudem weisen Adiponectin-knockout Mäuse eine stärkere Neigung zur Thrombozytenaggregation und Apoptose auf und zeigen gleichzeitig höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen. Auf zellulärer Ebene aktiviert die Bindung von Adiponectin an seinen Rezeptor mehrere intrazelluläre Kaskaden, unter anderem findet eine Phosphorylierung der „AMP-activated protein kinase“ (AMPK) statt. Dieser Vorgang unterstützt insgesamt die Glukoseverwertung, Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel und Fettsäureoxidation werden gesteigert, zudem wird die Glukoneogenese in der Leber inhibiert (Ziemke and Mantzoros, 2010).

### ***1.1.3.2 Die $\beta$ -Zell-Funktionsstörung***

Um den durch die Insulinresistenz entstandenen Mehrbedarf an Insulin zu decken, erhöht die  $\beta$ -Zelle in den pankreatischen Inselzellen ihre Sekretionskapazität. Während bei den meisten Menschen die erfolgreiche Anpassung der  $\beta$ -Zelle lebenslänglich aufrecht erhalten werden kann, lässt bei einem geringeren Prozentsatz die Adaptation mit der Zeit nach (Donath et al., 2009). Die Insulinresistenz alleine reicht demnach nicht aus, um einen Typ 2 Diabetes zu erzeugen (Fryirs et al., 2009). Andere Forscher bezweifeln sogar das zeitlich frühere Auftreten der Insulinresistenz vor der  $\beta$ -Zell-Funktionsstörung und begründen dies damit, dass sich die Krankheit auch bei Individuen findet, die kein starkes Defizit der Insulinsensitivität aufweisen (Campbell, 2009). Als Ursache für den Rückgang der  $\beta$ -Zell-Adaptation vermutet man einen intrinsischen Defekt, der eventuell durch eine genetische Prädisposition determiniert ist (Donath et al., 2009, Poitout and Robertson, 2008). Die  $\beta$ -Zell-Funktionsstörung ist charakterisiert durch erniedrigte Glukose-stimulierte Insulinsekretion, reduzierte Insulinproduktion und fortschreitenden Verlust an  $\beta$ -Zell-Masse (Fryirs et al., 2009). Butler et al. berichten über eine um 50% reduzierte  $\beta$ -Zell-Masse bei Personen mit gestörter Nüchternglukose und sogar über eine um 63% reduzierte Masse bei Diabetespatienten (Butler et al., 2003). Die Regulation der  $\beta$ -Zell-Masse stellt normalerweise einen dynamischen Prozess dar, bei dem eine Balance zwischen Replikation und Wachstum auf der einen und Nekrose und Apoptose auf der anderen Seite herrscht. Nun geht man davon aus, dass beim Diabetes mellitus exzessive Apoptoseraten für den Verlust an  $\beta$ -Zellen verantwortlich sind (Lupi and Del Prato, 2008).

Um dieses Phänomen zu erklären, finden sich in der Literatur mehrere Ansätze. Zunächst ist der Aspekt der Glukotoxizität von allgemeinem Interesse. Mehrere Studien haben herausgefunden, dass eine chronische Erhöhung der Glukosekonzentration die Funktion der  $\beta$ -Zellen in Mitleidenschaft zieht. So wurde wiederholt dokumentiert, dass die Inkubation humaner pankreatischer Inseln bei erhöhten Glukosekonzentrationen eine gesteigerte Apoptoserate verursacht. Als Grund hierfür gilt vor allem die Entstehung von oxidativem Stress. Ein exzessiver Glukosemetabolismus führt auf zellulärer Ebene zur vermehrten mitochondrialen Produktion von „reactive oxygen species“ (ROS), die negative Auswirkungen auf die Funktion der  $\beta$ -Zellen mit sich bringen (Lupi and Del Prato, 2008). Darüber hinaus reagiert die  $\beta$ -Zelle besonders sensibel auf oxidativen Stress, da sie nur eine sehr niedrige Expression und Aktivität antioxidativer Enzyme aufweist (Lupi and Del Prato, 2008). Dass oxidativer Stress tatsächlich eine Rolle spielt, bekräftigen Versuche mit isolierten  $\beta$ -Zellen und pankreatischen Inseln. Dabei wird beobachtet, dass die Zugabe der Antioxidanzien N-Acetylcystein und Aminoguanidin die  $\beta$ -Zellen vor den negativen Effekten einer Kultivierung bei hoher Glukosekonzentration schützt (Kaneto et al., 1996, Tajiri et al., 1997). Fügt man das Antioxidans Glutathion hinzu, sinkt das Ausmaß nicht nur, sondern gleichzeitig erholt sich auch die Insulinsekretion der Zellen (Del Guerra et al., 2005). Ferner ist von Interesse, dass bereits intermittierend hohe Glukosekonzentrationen die Glukose-stimulierte Insulinsekretion behindern können. Diese Tatsache ist von Bedeutung, da sie nahelegt, dass schon Glukosefluktuationen wie die postprandiale Hyperglykämie in der prädiabetischen Phase den Verlust von funktionstüchtigen  $\beta$ -Zellen beschleunigen (Del Guerra et al., 2007). Zudem soll eine chronische Hyperglykämie die Bildung von ER-Stress fördern (Lupi and Del Prato, 2008).

Das Konzept der Lipotoxizität veranschaulicht, dass der Ausbreitung des Fettgewebes nicht nur eine Rolle bei der Entwicklung der Insulinresistenz zukommt, sondern dass sie auch Auswirkungen auf die Funktion und das Überleben der  $\beta$ -Zellen hat (Lupi and Del Prato, 2008). Sind  $\beta$ -Zellen über längere Zeit langkettigen, gesättigten Fettsäuren, wie z.B. Palmitat ausgesetzt, so resultiert daraus ein toxischer Effekt auf die Zellen. Im Gegensatz dazu wirken sich ungesättigte Fettsäuren positiv auf die  $\beta$ -Zellen aus und verhindern eine Palmitat- oder Glukose-induzierte Apoptose (Poitout and Robertson, 2008, Maedler et al., 2003). Es

existieren mehrere Überlegungen, wie FFAs die  $\beta$ -Zellen beeinträchtigen könnten. Zunächst begünstigen sie die Apoptose durch Downregulierung des antiapoptotischen Gens Bcl-2 (Lupi et al., 2002) und induzieren eine verminderte Phosphorylierung von Akt, was gleichermaßen die Apoptosemaschinerie in Bewegung setzt (Wrede et al., 2002). Zusätzlich kann aus Palmitat schnell Ceramid erzeugt werden, welches als potenziell toxisches Endprodukt eine Rolle beim FFA-induzierten Zelltod und der durch FFAs vermittelten Hemmung der Insulin-Genexpression spielt (Poitout and Robertson, 2008, Morgan, 2009). Ebenfalls triggert die Auslösung von ER-Stress durch die Anwesenheit von FFAs wie Palmitat die Aktivierung des proapoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP-10 (Morgan, 2009). Schließlich ist anzumerken, dass die Lipotoxizität eng mit der Glukotoxizität in Verbindung steht. Beide tragen durch exzessive Erzeugung von ROS zur Entstehung von oxidativem Stress bei (Lupi and Del Prato, 2008). Poitout und Robertson postulieren sogar, dass sich die Lipotoxizität nicht ohne das Vorhandensein einer Glukotoxizität bilden kann (Poitout and Robertson, 2008).

Um den gesteigerten Insulinbedarf des Körpers bei Insulinresistenz zu decken, müssen die pankreatischen Inseln ihre Produktion massiv steigern. Diese chronische Stimulation der  $\beta$ -Zellen und die daraus resultierende hohe Rate der Insulinbiosynthese fördern die Bildung einer Stressreaktion des ER, da die Kapazität zur Proteinfaltung dieses Zellorganells überschritten wird (Lupi and Del Prato, 2008, Fonseca et al., 2009). Wie bereits im Rahmen der Insulinresistenz besprochen, setzt ER-Stress eine Signalkaskade in Gang, die anfangs zwar zytoprotektiv wirkt, jedoch bei chronischem ER-Stress proapoptotische Komponenten fördert. Zu diesen gehört die Aktivierung von IRE1, das den Zelltod durch Aktivierung von JNK vorantreibt. Des Weiteren ist der proapoptotische Transkriptionsfaktor CHOP von Bedeutung sowie die Dephosphorylierung von GSK3 $\beta$  (Fonseca et al., 2009).

Eine weitere Spekulation befasst sich mit Amyloidablagerungen in pankreatischen Inseln. Amylin ist ein Protein der  $\beta$ -Zellen und befindet sich zusammen mit Insulin in den intrazellulären Granula. Die beiden Stoffe werden co-sezerniert. Produziert die  $\beta$ -Zelle mehr Insulin, scheidet sie gleichzeitig mehr Amylin aus. Inselamyloid entsteht primär durch Ablagerung von Amylin in Form von Fibrillen (Lupi and Del Prato, 2008). Breiten sich die Amyloidablagerungen in den pankreatischen Inseln aus, sinkt die  $\beta$ -

Zell-Masse (Wang et al., 2001). Campbell bezeichnet Amyloidablagerungen in  $\beta$ -Zellen als Charakteristikum der Histopathologie des Typ 2 Diabetes. Ferner korreliert der Ausprägungsgrad der Amyloidose positiv mit Dauer und Schwere des Diabetes mellitus (Campbell, 2009).

Alle bisher genannten Faktoren – Glukotoxizität, Lipotoxizität, ER-Stress und Amyloidablagerungen – besitzen die Fähigkeit, eine inflammatorische Antwort zu generieren, die anfangs vermutlich Regeneration und Reparatur der  $\beta$ -Zellen fördert, sich jedoch bei Chronifizierung nachteilig auswirkt. Sowohl erhöhte Glukose-, wie auch FFA-Konzentrationen, vor allem der langkettigen Fettsäuren Palmitat und Stearat, steigern die IL-1 $\beta$ -Expression durch Aktivierung des IL-1-Rezeptors. Dem Zytokin IL-1 $\beta$  kommt offenbar eine herausragende Rolle im Entzündungsprozess zu, da es weitere Zytokine und Chemokine reguliert und zur Rekrutierung von Immunzellen beiträgt. Darüber hinaus reagiert die pankreatische  $\beta$ -Zelle besonders sensibel auf Veränderungen der lokalen IL-1 $\beta$ -Konzentration aufgrund seiner hohen Dichte an IL-1-Rezeptoren (Donath et al., 2009). Dass in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes tatsächlich eine Insulitis auftritt, bestätigte sich im Tiermodell, wo sich eine Infiltration der Inseln durch Immunzellen bei diabetischen Tieren zeigte (Ehnes et al., 2007). Eine erhöhte Anzahl an Immunzellen sowie ein erhöhter Spiegel von Zytokinen und Chemokinen ließen sich ebenfalls in den Inseln von Typ 2 Diabetikern nachweisen.

Ein weiteres Resultat der Entzündungsreaktion, abgesehen von der reduzierten Funktion und Masse der  $\beta$ -Zellen, ist ein erhöhter Anteil an  $\alpha$ -Zellen in den Inseln mit daraus folgender relativer Hyperglukagonämie. Dieser Zustand wird eventuell durch IL-6 vermittelt, welches sich in isolierten Inseln negativ auf die Insulinsekretion auswirkt (Kristiansen and Mandrup-Poulsen, 2005), wohingegen es die Proliferation der  $\alpha$ -Zellen fördert und deren Apoptose hemmt. Insgesamt kann man das relative Überwiegen der  $\alpha$ -Zellen als Teil eines Umbauprozesses der pankreatischen Inseln in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes werten (Donath et al., 2009).

Eine andere Hypothese schreibt der Dyslipidämie beim Typ 2 Diabetes eine Teilschuld an der Entstehung der  $\beta$ -Zell-Funktionsstörung zu. Die Akkumulation von Cholesterin in den  $\beta$ -Zellen verursacht Störungen des Glukosemetabolismus und der Insulinsekretion (Fryirs et al., 2009). Während die bei der Dyslipidämie erhöhten

Lipoproteine LDL und VLDL eine konzentrationsabhängige, apoptotische Antwort in den  $\beta$ -Zellen erzielen, tritt der schützende Effekt des erniedrigten HDL in den Hintergrund (Roehrich et al., 2003). Cholesterin ist als integraler Bestandteil der Zellmembran essentiell für die Organisation der Membranproteine. Entsteht nun ein Ungleichgewicht in der Cholesterin-Zusammensetzung, könnte dies die Stabilität der Zelle gefährden und ihre Sekretion behindern (Fryirs et al., 2009).

Schließlich sollen auch Inkretine bedeutende Auswirkungen auf die  $\beta$ -Zellen besitzen. Das Inkretin GLP-1, sezerniert von den L-Zellen des Intestinums, führt zu einer glukoseabhängigen Insulinsekretion, steigert Proliferation und Neogenese der  $\beta$ -Zellen und übt einen inhibitorischen Effekt auf die Apoptose aus. Der Inkretin-Effekt, der für bis zu 70% der postprandialen Insulinsekretion verantwortlich ist, ist bei Typ 2 Diabetikern stark vermindert (Campbell, 2009).

#### **I.1.4 Genpolymorphismen und Typ 2 Diabetes**

Der Typ 2 Diabetes ist eine multifaktorielle Erkrankung, die sich aus der Interaktion zwischen einem prädisponierenden genetischen Hintergrund und hinzukommenden Umweltfaktoren entwickelt (Poulsen et al., 2005, Beck-Nielsen et al., 2003). Hinweise auf eine bedeutende Rolle der Genetik wurden zu Beginn vor allem aus Familien- und Zwillingsstudien abgeleitet. Meigs et al. wiesen bei Personen mit einem erkrankten Elternteil ein 3,5-fach gesteigertes Risiko für Diabetes mellitus nach. Waren beide Elternteile Diabetiker, ergab sich sogar ein sechsfach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Kindern nichtdiabetischer Eltern. Die Autoren schlossen daher auf ein additives Modell bei der Vererbung des Typ 2 Diabetes (Meigs et al., 2000). Medici et al. führten eine Studie mit monozygoten Zwillingspaaren durch, die sich anfangs diskordant hinsichtlich eines Diabetes mellitus verhielten. Nach 15 Jahren hatten 76% der initial nichtdiabetischen Zwillinge ebenfalls einen Typ 2 Diabetes entwickelt, 96% wiesen zumindest eine gestörte Glukosetoleranz auf (Medici et al., 1999). Dergleichen existieren Studien, die sich konkret mit der Vererbung einer Insulinsekretionsstörung oder einer Insulinresistenz beschäftigen. Lehtovirta et al. schätzen die Erblichkeit einer gestörten Insulinsensitivität auf 37% und die der  $\beta$ -Zell-Dysfunktion auf 55-58% (Lehtovirta et al., 2000). Poulsen et al. gehen anhand einer Zwillingsstudie von einer sehr starken genetischen Komponente von 75-84% bei der Vererbung der

Insulinsekretionskapazität aus. Bezüglich der Insulinsensitivität vertreten sie die Ansicht, dass Gene und Umweltfaktoren einen etwa gleich starken Effekt ausüben. Die Erbllichkeit einer Insulinresistenz schätzen die Autoren auf 53-55% (Poulsen et al., 2005).

Seit der Entdeckung der starken genetischen Komponente und hoher Konkordanzraten bezüglich des Typ 2 Diabetes zwischen eineiigen Zwillingen und zwischen Eltern und ihren Kindern sind Wissenschaftler auf der Suche nach potenziellen Risikogenen (Wiener et al., 2008). Noch bis vor wenigen Jahren gestaltete sich die Identifikation von Genloci schwierig und langwierig, da sie nur entweder über sogenannte „Candidate Gene Studies“ oder über genaue Analysen bestimmter Regionen des Genoms, die bei verwandten Diabetikern häufiger als erwartet vorkommen, erfolgen konnte. Seit Beginn der „Genome-wide Association Studies“ (GWASs) im Jahr 2007 ist es möglich, hunderte bis tausende SNPs, die über das gesamte Genom verteilt sind, in einem einzelnen Experiment zu analysieren (Frayling et al., 2007, Saxena et al., 2007, Zeggini et al., 2007, Zeggini et al., 2008, Scott et al., 2007, Sladek et al., 2007, Ruchat et al., 2009, McCarthy and Zeggini, 2009). Statistisch signifikante Unterschiede in der Allelhäufigkeit zwischen Fall- und Kontrollgruppe zeigen dann potenzielle Risikopolymorphismen an. Auf diese Weise wurden Genloci identifiziert, die bisher noch nicht mit Typ 2 Diabetes in Verbindung gebracht worden waren (Perry and Frayling, 2008). Durch die GWASs ist die Anzahl an Genen, die stark mit Typ 2 Diabetes assoziiert sind, von drei auf über fünfzig angewachsen. Abgesehen von der zukünftigen Erstellung individueller genetischer Risikoprofile auf Grundlage des Vorhandenseins von Risikoallelen erhofft man sich, durch die Entdeckung der Risikogene neue Erkenntnisse über die Pathogenese des Typ 2 Diabetes zu gewinnen, die darüber hinaus bei der Arzneimittelentwicklung von Nutzen sein könnten. Dies ist bereits bei den Genen PPARG und KCNJ11 der Fall, deren Proteinprodukte Angriffspunkt einer wirksamen und etablierten Therapie sind (McCarthy and Zeggini, 2009). Genvarianten, die für Diabetes mellitus prädisponieren, können mit Defekten in der Insulinsensitivität, der hepatischen Glukoseproduktion und der Insulinsekretion assoziiert sein. Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass die meisten via GWASs identifizierten Genloci mit einer Beeinträchtigung der Funktion der  $\beta$ -Zellen in Verbindung zu stehen scheinen (Ruchat et al., 2009).

#### ***1.1.4.1 Assoziation des Fat Mass and Obesity (FTO) – Genlokus mit Typ 2 Diabetes***

In zwei GWASs wurden Polymorphismen des Gens FTO auf Chromosom 16 als hochsignifikant mit Typ 2 Diabetes in Verbindung stehend identifiziert (Legry et al., 2009). Eine Variante im Intron 1 des Gens wies die zweitstärkste Assoziation mit Typ 2 Diabetes unter allen bisher entdeckten Genloci in der „UK T2D GWAS“ auf (Perry and Frayling, 2008). Die meisten Studien fanden allerdings heraus, dass das Risikogen seine Prädisposition für den Typ 2 Diabetes hauptsächlich über einen Effekt auf den Body Mass Index vermittelt (Perry and Frayling, 2008, McCarthy and Zeggini, 2009, Legry et al., 2009, Freathy et al., 2008, Frayling et al., 2007). Diese Annahme begründet sich darauf, dass der Zusammenhang zwischen Risikoallelen und Typ 2 Diabetes nach einer Adjustierung für den BMI reduziert wird und in einigen Studien verschwindet (Legry et al., 2009, Frayling et al., 2007). Das A-Allel des SNP rs9939609 gilt als Risikovariante und ist assoziiert mit Erhöhungen des Körpergewichts, des Bauch- und Hüftumfangs, der „waist-hip-ratio“ und des BMI (Legry et al., 2009). Das FTO-Gen erstreckt sich über 400 kB und kodiert für eine 2-Oxoglutarat-abhängige Nukleinsäure-Demethylase (Do et al., 2008). Es wird in vielen Geweben des Körpers exprimiert, wie z.B. im Fettgewebe, in der Leber, in  $\beta$ -Zellen und der Muskulatur (Legry et al., 2009), seine höchste Konzentration findet sich jedoch im Gehirn (Frayling et al., 2007), unter anderem im Hypothalamus. Daher vermuten Grunnet et al., dass das Gen die Entstehung einer Adipositas durch eine veränderte Appetitregulation und/oder durch Beeinflussung des Ganzkörper-Energiemetabolismus begünstigt. Womöglich steht es in Verbindung mit einer verminderten Sättigungsantwort (Grunnet et al., 2009). Fisher et al. dagegen postulieren, dass FTO-Polymorphismen eine systemische Entzündungsreaktion unabhängig vom Grad der Adipositas fördern, da das A-Allel von rs9939609 auch nach Adjustierung für den BMI mit höheren CRP-Spiegeln (C-reaktives Protein) einhergeht (Fisher et al., 2009). Inwieweit FTO nur mit dem Körpergewicht und Adipositas oder aber auch unabhängig davon mit Typ 2 Diabetes assoziiert ist, wird aktuell kontrovers diskutiert.

#### ***1.1.4.2 Assoziation des Transkriptionsfaktor 7-like 2 (TCF7L2) – Genlokus mit Typ 2 Diabetes***

Risikovarianten des Gens Transkriptionsfaktor 7-like 2 tragen stärker als alle bisher identifizierten Risikogene zur Entstehung eines Diabetes mellitus bei (Perry and Frayling, 2008, McCarthy and Zeggini, 2009, Ruchat et al., 2009, Saxena et al., 2006). Das Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert und in der europäischen Bevölkerung sind 7% homozygote und 38% heterozygote Träger des Risikoallels (Perry and Frayling, 2008, McCarthy and Zeggini, 2009, Grant et al., 2006).

Die stärkste Assoziation zum Typ 2 Diabetes zeigten folgende fünf Einzelnukleotid-Polymorphismen: rs12255372, rs7903146, rs7901695, rs111962055 und rs7895340. Die T-Allele von rs12255372 und rs7903146 waren ähnlich stark und rs7903146 insgesamt am stärksten mit Typ 2 Diabetes assoziiert (Ruchat et al., 2009).

TCF7L2 ist ein Transkriptionsfaktor, der über die Interaktion mit der sogenannten WNT-Signalkaskade an der Modulation zahlreicher intrazellulärer Prozesse in verschiedenen Zelltypen beteiligt ist. In mehreren Studien wurde ein Effekt auf die glukoseabhängige Insulinsekretion beschrieben (Perry and Frayling, 2008, Ruchat et al., 2009, Saxena et al., 2006, Marzi et al., 2007, Helgason et al., 2007, Damcott et al., 2006, Florez et al., 2006, Palmer et al., 2008, Lyssenko et al., 2007). Tierexperimentelle Untersuchungen belegen eine Beteiligung von TCF7L2 an der Entwicklung des Pankreas während der Embryogenese sowie der Regulation der Betazellproliferation und -apoptose (Perry and Frayling, 2008, González-Sánchez et al., 2008, Schäfer et al., 2007). Ein Zusammenhang zur Insulinsensitivität wurde nur in sehr wenigen wissenschaftlichen Untersuchungen hergestellt (Damcott et al., 2006, Wegner et al., 2008, Elbein et al., 2007). Ein erniedrigter Disposition-Index weist auf das Versagen der  $\beta$ -Zellen hin, einen erhöhten Insulinbedarf bei Vorliegen einer Insulinresistenz zu kompensieren (Saxena et al., 2006, Damcott et al., 2006, Lyssenko et al., 2007).

Da vor allem bei oraler Glukosebelastung eine erniedrigte Insulinsekretion zu verzeichnen ist, vermutet man einen eingeschränkten Inkretin-Effekt (Kirchhoff et al., 2008, Lyssenko et al., 2007, Grant et al., 2006, González-Sánchez et al., 2008, Schäfer et al., 2007). Erklärt wurde dieses Phänomen durch die Rolle von TCF7L2 in der GLP-1-Sekretion (Schäfer et al., 2007). Als Bestandteil des WNT-Signalwegs beeinflusst TCF7L2 die Regulation des Glukagon-Gens und damit die Sekretion seines Produkts GLP-1 aus enteroendokrinen L-Zellen (González-Sánchez et al.,

2008, Schäfer et al., 2007). In den folgenden Studien konnte nachgewiesen werden, dass bei Genträgern nicht die Höhe der GLP-1-Spiegel nach Stimulation im oGTT unterschiedlich ist, sondern eine verminderte GLP-1-induzierte Insulinsekretion auftritt (Schäfer et al., 2007).

Wie genau die Interaktion zwischen TCF7L2 und der Diabetesentstehung auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist trotz intensiver Forschung aufgrund der komplexen Interaktion verschiedener Organsysteme und der Einflüsse verschiedener Signalwege bisher noch unklar.

## II. Zielsetzung

---

Ein wichtiges Ziel in der Behandlung des Typ 2 Diabetes ist es, Personen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko möglichst frühzeitig zu erfassen. Gleichzeitig besteht ein großer Bedarf, neue Medikamente zu entwickeln, die den Krankheitsprozess verzögern oder stoppen können. Für beide Ziele ist es essentiell, die an der Entstehung des Typ 2 Diabetes beteiligten pathogenetischen Mechanismen besser zu verstehen. Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb, definierte Träger von Diabetesrisikogenen in einer Phase zu untersuchen, in der sich nach den Kriterien der DDG noch kein Diabetes mellitus manifestiert hatte. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich die FTO- oder TCF7L2-Risikoträger von den Nichttrisikoträgern im Hinblick auf klinische Routineparameter?
2. Besteht bei nichtdiabetischen Trägern von FTO oder TCF7L2 eine gestörte  $\beta$ -Zell- oder  $\alpha$ -Zellfunktion?
3. Ist bei den Risikoträgern eine Änderung der Insulinsensitivität nachweisbar?
4. Haben die Risikogenpolymorphismen einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose-Clamp-Test?

Mit diesen Untersuchungen soll ein Beitrag zu einem besseren Verständnis der Wirkung der Diabetes-assoziierten Polymorphismen von FTO und TCF7L2 geleistet werden.

## III. Material und Methoden

---

### III.1 Studiendesign und Untersuchungsablauf

#### III.1.1 Rekrutierung der Probanden

An dieser Studie nahmen 65 nichtdiabetische, männliche Probanden europäischer Herkunft teil, die aus dem KORA-Studienregister rekrutiert wurden. „Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg“ (kurz KORA) ist eine national und international genutzte Forschungsplattform des Helmholtz Zentrums München, in der Studien zur bevölkerungsbezogenen Gesundheitsforschung durchgeführt werden. Seit über 20 Jahren wird in der international bekannten KORA-Studie die Gesundheit tausender Bürger aus dem Raum Augsburg untersucht, um die Auswirkungen von Umweltfaktoren, Verhalten und Genen zu erforschen. Kernthemen der KORA-Studien sind Fragen zu Entstehung und Verlauf von chronischen Erkrankungen, insbesondere Herzinfarkt und Diabetes mellitus. Hierzu werden Risikofaktoren aus dem Bereich des Gesundheitsverhaltens (u.a. Rauchen, Ernährung, Bewegung), der Umwelt (u.a. Luftverschmutzung, Lärm) und der Genetik erforscht. Aus Sicht der Versorgungsforschung werden Fragen der Inanspruchnahme und Kosten der Gesundheitsversorgung untersucht.

Die Einschlusskriterien der vorliegenden Studie waren männliches Geschlecht, Alter zwischen 18 und 75 Jahren, BMI zwischen 19 und 35 kg/m<sup>2</sup> und ein normaler 2-Stunden-Wert im 75g oralen Glukosetoleranztest. Der oGTT war im Rahmen der KORA-F4-Untersuchung innerhalb eines Jahres vor unserer Untersuchung durchgeführt worden, wobei auch der Genotyp der Probanden erhoben worden war. Die Studie wurde in Kooperation mit Prof. Dr. med. H. Hauner vom Else Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin in Weihenstephan durchgeführt. Von Prof. Hauner und seinem Team wurden bei einigen unserer Probanden Nahrungsbelastungstests inklusive eines oGTT durchgeführt. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an unserer Studie waren ein bekannter Diabetes mellitus, eine akute Erkrankung, schwere chronische Erkrankungen wie Nieren-, Leber-, Herzinsuffizienz und die Einnahme von Medikamenten, die die Glukosetoleranz oder Insulinsensitivität beeinflussen (z.B. Glukokortikoide, Immunsuppressiva).

In Tabelle 1 ist die Verteilung der Genotypen bei den Teilnehmern der Studie dargestellt.

Genotyp	n =
FTO-Risikopolymorphismus	24
TCF7L2-Risikopolymorphismus	17 (8 homozygot, 9 heterozygot)
Keine FTO- und TCF7L2-Risikopolymorphismen (=Kontrollen)	24

**Tabelle 1** Verteilung der Risikogenpolymorphismen bei den Teilnehmern der Studie

24 Probanden waren Träger des FTO-Risikopolymorphismus rs9939609. 17 Teilnehmer waren Träger des Risikoallels des SNP rs7903146 des Gens TCF7L2. Da dieser Polymorphismus selten ist, wurden acht Probanden mit homozygoter und neun mit heterozygoter Ausprägung rekrutiert. Schließlich wurden zusätzlich 24 Probanden ausgewählt, die für die jeweiligen SNPs von FTO und TCF7L2 homozygot major waren, das heißt, bei denen keine Diabetes-assoziierten Risikopolymorphismen vorlagen. Diese fungierten als Kontrollen in Bezug auf die beiden Testgruppen. Es muss noch hinzugefügt werden, dass die Teilnehmer mit Risikogenvarianten für FTO keine Risikoallele von TCF7L2 trugen und umgekehrt. Die Teilnehmer wurden durch das KORA-Studienzentrum rekrutiert und zu den klinischen Tests eingeladen. Weder wussten zum Zeitpunkt der Untersuchung die Probanden noch die anwesenden Ärzte und Assistenten über den Genotyp des jeweiligen Teilnehmers Bescheid. Im Vorfeld der Studie wurden alle Teilnehmer ausführlich über Ablauf und Ziele sowie über Risiken und den zu erwartenden Informationsgewinn der Untersuchungen aufgeklärt. Daraufhin gaben sie ihre schriftliche Einwilligung. Das Studienprotokoll war von der zuständigen Ethikkommission genehmigt worden.

### III.1.2 Erhebung der Anamnese und der anthropometrischen Daten

Bei allen Teilnehmern wurde nach einem Standard-Protokoll vorgegangen, das zunächst die Erhebung der Anamnese vorsah. Anschließend erfolgte eine klinische Untersuchung, bei der unter anderem Puls, Größe, Gewicht und Bauchumfang

bestimmt wurden, wobei letzterer in aufrechter Position auf der Mittellinie zwischen Crista iliaca und der untersten Rippe gemessen wurde. Der arterielle Blutdruck wurde am rechten oder linken Oberarm mit einem geeichten Blutdruckmessgerät gemessen, nachdem der Proband bereits fünf Minuten in Ruhe auf dem Untersuchungsstuhl gesessen hatte. Der Body-Mass-Index wurde ermittelt, indem das Körpergewicht in Kilogramm durch die Körpergröße in Metern im Quadrat ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) dividiert wurde.

### III.2 Verwendete Medikamente, Materialien und Geräte

Material	Hersteller
Handschuhe Peha-soft satin, powderfree	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Haut-Desinfiziens	Cutasept F, Bode Chemie Hamburg, Deutschland
Sicherheitsvenenverweilkatheter mit Injektionsport 20G Vasofix Safety	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kanülenfixierpflaster Curafix i.v.	Lohmann & Rauscher International GmbH&Co., Rengsdorf, Deutschland
EDTA-Röhrchen 2,7ml und 7,5ml	S-Monovette, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Serum-Röhrchen 4,7ml	S-Monovette, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Lithium-Heparin-Röhrchen 2,6ml	S-Monovette, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Glucose-Röhrchen 2,7ml	S-Monovette, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Adapter (Röhrchen)	S-Monovette, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 2ml, 5ml, 20ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Isotone Kochsalzlösung 0.9% 500ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glucose 50% Konzentrat 100ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Glucosteril 20% Infusionslösung 500ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Insulin Insuman Rapid 40 I.E./ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Aprotinin, Bovine Lung, Solution, 7410.0 KIU/ml	Calbiochem, USA
Glucocapil Entnahmesystem	Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Deutschland
Human Intact Insulin ELISA Kit	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Human Intact Proinsulin ELISA Kit	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Einmal-Küvetten Plastibrand	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Küvettenständer	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
NEFA-HR(2) zur Bestimmung freier Fettsäuren	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
NEFA Standard	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Pipettenspitzen Plastibrand 200µl, 1000µl	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland

**Tabelle 2** In der Studie benutzte Materialien

Gerät	Hersteller
Waage	Eduard Plazotta, Medizintechnik – Sanitätshaus, München, Deutschland
Verstellbarer Stuhl	Bionic Medizintechnik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
M5 Professional Blutdruckmessgerät	Omron Healthcare Co., Kyoto, Japan
Multifunktions-Heizkissen	Beurer, Ulm, Deutschland
Perfusor segura FT	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Infusomat Alaris GP	Cardinal Health, Rolle, Schweiz
Blutzuckermessgerät Super GL ambulance	Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Deutschland

Pipetten 0.5 – 10µl, 10 – 100µl, 20 – 200µl, 100 – 1000µl 8-Kanal-Pipette	Eppendorf Research, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikroschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
ELISA-Reader TECAN Spectra	SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
DU-62 Spectrophotometer	Bechmann Instruments, Fullerton, CA, USA

**Tabelle 3** *In der Studie benutzte Geräte*

### **III.3 Metabolische Untersuchungen**

#### **III.3.1 Intravenöser Glukosetoleranztest (ivGTT)**

Die Probanden hatten sich in den Tagen vor dem Test normal ernährt und waren für mindestens zwölf Stunden nüchtern. Der Testbeginn war morgens zwischen acht und neun Uhr. Der Proband wurde gebeten, eine bequeme sitzende oder liegende Haltung auf einem verstellbaren Stuhl einzunehmen und beide Arme freizumachen. An rechter und linker Hand bzw. Unterarm wurde jeweils eine venöse Verweilkanüle gelegt, über die eine Infusion mit NaCl 0,9% langsam infundiert wurde. Zu Beginn erfolgten basale Blutentnahmen zu den Zeitpunkten -5 und 0 Minuten sowie eine basale Blutzuckerbestimmung. In einem nächsten Schritt wurden der Testperson 0,33g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht in Form einer 50%-igen Glukoselösung innerhalb von maximal zwei Minuten über eine der Verweilkanülen injiziert. Daraufhin erfolgten wiederum venöse Blutentnahmen am kontralateralen Arm nach 1, 3, 5, 10, 15, 25 und 35 Minuten.

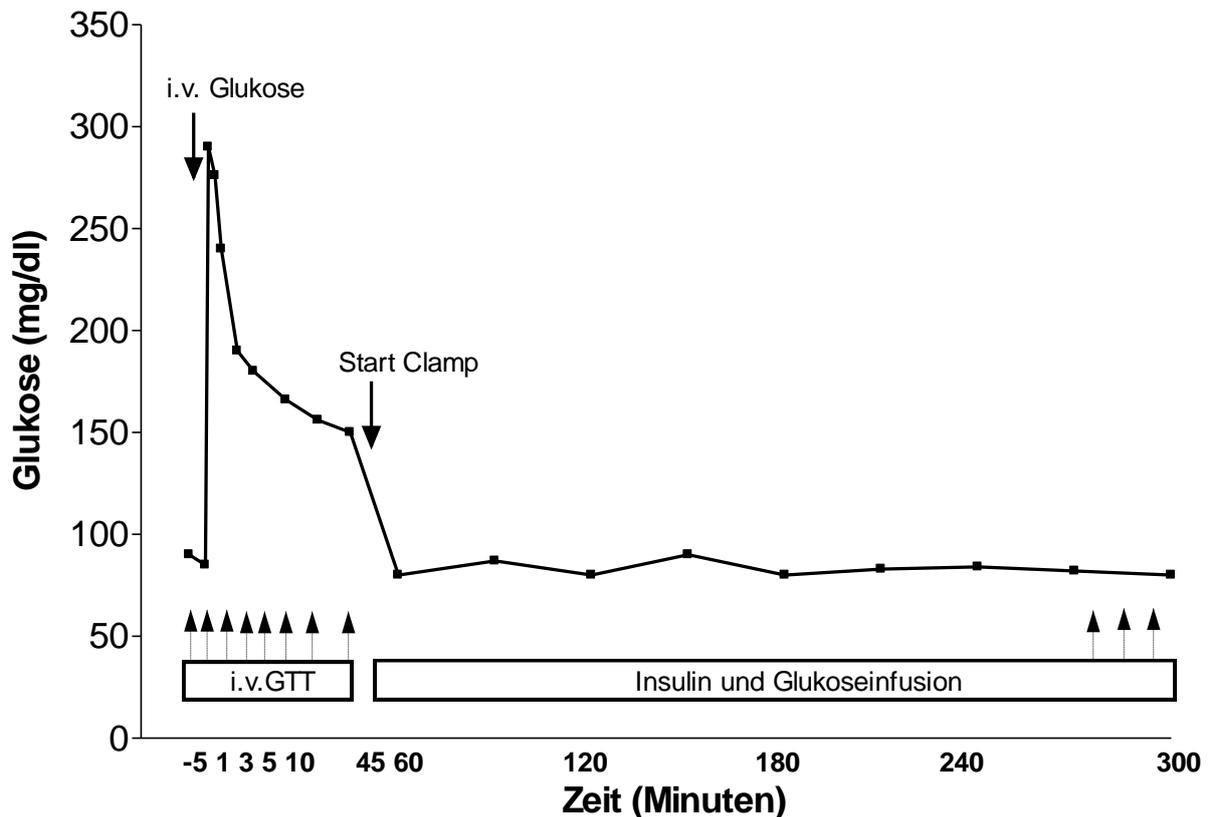
#### **III.3.2 Hyperinsulinämischer euglykämischer Glukose-Clamp-Test**

Die sogenannte „Glukose-Clamp-Technik“ wurde ursprünglich 1979 von DeFronzo et al. (DeFronzo et al., 1979) entwickelt und gilt bis heute als Goldstandard zur Quantifizierung der Insulinsensitivität in vivo. Der hyperinsulinämische euglykämische

Glukose-Clamp-Test ermöglicht es, bei einer hohen Insulinkonzentration und unter „Steady State“-Bedingungen direkt die Ganzkörper-Glukose-Utilisation abzuschätzen. Das Prinzip der Clamp-Technik beruht darauf, durch eine konstante Insulininfusion und eine variable Glukoseinfusion ein Insulin- und Glukose-„Steady State“-Niveau zu erzeugen, während dessen die Glukoseaufnahme in Skelettmuskel und Fettgewebe in einem Gleichgewicht liegt und durch die hohen Insulinspiegel die Glukoneogenese unterdrückt wird. Durch die Adaptation der Glukoseinfusionsgeschwindigkeit an die Glukoseaufnahme wird die Plasmaglukosekonzentration auf physiologischem (= euglykämischem) Niveau gehalten. Nach Erreichen konstanter Glukosewerte bestehen typischerweise „Steady State“-Bedingungen für die Plasmainsulinkonzentration, die Plasmaglukosekonzentration und die Glukoseinfusionsrate. Unter der Annahme, dass durch die Hyperinsulinämie die Glukoneogenese vollständig unterdrückt ist und sich die Plasmaglukosekonzentration während des „Steady State“ nicht verändert, muss die Glukoseinfusionsrate gleich der Ganzkörper-Glukose-Utilisation sein (Muniyappa et al., 2008). Das bedeutet, dass Probanden mit einer hohen Insulinsensitivität viel Glukose in ihrem Körper verstoffwechseln und daher eine ebenfalls hohe Glukosezufuhr benötigen und umgekehrt.

Im Anschluss an den ivGTT legten wir die Hand, an der die Blutentnahmen durchgeführt wurden, in ein beheizbares Kissen, um arterialisiertes venöses Blut zur Bestimmung der Plasmaglukose zu erhalten und so die arteriovenöse Glukosedifferenz zu umgehen. Die Arterialisierung des venösen Blutes einer oberflächlichen Handrückenvene kann erreicht werden, indem man die Hand in eine wärmere Umgebung bringt (Soop et al., 2000). Nach korrekter Lagerung des Arms wurde die Plasmaglukose auf Werte zwischen 70 und 80 mg/dl durch eine kontinuierliche Insulininfusion (1 I.E./ml) mit einer Infusionsrate von 1,05 mU/kgKG/Std eingestellt. Über dieselbe Verweilkanüle wurde eine 20%-ige Glukoselösung gestartet, um die Plasmaglukose, die in sechsminütigen Abständen während des gesamten Tests am kontralateralen Arm gemessen wurde, konstant zu halten. Die Glukoseinfusion wurde solange adaptiert, bis der sogenannte „Steady State“ erreicht wurde, mindestens jedoch über 120 Minuten. Während dieser Phase erfolgten venöse Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 0, 15, 30 und 45 Minuten zur Bestimmung von Glukose, Insulin, Proinsulin, Glukagon, Cholesterin, Triglyceriden und freien Fettsäuren. Am Ende des Tests wurde die Insulininfusion gestoppt und die

Glukoselösung noch einige Minuten mit hoher Geschwindigkeit infundiert. Nach einer anschließenden Glukosemessung wurde der Proband aufgefordert, eine Mahlzeit einzunehmen. Die folgende Abbildung soll dazu dienen, graphisch darzustellen, wie sich die Plasmaglukosekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während des ivGTT und des Glukose-Clamp-Tests bei einer Kontrollperson verhält.



**Abbildung 3** Beispiel für den Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose-Clamp-Tests; Dargestellt ist die Plasmaglukosekonzentration über die Zeit. Die gestrichelten Pfeile zeigen die Blutentnahmen an.

### III.4 Laboruntersuchungen

#### III.4.1 Routine-Labor

Während der Untersuchungen wurde die Plasmaglukosekonzentration mit einem „bedside“-Glukoseanalysator bestimmt. Die Plasmaglukosemessungen für die weiteren Berechnungen wurden wie auch die Bestimmung von großem Blutbild,

HbA<sub>1c</sub>, Kreatinin, Harnstoff, Ferritin, Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Gamma-Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), Bilirubin, Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyceriden, CRP und TSH in der Abteilung für Klinische Chemie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität mit zertifizierten Labormethoden durchgeführt.

Die Blutproben für Hormonmessungen sowie für die Bestimmung der freien Fettsäuren wurden nach der Abnahme sofort auf Eis gekühlt, innerhalb von zwei Stunden zentrifugiert und das dadurch gewonnene Plasma bzw. Serum sofort abpipettiert und bei -80°C eingefroren. Für die Bestimmung von Glukagon wurden spezielle Plasmaröhrchen verwendet, die Aprotinin (300  $\mu$ l, 7700 KIU/ml) zur Hemmung der proteolytischen Degradation enthielten.

### **III.4.2 Experimenteller Teil im Labor**

#### ***III.4.2.1 Bestimmung von C-Peptid***

Der C-Peptid-Spiegel wurde aus Probandenserum über einen Radioimmunassay von Radim Diagnostics gemessen. Bei der Vorbereitung des Tests wurden die Proben aufgetaut, alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vor Gebrauch sorgfältig gemischt. Für jeden Testansatz wurden jeweils zwei Röhrchen für die TA (= Totalaktivität), den NSB (= nicht-spezifische Bindung), die B0 (= maximale Bindung), jeden Kalibrator, jede Probe und jedes Kontrollserum bereitgestellt, da in Doppelbestimmungen gemessen wurde. Zunächst wurden 0,1ml des Nullkalibrators in die Röhrchen für B0 und NSB pipettiert und bei der NSB zusätzlich 0,1ml destilliertes Wasser hinzugefügt. Daraufhin wurden 0,1ml der Kalibratoren, der Proben und des Kontrollserums in die entsprechenden Röhrchen gegeben und anschließend 0,1ml des radioaktiv markierten I<sup>125</sup>-C-Peptids in alle Röhrchen pipettiert. 0,1ml C-Peptid-Antiserum wurde in alle Röhrchen außer der für NSB und TA hinzugefügt. Danach wurde der Testansatz eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde 1,0ml 20%-iger TW-Polyethylenglykol-Lösung in alle Röhrchen mit Ausnahme der TA pipettiert und diese kurz auf einen Vortex-Mischer gestellt. Schließlich wurden die Röhrchen 25 Minuten lang bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand aus allen Röhrchen außer der TA dekantiert. Am Ende des Tests wurde die Aktivität in den Röhrchen mindestens eine Minute lang in einem Gammacounter gemessen.

Sensitivität: Der Assay erfasste Werte ab 0,1ng/ml.

Spezifität: Keine Kreuzreaktionen mit Glucagon, Gastrin 1-17, Gastrin 1-13, Gastrin 1-14, Proinsulin vom Rind und Schwein, Insulin vom Rind, Humaninsulin; Kreuzreaktion mit humanem Proinsulin 3,2%.

Intra- und Inter-Assay-Variation: 3,34 – 6,98% bei 0,64 – 8,78 ng/ml bzw. 3,23 – 6,23% bei 0,66 – 8,71 ng/ml.

### **III.4.2.2 Bestimmung von Glukagon**

Der Plasmaglukagonspiegel wurde über einen Radioimmunoassay von Millipore quantifiziert. Der Test erstreckte sich über drei Tage. In einer Vorbereitungsphase wurden die Proben aufgetaut und die Teströhrchen hergerichtet. Auch hier wurde in Doppelbestimmungen gemessen. Zu Beginn des Tests wurden 300µl Assaypuffer in die Röhrchen für die NSB, 200µl in die B0-Röhrchen und 100µl in alle restlichen Röhrchen gegeben. In einem nächsten Schritt wurden 100µl der Standards und Qualitätskontrollen in Doppelwerten aufgetragen. Ebenso wurde mit den Testproben verfahren. Anschließend wurden überall außer bei der TA und der NSB 100µl des Glukagon-Antikörpers hinzugefügt, die Testansätze auf einem Vortex-Schüttler gemischt, bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde der radioaktiv markierte I<sup>125</sup>-Glukagon-Tracer hydratisiert und jeweils 100µl davon in sämtliche Röhrchen gegeben. Wieder erfolgte eine gute Vermischung auf dem Vortex und die Proben wurden erneut bedeckt bei 4°C über Nacht gelagert. Am dritten Tag wurde 1,0ml kalten Präzipitationsreagenz zu allen Röhrchen mit Ausnahme der TA hinzugefügt, der Inhalt der Röhrchen auf dem Vortex gemischt und anschließend 20 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde ebenfalls bei 4°C für 20 Minuten mit 2000-3000 x g zentrifugiert. Unmittelbar danach wurden die Überstände aller Röhrchen außer der TA dekantiert und die Aktivität der Pellets mit einem Gammacounter gemessen.

Sensitivität: Der Assay erfasste Werte ab 20 pg/ml.

Spezifität: 100% für Glucagon, Kreuzreaktivität mit Oxyntomodulin <0,1%, keine Kreuzreaktionen mit Humaninsulin, humanem Proinsulin, humanem C-Peptid, Somatostatin und Pankreatischem Polypeptid.

Intra- und Interassay-Variation: 4,0 – 6,8 % bzw. 7,3 – 13,5% bei 60 – 220 pg/ml.

### **III.4.2.3 Bestimmung von Insulin**

Insulinkonzentrationen wurden aus Plasma mit Hilfe kommerzieller Assays bestimmt. Zunächst wurden die Proben bei Raumtemperatur ca. 30 Minuten lang aufgetaut und anschließend auf Eis gestellt. Zu Beginn des Tests wurde die Mikrotiterplatte vorbereitet, indem in jede Vertiefung 300µl verdünnten Waschpuffers gefüllt und für fünf Minuten darin belassen wurden. Anschließend wurden in alle Wells für die Plasmaproben der Testprobanden sowie in das des Leerwerts 20µl Assaypuffer pipettiert, in die Wells für Leerwert, Standardproben und Qualitätskontrollen wurden 20µl Matrixlösung gegeben. Im nächsten Schritt wurden jeweils 20µl der Standardproben in Doppelbestimmungen in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert. Genauso verfuhr man mit den beiden Qualitätskontrollen und den Patientenproben. Schließlich wurden überall 20µl Insulin-Detektionsantikörper aufgetragen und die Platte abgedeckt eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei mittlerer Geschwindigkeit (400 – 500rpm) inkubiert. Daraufhin wurde die komplette Flüssigkeit dekantiert und die Wells mehrmals sorgfältig mit Waschpuffer gereinigt. Nun wurden 100µl Enzymlösung in alle Wells pipettiert, worauf sich wieder eine diesmal 30-minütige Inkubationszeit auf dem Schüttler anschloss. Nach erneutem Waschen wurden 100µl Substratlösung aufgetragen, die Platte acht bis zehn Minuten auf den Schüttler gestellt und in einem letzten Schritt 100µl Stopplösung dazugegeben. Danach konnte die Platte bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch ausgewertet werden.

Sensitivität: Der Assay erfasst Werte ab 2 µU/ml.

Spezifität: Für humanes Insulin 100%, keine Kreuzreaktivität mit intaktem humanem Proinsulin und dessen größerem Zwischenprodukt Des(31,32)Human Proinsulin, aber mit dem kleineren Zwischenprodukt Des(64,65)Human Proinsulin (117%).

Intra- und Inter-Assay-Variation: 4,6 – 7,0% bzw. 9,1 – 11,4% bei 5,96 – 10, 3 µU/ml.

### **III.4.2.4 Bestimmung von Proinsulin**

Proinsulinkonzentrationen wurden ebenfalls aus Plasma mit Hilfe kommerzieller Assays bestimmt. Zunächst wurden die Proben bei Raumtemperatur ca. 30 Minuten lang aufgetaut und anschließend auf Eis gestellt. Zu Beginn des Tests wurde die Mikrotiterplatte vorbereitet, indem in jede Vertiefung 300µl verdünnten Waschpuffers gefüllt und wieder dekantiert wurden. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden in alle Wells für die Plasmaproben der Testprobanden sowie in

das des Leerwerts 50µl Assaypuffer pipettiert, in die Wells für Leerwert, Standardproben und Qualitätskontrollen wurden 50µl Matrixlösung gegeben. Im nächsten Schritt wurden jeweils 50µl der Standardproben in Doppelbestimmungen in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert. Genauso verfuhr man mit den beiden Qualitätskontrollen und den Patientenproben. Daraufhin wurde die Platte abgedeckt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei mittlerer Geschwindigkeit (400 – 500rpm) inkubiert. Anschließend wurde die komplette Flüssigkeit abgeschüttet und die Wells mehrmals sorgfältig mit Waschpuffer gereinigt. Nun wurden überall 100µl Proinsulin-Detektionsantikörper aufgetragen und die Platte erneut für eine Stunde zum Inkubieren auf den Schüttler gestellt. Nach einer nochmaligen Waschung wurden 100µl Enzymlösung in alle Wells pipettiert, worauf sich wieder eine diesmal 30-minütige Inkubationszeit auf dem Schüttler anschloss. Nach erneutem Waschen wurden 100µl Substratlösung aufgetragen, die Platte 15 bis 25 Minuten auf den Schüttler gestellt und in einem letzten Schritt 100µl Stopplösung dazugegeben. Danach konnte die Platte bei einer Wellenlänge von 450nm – 590nm photometrisch ausgewertet werden.

Sensitivität: Der Assay erfasst Werte ab 0,1 pM.

Spezifität: Für humanes intaktes Proinsulin 100%, keine Kreuzreaktivität mit humanem Insulin bei Werten bis zu 10nM, keine Kreuzreaktivität mit dem größerem Zwischenprodukt Des(31,32)Human Proinsulin, aber geringe mit dem kleineren Zwischenprodukt Des(64,65)Human Proinsulin (36%); Anwesenheit von Insulin (bis zu 208 µU/ml) stört die Ergebnisse des Assays nicht. Weiterhin keine Kreuzreaktivitäten zu Proinsulin vom Rind oder Schwein sowie zum Insulin des Rinds, des Schafs, des Schweins und der Ratte.

Intra- und Inter-Assay-Variation: 0,4 – 7,7 % bzw. 3,3 – 9,0 % bei 1,41 – 29,1 pM/l.

#### **III.4.2.5 Bestimmung freier Fettsäuren**

Die Bestimmung der freien Fettsäuren („non-esterified fatty acids“ = NEFA oder „free fatty acids“ = FFAs) erfolgte aus Serum unter Verwendung des Wako NEFA-HR(2)-Tests. Zuerst wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut und anschließend jeweils 25µl der Proben sowie 25µl eines Standards in bereits vorbereitete Küvetten pipettiert. In die erste Küvette, die als Reagenzleerwert diente, wurden statt einer Probe 25µl destilliertes Wasser gefüllt. Daraufhin wurden in alle Küvetten 1000µl des Farbreagens A gegeben, der Inhalt gut gemischt und genau 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden 500µl des Farbreagens B hinzugefügt

und wiederum eine genau 15-minütige Inkubationszeit bei 25°C eingehalten. Gleich darauf wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 550nm gegen den Reagenzleerwert gemessen, wobei das Gerät zuvor linear kalibriert worden war.

## III.5 Berechnungen

### III.5.1 Parameter für die Insulinsensitivität

Aus den basalen Insulin- und Glukosemessungen wurden mehrere etablierte Indices zur Beurteilung der Insulinsensitivität berechnet. HOMA („homeostatic model assessment“) wurde erstmals 1985 beschrieben und stellt eine Methode zur Erfassung der  $\beta$ -Zell-Funktion und Insulinsensitivität aus basalen Glukose-, Insulin- oder C-Peptidkonzentrationen dar. Dabei spiegelt das Verhältnis zwischen Glukose- und Insulinkonzentrationen im Nüchternzustand die Balance zwischen hepatischer Glukoseproduktion und pankreatischer Insulinausschüttung wider.

HOMA-IR („homeostatic model assessment of insulin resistance“), ein Parameter zur Einschätzung der Insulinsensitivität, wird aus  $(\text{Nüchtern-Insulin (mU/l)} \times \text{Nüchtern-Glukose (mmol/l)}) / 22,5$  berechnet (Wallace et al., 2004).

Ein weiterer Index für die Insulinsensitivität, Quicki („quantitative insulin sensitivity check index“) wurde im Jahr 2000 eingeführt und weist gute Korrelationen zu den aus dem Clamp-Test erhobenen Insulinsensitivitätsindices auf. Er berechnet sich aus  $1 / (\log(\text{Nüchtern-Insulin}(\mu\text{U/ml})) + \log(\text{Nüchtern-Glukose}(\text{mg/dl})))$  (Katz et al., 2000).

Bei nichtdiabetischen Testpersonen können des Weiteren  $1 / \text{Nüchtern-Insulin (mU/l)}$  und die  $\text{Nüchtern-Glukose (mg/dl)} / \text{Nüchtern- Insulin (mU/l)}$  – Ratio zur Beurteilung der Insulinsensitivität herangezogen werden. Dabei geht man davon aus, dass bei nichtdiabetischen Probanden, die jedoch bereits eine Insulinresistenz aufweisen, die Nüchtern-Insulinkonzentration oberhalb der Norm liegen muss (Muniyappa et al., 2008).

Aus dem Glukose-Clamp-Versuch kann unmittelbar die Insulin-vermittelte Ganzkörper-Glukose-Utilisation unter „Steady State“-Bedingungen eingeschätzt werden (Muniyappa et al., 2008). Die zur Aufrechterhaltung des Ausgangsblutzuckers erforderliche Menge an infundierter Glukose, die GIR (Glukoseinfusionsrate während der letzten 45 Minuten des Clamp-Tests), wird auf das Körpergewicht bezogen und in  $\text{mg/kg*min}$  ausgedrückt.

Die Insulinsensitivität wird durch den Insulinsensitivitätsindex ISI beschrieben. Für die Berechnung des ISI teilt man die GIR durch die gemittelte Plasmainsulinkonzentration während des „Steady State“. Er wird in mg/kg\*min pro  $\mu\text{U/ml}$  angegeben (Constantinidou, 2008).

### III.5.2 Parameter für die Insulinsekretion

Der aus basalen Blutentnahmen erhobene Index HOMA-%B dient der Quantifizierung der Insulinsekretion und wird folgendermaßen berechnet:  $(20 \times \text{Nüchtern-Insulin (mU/l)}) / (\text{Nüchtern-Glukose (mmol/l)} - 3,5)$  (Wallace et al., 2004).

Aus den Messungen des ivGTT lassen sich weitere Erkenntnisse über die Insulinsekretion der Testpersonen gewinnen. Die „acute insulin response“ (AIR) beschreibt die erste Phase der Insulinausschüttung innerhalb von zehn Minuten nach Verabreichung des Glukosebolus. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um die unmittelbare Insulinfreisetzung aus bereits gespeicherten Granula. Für die AIR werden die Plasmainsulinkonzentrationen ( $\mu\text{U/ml}$ ) zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 5, und 10 Minuten graphisch dargestellt und die „area under the curve“ (AUC) für diesen Abschnitt ermittelt.

Ein weiterer Parameter für die Insulinsekretion, die „first phase insulin response“ (FPIR) stellt die Summe der Insulinkonzentrationen ( $\mu\text{U/ml}$ ) zu den Zeitpunkten 1 und 3 Minuten dar.

Die späte Phase der Insulinausschüttung wird durch Berechnung der AUC zu den Zeitpunkten 10, 15, 25 und 35 Minuten konkretisiert. In der späten Phase spielen vor allem Insulinneusynthese und -prozessierung sowie der Transport der Granula und das Andocken derselben an die Zellmembran eine Rolle, bevor es zur Ausschüttung des Botenstoffs in die Blutbahn kommt (Cobelli et al., 2007).

Für die Beurteilung der Proinsulinsekretion wurden ebenfalls die AUCs für die frühe (0 – 10 min) und späte (10 – 35 min) Phase ermittelt. Zudem wurde die Proinsulin / Insulin – Ratio für die Zeitpunkte -5, 0, 1, 3, 5, 10, 15, 25 und 35 des ivGTT kalkuliert.

Darüber hinaus ermittelten wir den Index Delta Insulin / Delta Glukose, wobei der Delta-Wert die Differenz zwischen Insulin- bzw. Glukosekonzentrationen zu einem bestimmten Zeitpunkt und dem basalen Wert darstellt. Wir setzten 3, 5 und 10 Minuten als Zeitpunkte ein.

Außerdem wurde der „Disposition Index“ (DI) aus FPIR x ISI berechnet. Hier nimmt man an, dass die Glukosetoleranz eines Individuums mit dem Produkt aus  $\beta$ -Zell-Funktion und Insulinsensitivität korreliert. Eine Insulinresistenz wird dabei zunächst durch eine adäquat gesteigerte Insulinsekretion ausgeglichen und eine normale Glukosetoleranz kann beibehalten werden. Ein vereinfachtes Modell beschreibt die Beziehung zwischen beiden Variablen als nahezu hyperbolisch, sodass das Produkt beider bei Individuen mit gleicher Glukosetoleranz konstant ist. Der DI misst demnach die  $\beta$ -Zell-Funktion und ihre Kapazität zur Produktionssteigerung in Bezug auf die Insulinwirksamkeit während eines Glukosestimulus (Cobelli et al., 2007). Schließlich berechneten wir einen Risikoindex aus HOMA-IR / FPIR.

### **III.6 Statistische Auswertung**

Alle Daten sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zunächst wurden die drei Testgruppen über den Kruskal-Wallis-Test unabhängiger Stichproben verglichen und anschließend signifikant unterschiedliche anthropometrische und metabolische Parameter nach dem Abschlusstestprinzip genauer untersucht. Dabei wurden Paarvergleiche zwischen der Kontrollgruppe auf der einen und den beiden Risikogruppen auf der anderen Seite angestellt, wobei der Mann-Whitney-Test unabhängiger Stichproben angewandt wurde. Unterschiede mit einem p-Wert  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## IV. Ergebnisse

### IV.1 Grundcharakterisierung der Studienpopulation

Die Grundcharakterisierung der 65 Studienteilnehmer ist in Tabelle 4 dargestellt.

	Kontrollen (n = 24)	FTO Risikogenträger (n = 24)	TCF7L2 Risikogenträger (n = 17)	p-Wert
<b>Alter (Jahre)</b>	50.83 ± 10.58	50.13 ± 10.26	57.71 ± 10.42	0.067
<b>Größe (cm)</b>	179.71 ± 7.69	178.00 ± 6.36	177.59 ± 6.48	0.581
<b>Gewicht (kg)</b>	87.44 ± 9.04	83.85 ± 11.87	85.29 ± 12.13	0.553
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.10 ± 2.66	26.44 ± 3.36	26.96 ± 2.80	0.735
<b>Bauchumfang (cm)</b>	99.79 ± 7.63	97.39 ± 10.22	99.88 ± 9.92	0.753
<b>Blutdruck (mmHg)</b>				
<b>systolisch/</b>	139.58 ± 18.59	139.00 ± 17.42	141.94 ± 14.62	0.488
<b>diastolisch</b>	83.04 ± 11.39	81.64 ± 11.03	85.29 ± 11.14	0.566
<b>Diabetes in der Familie</b>	7/24 (29.2%)	12/24 (50%)	7/17 (41.2%)	

**Tabelle 4** Grundcharakterisierung der Studienpopulation

Wir fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen in Bezug auf Alter, Größe, Gewicht, BMI, Bauchumfang, systolischen und diastolischen Blutdruck sowie Familienanamnese unter Berücksichtigung erst- und zweitgradig Verwandter.

Eine Gegenüberstellung der drei Gruppen hinsichtlich basaler Laborparameter folgt in Tabelle 5.

	Kontrollen (n = 24)	FTO (n = 24)	TCF7L2 (n = 17)	p-Wert
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	5.53 ± 0.25	5.59 ± 0.27	5.72 ± 0.33	0.293
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	0.90 ± 0.13	0.83 ± 0.12	0.85 ± 0.15	0.248

<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	14.96 ± 3.26	15.43 ± 3.41	13.94 ± 3.42	0.357
<b>Ferritin (mg/dl)</b>	369.92 ± 447.61	220.37 ± 144.52	183.29 ± 103.49	0.074
<b>Cholesterin (mg/dl)</b>	201.13 ± 27.97	202.96 ± 35.15	206.65 ± 34.20	0.823
<b>LDL (mg/dl)</b>	119.54 ± 31.75	117.92 ± 30.07	123.65 ± 25.37	0.583
<b>HDL (mg/dl)</b>	53.00 ± 14.05	60.29 ± 18.32	60.53 ± 19.30	0.312
<b>Triglyceride (mg/dl)</b>	143.29 ± 75.82	123.92 ± 49.55	114.12 ± 50.72	0.380
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	0.64 ± 0.26	0.88 ± 0.46	0.65 ± 0.25	0.075
<b>ASAT (U/l)</b>	30.65 ± 13.02	28.96 ± 17.21	25.56 ± 5.37	0.439
<b>ALAT (U/l)</b>	39.00 ± 23.19	28.13 ± 20.65	25.88 ± 9.62	<b>0.036</b>
<b>γ-GT (U/l)</b>	76.21 ± 92.54	46.13 ± 32.49	37.69 ± 16.14	0.103
<b>CRP (mg/dl)</b>	0.34 ± 0.56	0.18 ± 0.15	0.22 ± 0.18	0.700
<b>TSH (μU/ml)</b>	1.69 ± 0.77	1.49 ± 0.86	1.89 ± 1.15	0.551
<b>Nüchtern-Glukose (mg/dl)</b>	96.79 ± 9.74	96.75 ± 7.76	97.88 ± 10.92	0.734
<b>Nüchtern-Insulin (μU/ml)</b>	6.17 ± 2.74	6.28 ± 6.11	5.33 ± 2.97	0.566
<b>Nüchtern-Proinsulin (pmol/l)</b>	3.43 ± 3.33	3.29 ± 1.85	2.92 ± 2.62	0.300
<b>Nüchtern-C-Peptid (ng/ml)</b>	2.78 ± 1.60	2.49 ± 1.13	2.46 ± 1.07	0.755
<b>Nüchtern-Glukagon (pg/ml)</b>	77.92 ± 41.44	91.70 ± 42.51	50.41 ± 26.58	<b>0.004</b>

**Tabelle 5** Basale Laborparameter in den verschiedenen Studiengruppen

Wir konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Laborwerte HbA<sub>1C</sub>, Kreatinin, Harnstoff, Ferritin, Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyceriden, Bilirubin, ASAT, γ-GT, CRP, TSH, Nüchtern-Plasmaglukose, Nüchtern-Plasmainsulin, Nüchtern-Plasmaproinsulin und Nüchtern-Serum-C-Peptid feststellen. Die Transaminasenwerte (ALAT) lagen bei den Kontrollpersonen geringgradig höher als bei den FTO- und den TCF7L2-Risikoträgern ( $p < 0,04$ ). Der Nüchtern-Plasmaglukagonspiegel war bei den Trägern von TCF7L2 rs7903146 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erniedrigt ( $p < 0,004$ ). Einen gestörten Nüchternblutzucker (100-125 mg/dl) wiesen in der Kontrollgruppe zehn Probanden

(41,67%), in der FTO-Risikogengruppe acht Probanden (33,33%) und in der TCF7L2-Gruppe zehn Probanden (58,82%) auf.

## IV.2 Metabolische Charakterisierung der Probanden

Für die metabolische Charakterisierung der Probanden wurden basale Stoffwechselwerte und die Hormonsekretion nach intravenöser Glukosegabe sowie die Insulinsensitivitätsparameter im Glukose-Clamp-Test verglichen.

Bei dem aus basalen Messungen berechneten Parameter zur Einschätzung der Insulinsekretion HOMA-%B konnten wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Trägern der Risikogenvarianten und der Kontrollgruppe erheben.

Die basalen Indices für die Beurteilung der Insulinsensitivität HOMA-IR, Quicki,  $1 / \text{Nüchtern-Insulin}$  und  $\text{Nüchtern-Glukose} / \text{Nüchtern-Insulin} - \text{Ratio}$  waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Trägern der Risikogenvarianten und der Kontrollgruppe (Tabelle 6).

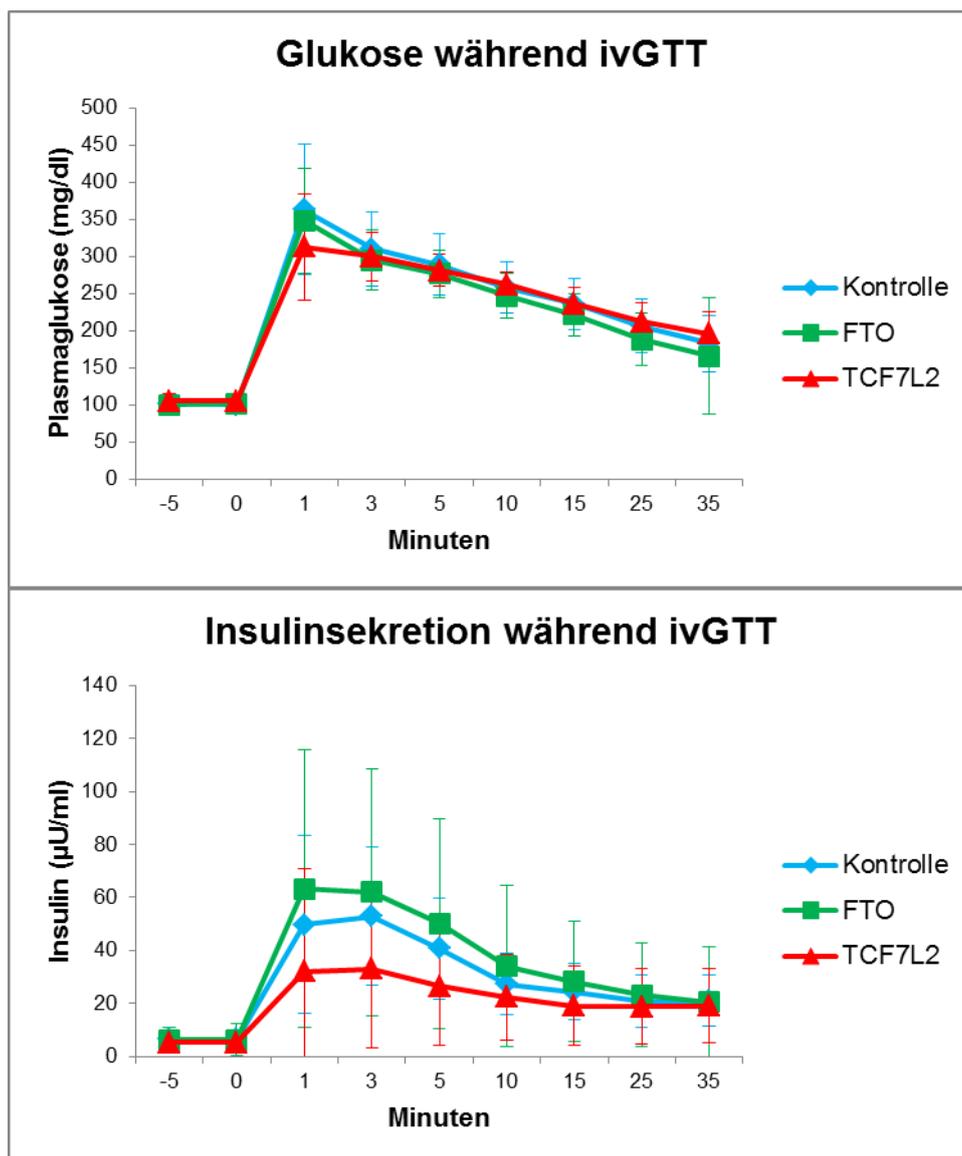
	Kontrollen (n = 24)	FTO Risikogenträger (n = 24)	TCF7L2 Risikogenträger (n = 17)	p-Wert
<b>HOMA-%B</b>	75.25 ± 40.52	67.08 ± 60.49	63.76 ± 38.10	0.367
<b>HOMA-IR</b>	1.51 ± 0.62	1.52 ± 1.47	1.35 ± 0.70	0.449
<b>Quicki</b>	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.06	0.38 ± 0.04	0.449
<b>1 / Nüchtern-Insulin</b>	0.19 ± 0.08	0.30 ± 0.27	0.24 ± 0.10	0.410
<b>Nüchtern-Glukose / Nüchtern-Insulin – Ratio</b>	18.02 ± 8.22	27.89 ± 24.52	22.99 ± 13.00	0.322

**Tabelle 6** Basale Indices für Insulinsekretion und Insulinsensitivität

### IV.2.1 Intravenöser Glukosetoleranztest

Durch die intravenöse Glukosebolusgabe kommt es zu einer sehr schnellen und starken Sekretion von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen. Auf diese Weise kann die maximale Insulinsekretionskapazität während einer frühen und späten Phase bestimmt werden.

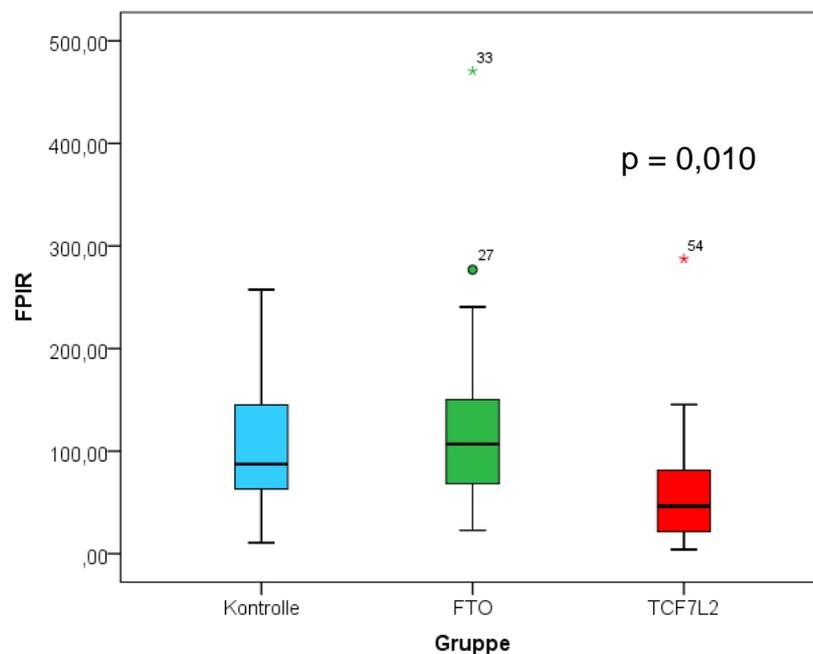
Die Plasma-Glukosekonzentrationen waren im Verlauf des Tests unter den Gruppen sehr ähnlich und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Beim Insulinsekretionsverhalten traten deutliche Unterschiede zutage. Die Plasma-Insulinspiegel in der TCF7L2-Gruppe waren zu den Zeitpunkten 1, 3 und 5 Minuten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ( $p = 0,021$  /  $p = 0,015$  /  $p = 0,015$ ). In der FTO-Risikogengruppe war ein nicht-signifikanter Trend zu höheren Insulinwerten erkennbar (Abbildung 4).



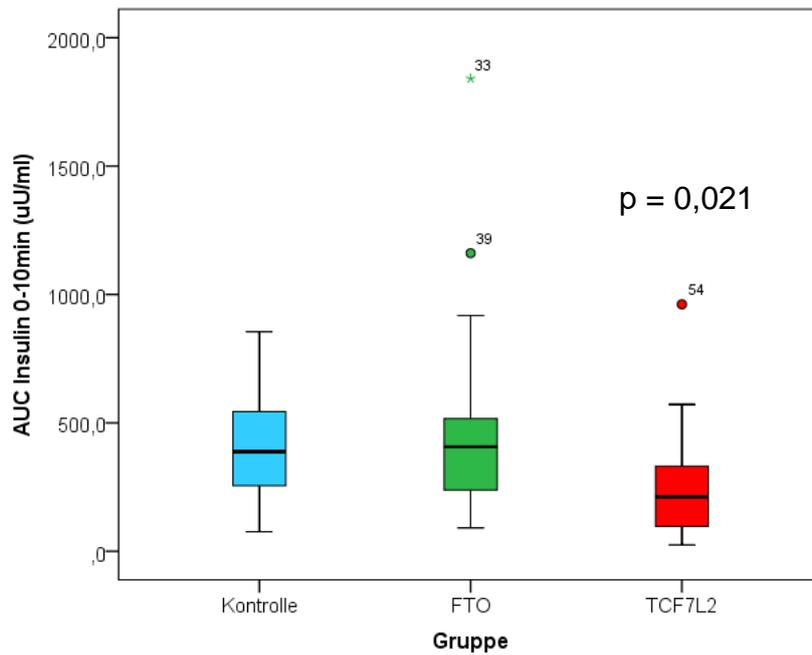
**Abbildung 4** Plasma-Glukosespiegel und Plasma-Insulinspiegel während des ivGTT

#### IV.2.1.1 Analyse der frühen Phase der Insulinsekretion nach intravenöser Glukosegabe

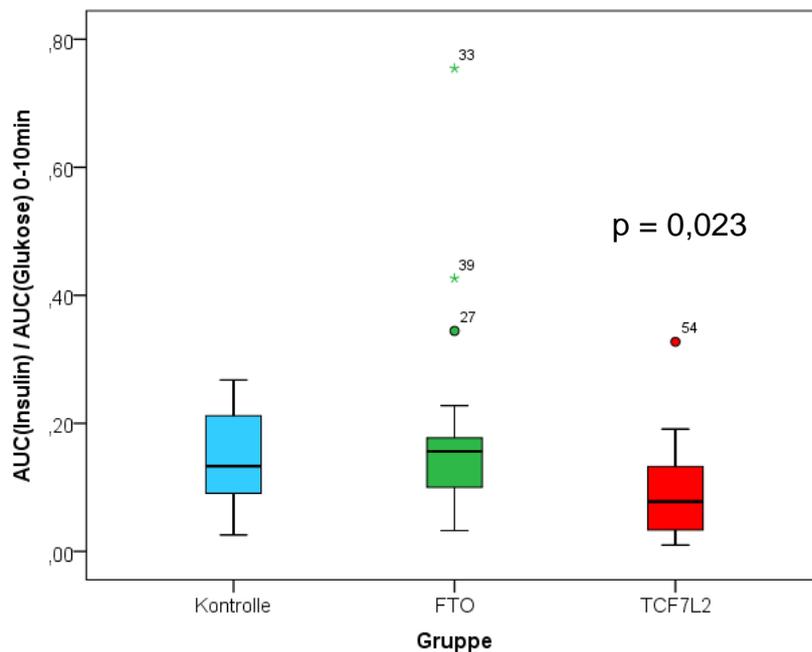
Die Indices FPIR ( $p = 0,010$ ) und AIR ( $p = 0,021$ ) wiesen auf eine gestörte  $\beta$ -Zell-Funktion bei Trägern des TCF7L2-Risikopolymorphismus hin, vor allem hinsichtlich der Insulinausschüttung in der frühen Phase, da beide Parameter in der betreffenden Gruppe signifikant bezüglich der Kontrollgruppe erniedrigt waren (Abbildung 5, 6). Teilte man die AUC der frühen Insulinausschüttung zusätzlich durch die AUC der Plasma-Glukosekonzentrationen während der ersten zehn Minuten des ivGTT, ergab sich ebenfalls eine statistisch signifikante Abweichung ( $p = 0,023$ ) der TCF7L2-Gruppe zur Kontrollgruppe (Abbildung 7). Bei den FTO-Risikoträgern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollpersonen (Tabelle 7).



**Abbildung 5** Darstellung der ersten Phase der Insulinsekretion (FPIR) in den Studiengruppen



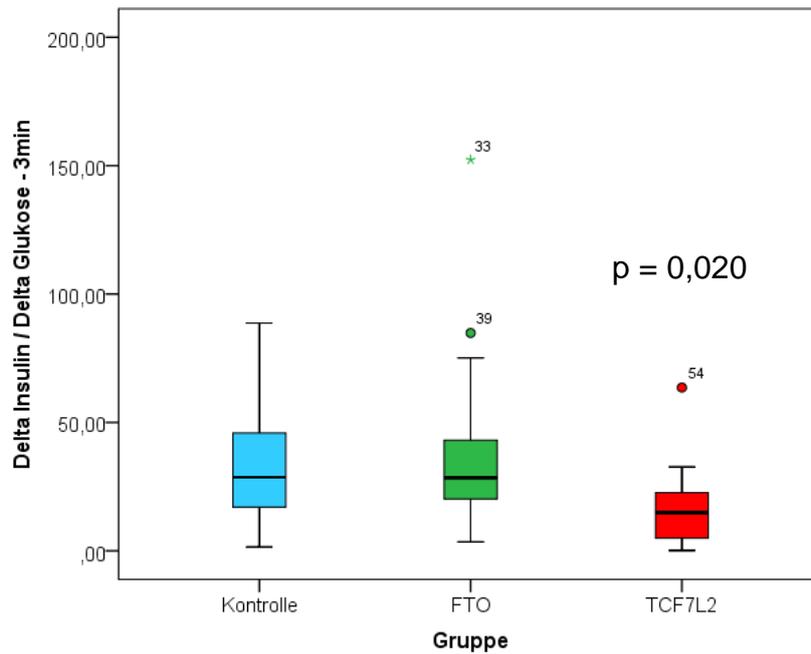
**Abbildung 6** Darstellung der „acute insulin response“ AIR (AUC Plasma-Insulinspiegel 0 – 10 Minuten) in den Studiengruppen



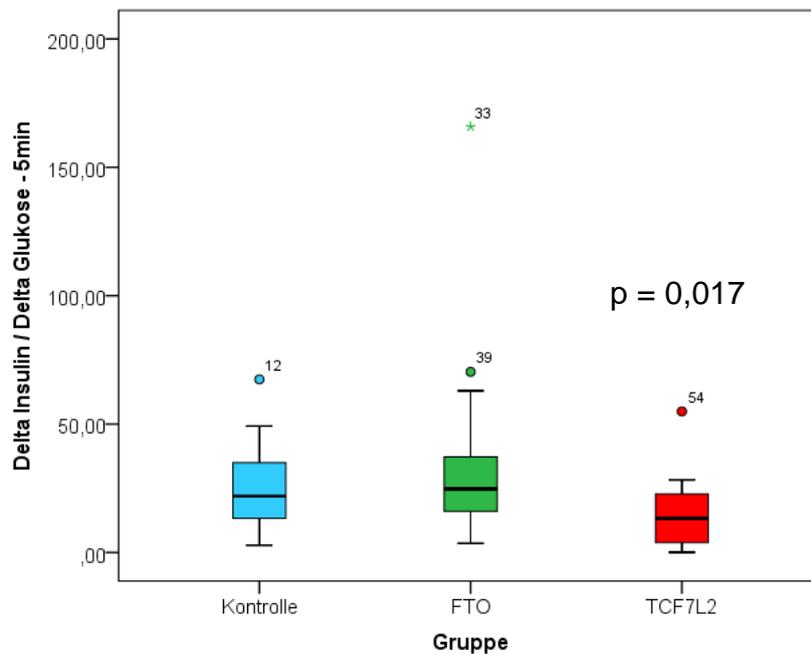
**Abbildung 7** Darstellung der Area under the Curve (AUC) für Insulin dividiert durch AUC für Glukose für die frühe Phase des ivGTT (0 – 10 Minuten)

Auch bei dem weiteren Parameter für die frühe Insulinsekretion Delta Insulin / Delta Glukose ließ sich zu den Zeitpunkten  $x = 3$  ( $p = 0,020$ ) und  $x = 5$  ( $p = 0,017$ ) Minuten

eine statistisch signifikante Erniedrigung bei den TCF7L2 rs7903146-Probanden gegenüber den Kontrollpersonen verzeichnen (Abbildung 8 und 9).



**Abbildung 8** Darstellung von Delta Insulin / Delta Glukose im ivGTT als Maß für die Insulinsekretion zum Zeitpunkt 3 Minuten



**Abbildung 9** Darstellung von Delta Insulin / Delta Glukose im ivGTT als Maß für die Insulinsekretion zum Zeitpunkt 5 Minuten

#### ***IV.2.1.2 Analyse der späten Phase der Insulinsekretion nach intravenöser Glukosegabe***

Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der späten Phase der Insulinsekretion (AUC Insulin 10 – 35 Minuten sowie Delta Insulin / Delta Glukose für  $x = 10\text{min}$ ) zwischen den Testgruppen feststellen (Tabelle 7).

#### ***IV.2.1.3 Analyse der Proinsulinspiegel***

Bei der Analyse der Proinsulinspiegel wurde in der TCF7L2-Gruppe ein Trend zu niedrigeren Proinsulinwerten im Vergleich zu den Kontrollpersonen beobachtet, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 10). Ebenso war die Proinsulin / Insulin – Ratio der Träger von TCF7L2 rs7903146 vor allem zu den Zeitpunkten 1, 3 und 5 Minuten nach Injektion des Glukosebolus im Vergleich zu den Kontrollpersonen nicht-signifikant erhöht (Abbildung 10). Die Träger der FTO-Risikopolymorphismen unterschieden sich kaum von der Kontrollgruppe hinsichtlich der Proinsulinspiegel und der Proinsulin / Insulin – Ratio während des ivGTT. Darüber hinaus ergaben weder die AUCs der Plasma-Proinsulinkonzentrationen der frühen und späten Phase, noch die AUC über den gesamten ivGTT signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Tabelle 7).

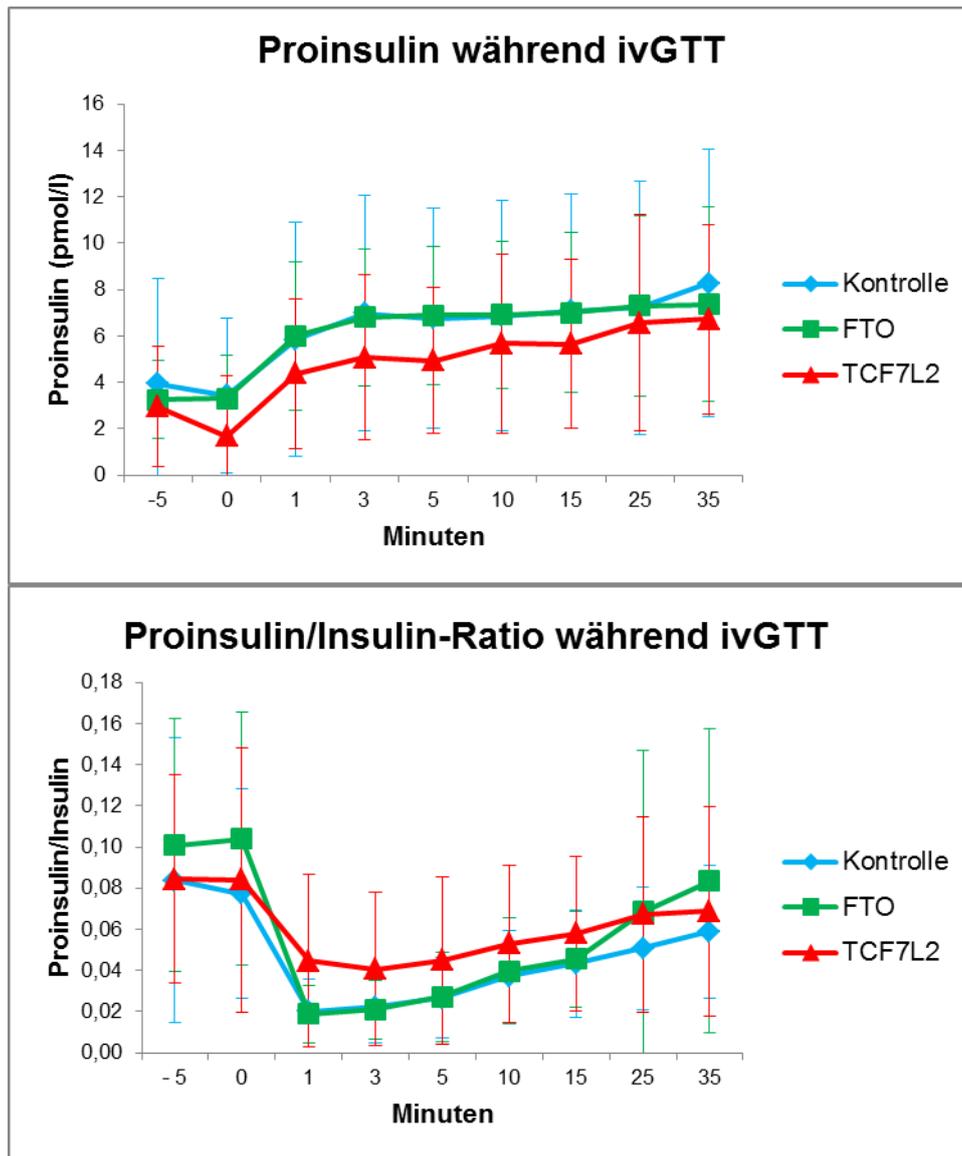


Abbildung 10 Plasma-Proinsulinspiegel und Proinsulin / Insulin – Ratio während des ivGTT

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des ivGTT.

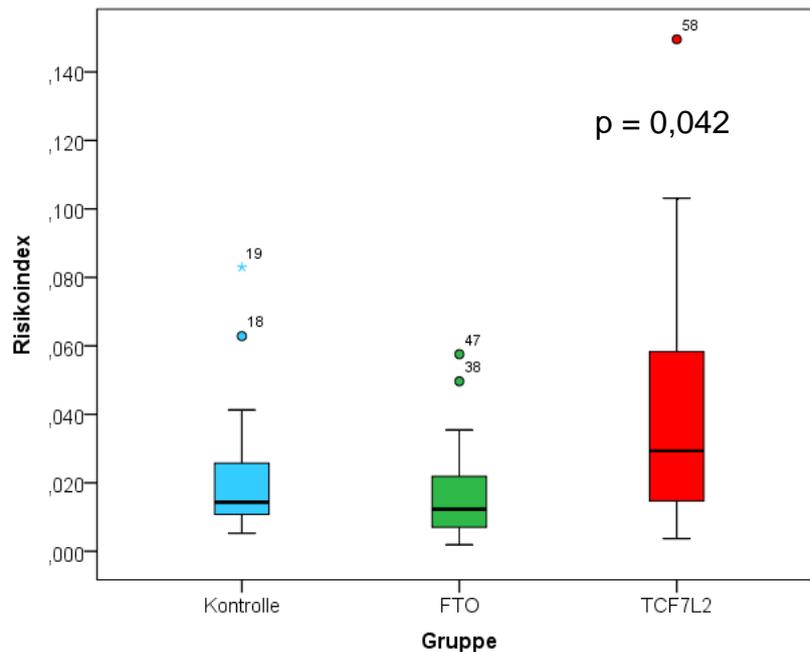
	Kontrollen (n = 24)	p-Wert (Kontrolle vs. FTO)	FTO Risikogen- träger (n = 24)	p-Wert (Kontrolle vs. TCF7L2)	TCF7L2 Risikogen- träger (n = 17)	p-Wert gesamt
<b>FPIR</b>	102.59 ± 58.14	0.578	125.19 ± 97.32	<b>0.010</b>	64.96 ± 69.44	<b>0.010</b>

<b>AUC</b> <b>Glukose</b> <b>0 – 10 min</b>	2859.13 ± 454.74		2746.46 ± 346.10		2756.65 ± 265.35	0.585
<b>AUC</b> <b>Glukose</b> <b>10 – 35 min</b>	5380.83 ± 885.22		4978.83 ± 829.92		5516.18 ± 575.17	0.121
<b>AUC</b> <b>Glukose</b> <b>0 – 35 min</b>	8239.96 ± 1281.49		7725.29 ± 1085.11		8272.82 ± 705.79	0.275
<b>AUC</b> <b>Insulin 0 –</b> <b>10 min</b>	394.14 ± 189.35	0.837	481.84 ± 381.08	<b>0.021</b>	264.87 ± 237.27	<b>0.023</b>
<b>AUC</b> <b>Insulin</b> <b>10 – 35 min</b>	563.58 ± 250.92		629.92 ± 506.90		481.83 ± 360.62	0.354
<b>AUC</b> <b>Insulin</b> <b>0 – 35 min</b>	957.73 ± 402.13		1111.76 ± 822.87		746.70 ± 565.72	0.127
<b>AUC</b> <b>Proinsulin</b> <b>0 – 10 min</b>	65.25 ± 47.97		65.63 ± 29.20		49.64 ± 33.62	0.131
<b>AUC</b> <b>Proinsulin</b> <b>10 – 35 min</b>	183.76 ± 131.74		179.67 ± 90.73		155.74 ± 102.98	0.565
<b>AUC</b> <b>Proinsulin</b> <b>0 – 35 min</b>	249.00 ± 179.05		245.30 ± 116.65		205.38 ± 136.12	0.401
<b>AUC(Ins) /</b> <b>AUC(Glu)</b> <b>0 – 10 min</b>	0.14 ± 0.07	0.680	0.18 ± 0.15	<b>0.023</b>	0.09 ± 0.10	<b>0.019</b>
<b>AUC(Ins) /</b> <b>AUC(Glu)</b> <b>10 – 35 min</b>	0.11 ± 0.05		0.13 ± 0.11		0.09 ± 0.10	0.253
<b>AUC(Ins) /</b> <b>AUC(Glu)</b> <b>0 – 35 min</b>	0.12 ± 0.05		0.15 ± 0.12		0.09 ± 0.07	0.286

<b>AUC(Pro) /</b>	0.18		0.18		0.32	0.286
<b>AUC(Ins)</b>	± 0.12		± 0.13		± 0.27	
<b>0 – 10 min</b>						
<b>AUC(Pro) /</b>	0.34		0.38		0.44	0.664
<b>AUC(Ins)</b>	± 0.20		± 0.25		± 0.30	
<b>10 – 35 min</b>						
<b>AUC(Pro) /</b>	0.27		0.28		0.39	0.648
<b>AUC(Ins)</b>	± 0.17		± 0.16		± 0.29	
<b>0 – 35 min</b>						
<b>Delta Ins /</b>	31.46	0.695	37.42	<b>0.020</b>	17.06	<b>0.010</b>
<b>Delta Glu</b>	± 20.80		± 31.23		± 16.20	
<b>x = 3 min</b>						
<b>Delta Ins /</b>	25.23	0.550	33.19	<b>0.017</b>	14.60	<b>0.013</b>
<b>Delta Glu</b>	± 16.05		± 33.08		± 14.00	
<b>x = 5 min</b>						
<b>Delta Ins /</b>	17.67		25.00		13.58	0.078
<b>Delta Glu</b>	± 9.33		± 28.68		± 11.80	
<b>x = 10 min</b>						

**Tabelle 7** Ergebnisse des ivGTT

Der Disposition Index unterschied sich nicht signifikant zwischen den Trägern der TCF7L2- und FTO-Risikoallele und den Kontrollprobanden ( $p = 0,143$ ). Dagegen zeigten die Träger des TCF7L2 rs7903146-Polymorphismus einen signifikant erhöhten Risikoindex ( $p = 0,042$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 11).



**Abbildung 11** Risikoindex (HOMA-IR dividiert durch FPIR) bei FTO-, TCF7L2-Risikoträgern und Kontrollpersonen

## IV.2.2 Hyperinsulinämischer euglykämischer Glukose-Clamp-Test

Der hyperinsulinämische euglykämische Glukose-Clamp-Test stellt den Goldstandard für die Bestimmung der Insulinsensitivität in vivo dar.

### IV.2.2.1 Assoziation zwischen Genpolymorphismen und Insulinsensitivität

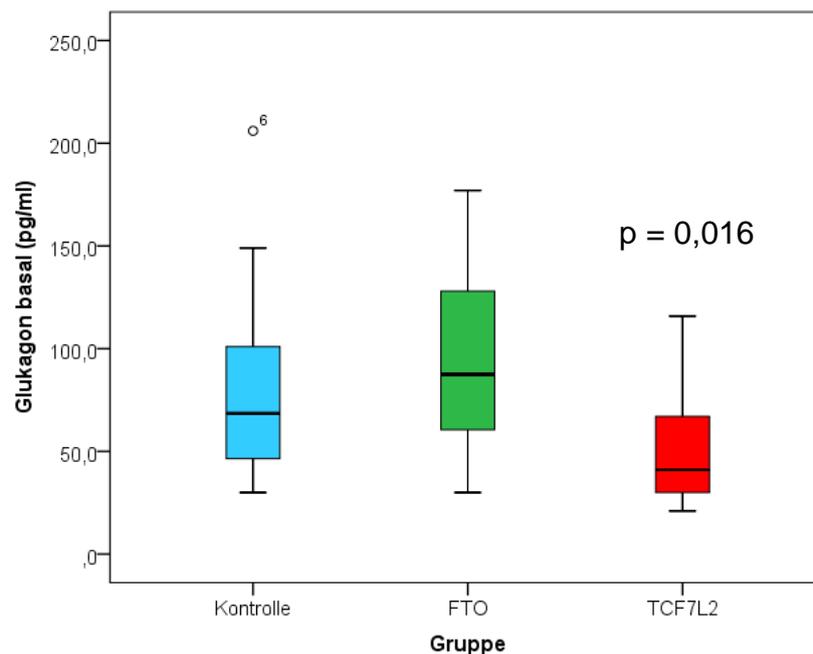
Wie in Tabelle 8 dargestellt, zeigten die aus dem Clamp-Versuch abgeleiteten, die Insulinsensitivität beschreibenden Indices GIR und ISI keine Unterschiede zwischen den Genotypen auf.

	Kontrollen (n = 24)	FTO Risikoträger (n = 24)	TCF7L2 Risikoträger (n = 24)	p-Wert
<b>GIR</b>	6.45 ± 2.14	5.96 ± 2.32	6.08 ± 2.0	0.705
<b>ISI</b>	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.15 ± 0.1	0.865

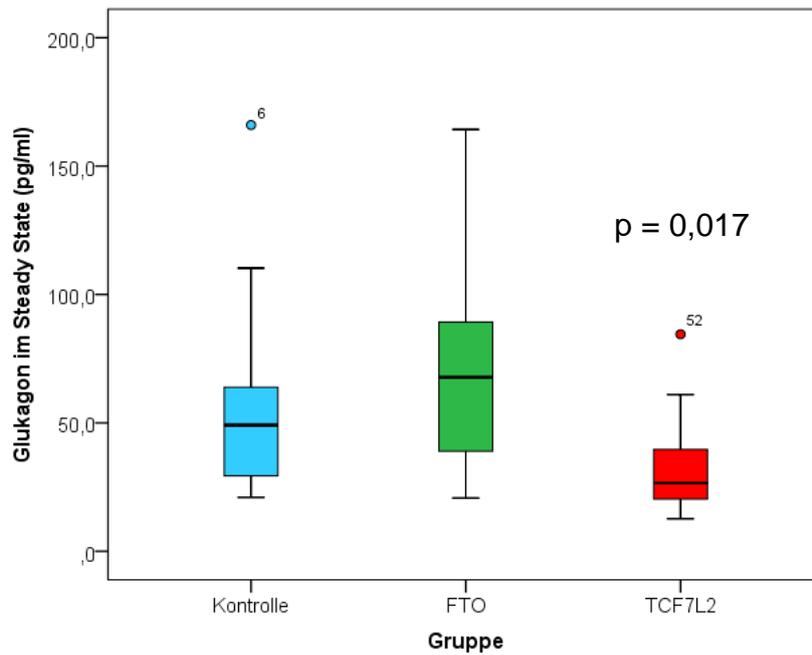
**Tabelle 8** Ergebnisse des Glukose-Clamp-Tests in den verschiedenen Studiengruppen

#### IV.2.2.2 Assoziation zwischen Genpolymorphismen und Glukagonspiegel

Neben der Insulinsekretion spielt auch die Glukagonsekretion eine wichtige Rolle bei der Glukosehomöostase. Sowohl im Nüchternzustand ( $p = 0,016$ ) als auch während des „Steady State“ im Glukose-Clamp-Test ( $p = 0,017$ ) waren die Plasmaglukagonspiegel in der TCF7L2 rs7903146-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Abbildung 12, 13). Bei FTO-Risikogenträgern fand sich kein Unterschied bezüglich der Glukagonspiegel im Vergleich zu den Kontrollpersonen.



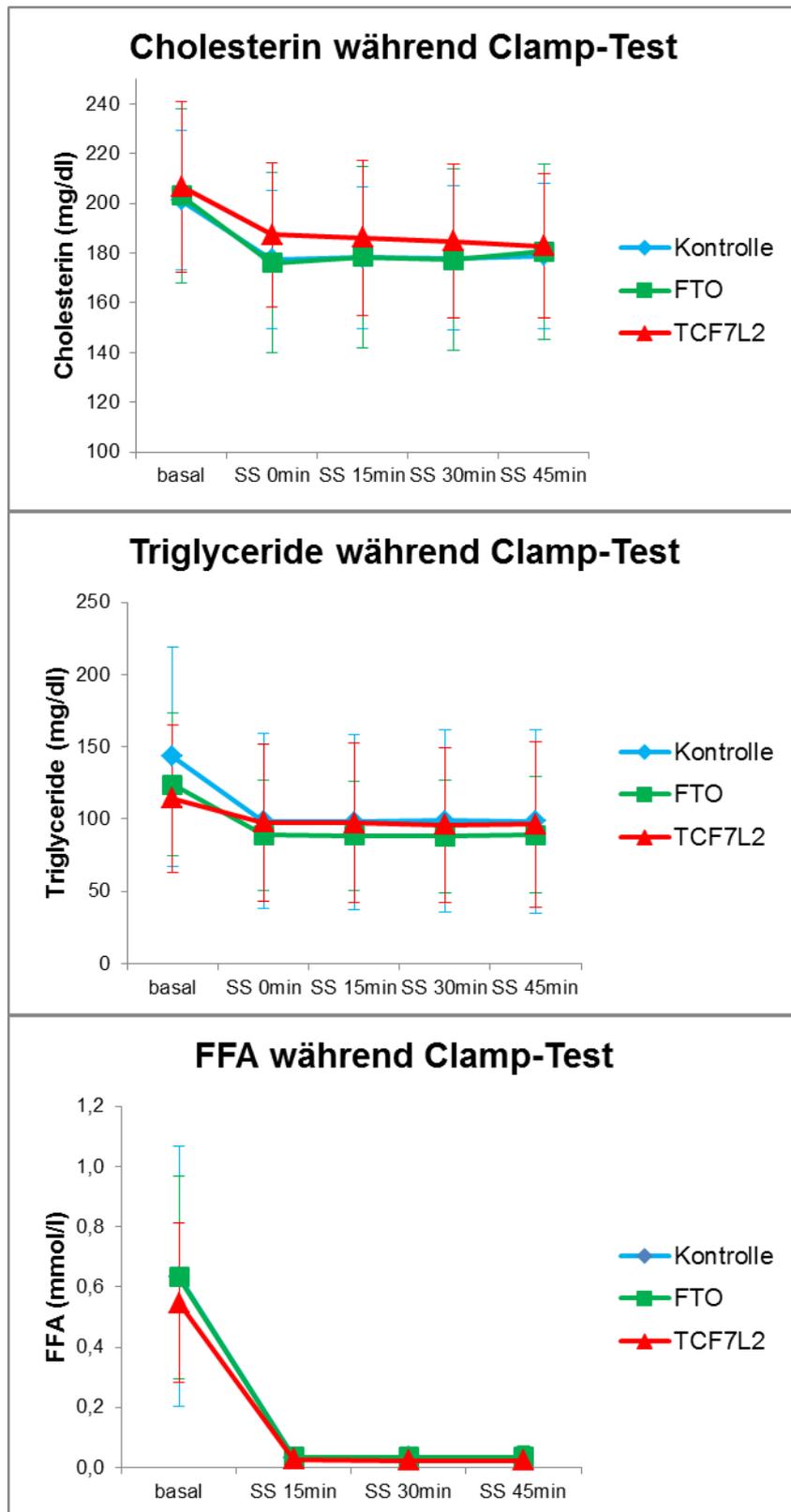
**Abbildung 12** Vergleich des Plasma-Glukagonspiegels (nüchtern) bei Risikogenträgern und Kontrollpersonen



**Abbildung 13** Vergleich des Plasma-Glukagonspiegels während des Clamp-Tests bei Risikoträgern und Kontrollpersonen

#### **IV.2.2.3 Assoziation zwischen Genpolymorphismen und Lipidmetabolismus**

Im Nüchternzustand und während des hyperinsulinämisch euglykämischen Glukose-Clamp-Tests verhielten sich Gesamtcholesterin-, Triglycerid- und FFA-Spiegel in den drei Kohorten sehr ähnlich. Die FFA-Spiegel fielen durch die Insulingabe in allen drei Gruppen während des Clamp-Tests massiv ab. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Verlauf der Cholesterin-, der Triglyceridwerte und der Konzentration von freien Fettsäuren (FFAs) während des Clamp-Tests (Basal = nüchtern, SS = „Steady State“-Bedingungen)

### IV.2.3 Unterschiede zwischen homozygoten und heterozygoten TCF7L2-Merkmalsträgern

Da in der Glukose-stimulierten Insulinsekretion ein signifikanter Unterschied zwischen den Trägern von rs7903146 und den Nicht-Risikoallelträgern beobachtet wurde, war es interessant zu prüfen, ob signifikante Unterschiede zwischen homozygoten (TT) und heterozygoten (CT) TCF7L2-Risikogenträgern vorhanden sind.

Bei den homozygoten Merkmalsträgern fanden sich höhere Werte bei Gewicht ( $p = 0,011$ ), BMI ( $p = 0,046$ ) und Bauchumfang ( $p = 0,021$ ) sowie beim Nüchtern-Plasmaproinsulinpiegel ( $p = 0,027$ ). Alle anderen basalen Laborparameter und Merkmale zur Grundcharakterisierung der Probanden waren nicht unterschiedlich (Tabelle 9).

Die erste und zweite Phase der Insulinsekretion im ivGTT, die Insulinsensitivität im Glukose-Clamp-Test (ISI und GIR) sowie die basalen Indices für Insulinsekretion und -sensitivität verhielten sich ähnlich zwischen homo- und heterozygoten Merkmalsträgern (Tabelle 10).

	TCF7L2 homozygot (n = 9)	TCF7L2 heterozygot (n = 8)	p-Wert
<b>Alter (Jahre)</b>	56.44 ± 8.99	59.13 ± 12.31	0.236
<b>Größe (cm)</b>	180.00 ± 6.78	174.88 ± 5.25	0.139
<b>Gewicht (kg)</b>	92.22 ± 11.87	77.50 ± 6.67	<b>0.011</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28.43 ± 2.98	25.31 ± 1.38	<b>0.046</b>
<b>Bauchumfang (cm)</b>	104.44 ± 9.72	94.75 ± 7.76	<b>0.021</b>
<b>Blutdruck (mmHg)</b>			
systolisch/	146.33 ± 11.19	137.00 ± 17.11	0.139
diastolisch	88.67 ± 8.89	81.50 ± 12.74	0.114
<b>Diabetes in der Familie</b>	4/9 (44.44%)	3/8 (37.50%)	
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	5.64 ± 0.33	5.81 ± 0.31	0.139
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	0.86 ± 0.19	0.85 ± 0.12	0.963
<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	14.22 ± 2.77	13.63 ± 4.21	0.888
<b>Ferritin (mg/dl)</b>	142.33 ± 85.63	229.38 ± 107.32	0.074
<b>Cholesterin (mg/dl)</b>	202.67 ± 34.94	211.13 ± 35.16	0.743

LDL (mg/dl)	121.22 ± 30.15	126.38 ± 20.39	0.743
HDL (mg/dl)	59.11 ± 20.04	62.12 ± 19.67	0.541
Triglyceride (mg/dl)	111.67 ± 64.62	116.88 ± 33.06	0.606
Bilirubin (mg/dl)	0.59 ± 0.27	0.71 ± 0.22	0.200
ASAT (U/l)	24.75 ± 4.65	26.38 ± 6.21	0.798
ALAT (U/l)	28.11 ± 7.98	23.38 ± 11.19	0.167
γ-GT (U/l)	43.33 ± 17.78	30.43 ± 10.98	0.174
CRP (mg/dl)	0.25 ± 0.21	0.17 ± 0.15	0.252
TSH (μU/ml)	1.91 ± 1.32	1.88 ± 1.01	0.815
Nüchtern-Glukose (mg/dl)	96.56 ± 13.74	99.38 ± 7.21	0.673
Nüchtern-Insulin (pmol/l)	5.59 ± 3.46	5.04 ± 2.50	0.888
Nüchtern-Proinsulin (pmol/l)	4.05 ± 3.06	1.64 ± 1.24	<b>0.027</b>
Nüchtern-C-Peptid (ng/ml)	2.52 ± 1.18	2.39 ± 0.10	0.888
Nüchtern-Glukagon (pg/ml)	58.60 ± 29.23	41.19 ± 21.31	0.277

**Tabelle 9** Vergleich der Merkmale zur Grundcharakterisierung der Probanden und der basalen Laborparameter zwischen homo- und heterozygoten Merkmalsträgern von TCF7L2 rs7903146

	TCF7L2 homozygot (n = 8)	TCF7L2 heterozygot (n = 9)	p-Wert
HOMA-%B	65.66 ± 35.40	55.79 ± 43.67	0.481
HOMA-IR	1.36 ± 0.90	1.21 ± 0.52	1.000
Quicki	0.38 ± 0.05	0.38 ± 0.04	1.000
1 / Nüchtern-Insulin	0.26 ± 0.16	0.26 ± 0.17	0.888
Nüchtern-Glukose / Nüchtern-Insulin – Ratio	24.88 ± 16.23	25.79 ± 16.35	0.815
GIR	6.35 ± 2.26	5.73 ± 1.83	0.470
ISI	0.16 ± 0.15	0.13 ± 0.06	0.837
FPIR	74.13 ± 84.69	54.65 ± 50.95	0.743
AUC Glukose 0 – 10 min	2702.67 ± 283.46	2817.37 ± 247.29	0.481
AUC Glukose 10 – 35 min	5451.78 ± 738.81	5588.63 ± 347.887	0.743

<b>AUC Glukose</b> <b>0 – 35 min</b>	8154.44 ± 895.99	8406.00 ± 427.58	0.370
<b>AUC Insulin</b> <b>0 – 10 min</b>	298.32 ± 277.88	227.25 ± 193.32	0.606
<b>AUC Insulin</b> <b>10 – 35 min</b>	526.24 ± 398.58	431.86 ± 332.13	0.743
<b>AUC Insulin</b> <b>0 – 35 min</b>	824.55 ± 628.99	659.11 ± 512.64	0.743
<b>AUC Proinsulin</b> <b>0 – 10 min</b>	62.33 ± 37.62	35.37 ± 22.93	0.114
<b>AUC Proinsulin</b> <b>10 – 35 min</b>	187.35 ± 116.56	120.17 ± 77.34	0.200
<b>AUC Proinsulin</b> <b>0 – 35 min</b>	249.68 ± 153.71	155.54 ± 99.93	0.200
<b>AUC(Ins) / AUC(Glu)</b> <b>0 – 10 min</b>	0.11 ± 0.10	0.08 ± 0.06	0.423
<b>AUC(Ins) / AUC(Glu)</b> <b>10 – 35 min</b>	0.10 ± 0.08	0.09 ± 0.06	0.743
<b>AUC(Ins) / AUC (Glu)</b> <b>0 – 35 min</b>	0.10 ± 0.08	0.08 ± 0.60	0.541
<b>AUC(Pro) / AUC(Ins)</b> <b>0 – 10 min</b>	0.40 ± 0.34	0.22 ± 0.12	0.743
<b>AUC(Pro) / AUC(Ins)</b> <b>10 – 35 min</b>	0.53 ± 0.37	0.34 ± 0.17	0.370
<b>AUC(Pro) / AUC(Ins)</b> <b>0 – 35 min</b>	0.47 ± 0.36	0.30 ± 0.15	0.423
<b>Delta Ins / Delta Glu</b> <b>x = 3 min</b>	20.33 ± 19.64	13.38 ± 11.50	0.673
<b>Delta Ins / Delta Glu</b> <b>x = 5 min</b>	17.18 ± 17.03	11.70 ± 10.00	0.815
<b>Delta Ins / Delta Glu</b> <b>x = 10 min</b>	15.16 ± 13.30	11.80 ± 10.57	0.541
<b>Risikoindex</b>	0.039 ± 0.035	0.049 ± 0.048	0.673
<b>Disposition Index</b>	8.34 ± 8.23	6.26 ± 3.25	0.918

**Tabelle 10** *Vergleich der basalen Indices für Insulinsekretion und -sensitivität, der Ergebnisse des ivGTT und des Glukose-Clamp-Tests zwischen homo- und heterozygoten Merkmalsträgern von TCF7L2 rs7903146*

## V. Diskussion

---

Bei der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes spielen neben Umwelteinflüssen und Lebensstil auch genetische Komponenten eine bedeutende Rolle. In vielen epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und definierten Genpolymorphismen beschrieben. Dennoch kann bisher die Assoziation zwischen Genvarianten und den pathogenetischen Mechanismen, die zur Erkrankung führen, nur unzureichend erklärt werden.

Wir untersuchten daher 65 kaukasische, nichtdiabetische Probanden, die entweder Genträger für die Risikoallele im TCF7L2- bzw. FTO-Gen oder Nichtträger dieser Polymorphismen waren mittels eines intravenösen Glukosetoleranztests und eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose-Clamp-Tests, um frühe Stoffwechselunterschiede bei Risikogenträgern zu detektieren, die eventuell bereits vor der Manifestation von Störungen in der Glukosehomöostase auftreten.

Der Hauptbefund der vorliegenden Untersuchung ist, dass bei Trägern des TT- und des CT-Risiko-Genotyps von TCF7L2 rs7903146 im Vergleich zum CC-Polymorphismus eine signifikante Reduktion der Glukose-stimulierten frühen Phase der Insulinsekretion und erniedrigte Glukagonspiegel nachweisbar sind. Bei Trägern der mit Typ 2 Diabetes assoziierten FTO-Polymorphismen waren in den bei der vorliegenden Studie eingesetzten Stoffwechselltests und den untersuchten Laborparametern keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Nichttrisikogenträgern oder den TCF7L2 Genträgern zu verzeichnen.

### V.1 Diskussion der Ergebnisse des TCF7L2-Polymorphismus

Die Zahl der in genomweiten Assoziationsstudien identifizierten Genpolymorphismen, die mit einem Typ 2 Diabetes assoziiert sind, stieg in den letzten Jahren kontinuierlich an. Aktuell sind 56 „Single Nucleotide Polymorphisms“ beschrieben, die eine signifikante Assoziation mit Typ 2 Diabetes aufweisen (Morris et al., 2012). Polymorphismen des TCF7L2-Gens wurden in zahlreichen Studien als der bei weitem stärkste einzelne genetische Risikofaktor für einen Typ 2 Diabetes detektiert (Marzi et al., 2007, Helgason et al., 2007, Florez et al., 2006, Lyssenko et al., 2007, González-Sánchez et al., 2008, Alibegovic et al., 2010, Elbein et al., 2007, Zhang et

al., 2006, van Vliet-Ostaptchouk et al., 2007, Scott et al., 2006, Morris et al., 2012, Voight et al., 2010).

Grant et al. entdeckten als Erste eine starke Assoziation zwischen dem Mikrosatelliten DG10S478 im Intron 3 des TCF7L2-Gens und Diabetes mellitus in einer isländischen Kohorte, welche sie daraufhin in einer dänischen und einer US-amerikanischen Kohorte replizierten. Darüber hinaus fanden sie fünf SNPs, darunter rs7903146 und rs1225372, die in starker Korrelation zu DG10S478 und ebenfalls zum Typ 2 Diabetes standen (Grant et al., 2006). Der minor T-Polymorphismus von rs7903146, welchen wir auch in der vorliegenden Studie untersuchten, trat dabei als Variante mit der höchsten Signifikanz hervor und wird seither als Hauptrisikovariante des TCF7L2-Gens bezeichnet (Saxena et al., 2006, Dahlgren et al., 2007, Groves et al., 2006). Die starke Assoziation zwischen Typ 2 Diabetes und TCF7L2-Polymorphismen besteht in allen bisher untersuchten Ethnien (Cauchi et al., 2007). Bei der Entstehung des Diabetes agiert TCF7L2 offenbar unabhängig vom BMI (Grant et al., 2006, Cauchi et al., 2006, Alibegovic et al., 2010). Die Häufigkeit des Vorliegens des Risikoallels in der Bevölkerung beziffern Grant et al. mit 26% bei einer Aufspaltung in 38% heterozygote und 7% homozygote Träger. Des Weiteren geben die Autoren ein um 1,45 (Heterozygote), bzw. 2,41 (Homozygote) erhöhtes relatives Risiko an, an Diabetes zu erkranken und schätzen das „Population attributable Risk“ auf 21% (Grant et al., 2006). Andere Studien kommen zu ähnlichen Resultaten. Demnach gehen Groves et al. von einem „Population attributable Risk“ von 16% aus (Groves et al., 2006) und Zhang et al. machen dieses bei 14,8% für Frauen und 22,3% für Männer fest (Zhang et al., 2006).

Auf welche Weise trägt nun TCF7L2 zu einem erhöhten Diabetesrisiko bei?

TCF7L2 liegt auf Chromosom 10q25, umfasst 215,9kb (Damcott et al., 2006) und beinhaltet 17 Exons (Grant et al., 2006). Das TCF7L2-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der über den WNT-Signalweg unter anderem Wachstum und Entwicklung von Zellen reguliert. Der WNT-Signalweg entkoppelt letztendlich seinen zentralen Spieler  $\beta$ -Catenin und transloziert ihn in den Nukleus (Grant et al., 2006). Dort heterodimerisiert  $\beta$ -Catenin mit TCF7L2 und induziert damit die Transkription einer Reihe von WNT-Zielgenen (Damcott et al., 2006, Lyssenko et al., 2007). Das TCF7L2-Gen, welches im Darm stark exprimiert wird, wurde ursprünglich in Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom gebracht (van de Wetering et al.,

2002). So fanden Batlle et al. heraus, dass die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin / TCF in intestinalen Epithelzellen die Bildung von Polypen verursacht, die sich schließlich zu Karzinomen weiterentwickeln (Batlle et al., 2002). Darüber hinaus zeigten Korinek et al., dass TCF7L2-null-Mäuse überhaupt keine Stammzellen in ihren Darmkrypten aufwiesen und schlossen daraus, dass TCF7L2 auch in humanen Epithelzellen eine maligne Transformation begünstigen könnte, indem es Stammzeleigenschaften in den Zellen aufrecht erhält (Korinek et al., 1998). TCF7L2 wird in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert, unter anderem in Langerhans'schen Inselzellen (Cauchi et al., 2006, González-Sánchez et al., 2008). In den Inselzellen existieren hauptsächlich vier Splice-Varianten von TCF7L2, welche eine bedeutende Rolle für die Entwicklung und Proliferation von  $\beta$ -Zellen, die  $\beta$ -Zell-Apoptose und die Insulinsekretion einnehmen (Hansson et al., 2010).

In zahlreichen Studien wurde eine Assoziation zwischen TCF7L2-Genpolymorphismen und einer Störung der Insulinsekretion der Betazellen beschrieben (Saxena et al., 2006, Florez et al., 2006, Palmer et al., 2008, Marzi et al., 2007, Lyssenko et al., 2007, Schäfer et al., 2007, Kirchhoff et al., 2008, Alibegovic et al., 2010, Pilgaard et al., 2009, Villareal et al., 2010, Dahlgren et al., 2007, Munoz et al., 2006, Wegner et al., 2008, Hansson et al., 2010). Die Erklärung für diesen Befund wird allerdings kontrovers diskutiert. Während einige Studien eine direkte Dysfunktion der Betazellen auf Glukosestimulation vermuten (Marzi et al., 2007, Alibegovic et al., 2010, Dahlgren et al., 2007), zeigen andere Daten, dass die erniedrigte Insulinsekretion auf eine reduzierte Inkretin-vermittelte Insulinsekretion zurückzuführen ist (Schäfer et al., 2007). Bereits Grant et al. vermuteten als Ursache eine Störung der enteroinsulären Achse mit Änderung der Spiegel des aus den intestinalen endokrinen L-Zellen sezernierten „Glucagon-like-Peptide 1“ (GLP-1) (Grant et al., 2006). GLP-1 ist zusammen mit einem weiteren Inkretin, dem „Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide“ (GIP), entscheidend an der Regulation der Blutzuckerkonzentration durch Stimulierung der Insulinbiosynthese und -sekretion, Inhibierung der Glukagonfreisetzung sowie Erhöhung der peripheren Insulinsensitivität beteiligt (Yi et al., 2005). Dabei unterliegt die Expression des Proglukagon-Gens, welches für GLP-1 kodiert, auf transkriptioneller Ebene der Regulation durch TCF7L2 (Grant et al., 2006), da sowohl TCF7L2 als auch  $\beta$ -Catenin an den Promoter des Proglukagon-Gens binden (Yi et al., 2005).

In vergleichenden Untersuchungen der Insulinantwort nach intravenöser und oraler Glukosegabe wurde von einigen Studien eine erniedrigte Insulinfreisetzung bei TCF7L2-Risikoträgern im oGTT, nicht aber im ivGTT beschrieben (Schäfer et al., 2007, Villareal et al., 2010). Somit scheint der Defekt bezüglich der Insulinsekretion selektiv für orale Glukosezuführung zu sein. Das hieraus abgeleitete Inkretinkonzept geht von einer stärkeren Insulinantwort auf orale als auf intravenöse Glukosezuführung aus, eben wegen der zusätzlichen Stimulation der Insulinsekretion durch intestinale Botenstoffe wie GLP-1 oder GIP. Schäfer et al. konnten allerdings keine basalen oder glukosestimulierten (oGTT) erniedrigten GLP-1 Konzentrationen bei Trägern der Risikovariante von TCF7L2 erheben. Vielmehr waren die GLP-1-Spiegel vom Genotyp gänzlich unbeeinflusst (Schäfer et al., 2007). Daher mutmaßten die Autoren dieser und weiterer Studien, dass das T-Allel von rs7903146 die Inkretin-vermittelte Insulinsekretion nicht über eine veränderte Sekretion von GLP-1 oder GIP schmälert, sondern dass sich die TCF7L2-Risikovariante auf die Sensitivität der  $\beta$ -Zellen gegenüber Inkretinhormonen auswirkt und beispielsweise einen funktionellen Defekt im GLP-1-Signalweg verursachen könnte (Schäfer et al., 2007, Villareal et al., 2010, Pilgaard et al., 2009). Shu et al. untermauern diese These durch die Beobachtung, dass die Expression der Rezeptoren für GLP-1 und GIP in pankreatischen Inseln von Diabetespatienten und ebenfalls in isolierten humanen Inseln, die mit siRNA von TCF7L2 behandelt wurden, erniedrigt ist (Shu et al., 2009).

Diese Interpretation steht im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Studie, in der die Reaktion der Träger des Polymorphismus rs7903146 auf einen intravenösen Glukosestimulus, also unter bewusster Umgehung des Inkretineffekts, getestet wurde. Wir verzeichneten eine gestörte Insulinsekretion bei Trägern des TCF7L2-Risikopolymorphismus gegenüber der Kontrollgruppe und den FTO-Risikoträgern, die vor allem während der frühen Phase der Insulinsekretion hervorstach. Die Parameter AIR,  $AUC(\text{Insulin}) / AUC \text{ Glukose } (0-10\text{min})$ , FPIR sowie  $\Delta \text{ Insulin} / \Delta \text{ Glukose } (x = 3,5 \text{ min})$  waren im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikant erniedrigt. Zu ähnlichen Ergebnissen, nämlich einer reduzierten Insulinfreisetzung bei Trägern des TCF7L2 rs7903146-Risikogens beim intravenösen Glukosebelastungstest, kommen neben Marzi et al. (Marzi et al., 2007) auch Alibegovic et al., die eine signifikant erniedrigte FPIR bei T-Allel-Trägern

nachwiesen (Alibegovic et al., 2010) sowie Dahlgren et al., die eine abgesenkte Insulinausschüttung in der frühen Phase bei Risikoallel-Trägern im Polymorphismus von rs7903146 sowohl bei oraler, als auch bei intravenöser Stimulation beschrieben (Dahlgren et al., 2007). Eine erniedrigte Insulinantwort in der frühen Phase (AIR) findet sich ebenfalls in weiteren Studien zur Rolle der TCF7L2-Genvarianten (Munoz et al., 2006, Palmer et al., 2008). Diese Resultate unterstützen allesamt den Standpunkt, dass ein gestörter Inkretineffekt die beeinträchtigte Insulinsekretion bei TT/CT-Trägern von TCF7L2 rs7903146 nur unzureichend erklärt. Vermutlich ist sie eher Folge einer Kombination aus gehemmter Inkretinwirkung und fehlerhafter intrinsischer pankreatischer  $\beta$ -Zell-Funktion und/oder  $\beta$ -Zell-Masse (Alibegovic et al., 2010).

Als weiteres mögliches Szenario, wie sich die verminderte Insulinantwort entwickelt, kommt eine gestörte Insulinsynthese und -prozessierung in Frage. Wir erhoben in der vorliegenden Studie eine erhöhte Proinsulin / Insulin – Ratio besonders zu den Zeitpunkten 1, 3, und 5 Minuten des ivGTT, die sich jedoch nur als Trend abzeichnete ohne statistische Signifikanz zu besitzen. Andere Studien können an dieser Stelle deutlichere Ergebnisse präsentieren. Bei Gonzales-Sánchez et al. ist das T-Allel von rs7903146 signifikant mit einer erhöhten Proinsulin / Insulin – Ratio beim oGTT assoziiert (González-Sánchez et al., 2008). Noch konkreter werden Stolerman et al., die bei TT-Homozygoten eine um 23,5% gesteigerte Proinsulin / Insulin – Ratio im Vergleich zu CC-Trägern nachweisen, welche unabhängig vom BMI oder vom Ausmaß einer Insulinresistenz entsteht (Stolerman et al., 2009). Kirchhoff et al. fanden ebenfalls eine reduzierte Konversion von Proinsulin zu Insulin (Kirchhoff et al., 2008), welche einen fundamentalen Schritt bei der Insulinsynthese der  $\beta$ -Zelle darstellt (González-Sánchez et al., 2008). Im Gegensatz zu unserer Studie, in der die Proinsulinspiegel während des ivGTT bei Trägern der Risikovariante von TCF7L2 eher erniedrigt waren, belegen andere Studien einen Zusammenhang zwischen der Risikogenvariante und erhöhten Konzentrationen von Proinsulin im Plasma (Loos et al., 2007, Dahlgren et al., 2007). Loos et al. entdeckten bei TT-Trägern um 15% höhere Werte als bei CT-Trägern, die wiederum 9% höhere Werte als CC-Träger aufwiesen (Loos et al., 2007). Die Autoren vermuteten daraufhin einen Defekt der Proinsulin-Prozessierung. Interessanterweise enthalten beide Gene für die Proteinkonvertasen PC1 und PC2, die

hauptverantwortlich für die Prozessierung sind, TCF7L2-bindende Elemente in ihren Promotern (Loos et al., 2007). Zethelius et al. berichten überdies, dass veränderte Proinsulinspiegel unabhängig von der Höhe der Insulinspiegel die Entstehung eines Typ 2 Diabetes vorhersagen (Zethelius et al., 2004). Es bleibt festzuhalten, dass TCF7L2-Varianten eine gestörte Insulinsekretion hervorrufen könnten, indem sie einen negativen Einfluss auf Insulinsynthese und -prozessierung ausüben (10).

Schließlich könnte die beeinträchtigte Insulinausschüttung indirekt auch das Resultat gestörter  $\alpha$ -Zell-Funktion sein. In der vorliegenden Studie verzeichneten wir statistisch signifikant erniedrigte Glukagonspiegel bei T-Allel-Trägern gegenüber den Kontrollpersonen, sowohl im Nüchternzustand als auch während des „Steady State“ des Clamp-Tests. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Alibegovic et al., die signifikant abgesenkte Nüchtern-Plasmaglukagonspiegel bei Trägern des Risikopolymorphismus nachweisen (Alibegovic et al., 2010) sowie Pilgaard et al.. Hier waren die Glukagon-Konzentrationen gemittelt über 24 Stunden signifikant reduziert. (Pilgaard et al., 2009). Eine verminderte Expression von Proglukagon in  $\alpha$ -Zellen oder eine veränderte posttranslationale Prozessierung von Proglukagon zu Glukagon könnten diese bedingen (Pilgaard et al., 2009). Von Bedeutung ist die Tatsache, dass TCF7L2 und  $\beta$ -Catenin an den Promoter des Proglukagon-Gens in pankreatischen  $\alpha$ -Zellen binden (Yi et al., 2005). Glukagon fungiert im eigentlichen Sinn als Gegenspieler zu Insulin. Zu den Funktionen des Hormons aus den  $\alpha$ -Zellen zählt die Aufrechterhaltung der Normoglykämie, vor allem während des Fastens (Yi et al., 2005). Allerdings fördert Glukagon auch die Insulinausschüttung und somit könnte ein gestörter parakriner Effekt von Glukagon, die Insulinsekretion zu stimulieren, zur intrinsischen pankreatischen  $\beta$ -Zell-Dysfunktion beitragen (Alibegovic et al., 2010).

Neben der bedeutenden Rolle von TCF7L2 für die Inselzellfunktion wurde in tierexperimentellen und klinischen Studien auch eine Beeinflussung der Glukosehomöostase durch Änderung der TCF7L2-abhängigen Glukoneogenese in der Leber beschrieben (Oh et al., 2012, Ip et al., 2012). Wir analysierten deshalb in der vorliegenden Studie auch die Insulinsensitivität. Mittels eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose-Clamp-Tests, dem Goldstandard für die Bestimmung der Insulinresistenz, konnte nachgewiesen werden, dass keine

Assoziation zwischen dem TCF7L2-Risikopolymorphismus und einer gestörten Insulinsensitivität besteht. Zusätzliche Parameter der Insulinresistenz wie HOMA-IR und Quicki waren ebenfalls nicht unterschiedlich zwischen den Studiengruppen. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der bisher publizierten Studien (Saxena et al., 2006, Palmer et al., 2008, Lyssenko et al., 2007, Rasmussen-Torvik et al., 2009, Schäfer et al., 2007, Villareal et al., 2010, Dahlgren et al., 2007, Munoz et al., 2006). Florez et al. und Wegner et al. berichten sogar über eine gesteigerte Insulinsensitivität bei Trägern des TCF7L2-Risikopolymorphismus (Florez et al., 2006, Wegner et al., 2008). Dagegen erhoben Damcott et al. einen erniedrigten Insulinsensitivitätsindex bei T-Allel-Trägern des SNP rs7903146 (Damcott et al., 2006) und auch einige wenige weitere Studien befürworten die These einer verminderten Insulinsensitivität bei Trägern der Risikovariante von TCF7L2 (Marzi et al., 2007, Elbein et al., 2007).

Da verschiedene Splicevarianten von TCF7L2 auch in Adipozyten exprimiert werden (Kaminska et al., 2012), führten wir vergleichende Analysen der Lipidprofile zwischen Trägern des TT- und des CT-Genotyps und den Kontrollen durch. Die konventionellen Lipidparameter wie LDL- und HDL-Cholesterin und die Triglyceride waren nicht unterschiedlich. Die Konzentration der freien Fettsäuren war im Nüchternzustand ebenfalls vergleichbar und wurde unter anabolen Bedingungen (hohe Insulinkonzentration im Clamp-Test) in beiden Gruppen nahezu komplett supprimiert. Um detailliertere Analysen des Lipidmetabolismus durchzuführen, wurden zwischenzeitlich von Kooperationspartnern mit den in der Promotionsarbeit asservierten Proben Metabolomics-Untersuchungen durchgeführt (AbsoluteIDQ<sup>TM</sup> p150 Kits, Biocrates Life Sciences AG). Hier zeigten sich signifikante Änderungen der Plasmakonzentration von Sphingomyelinen, Phosphatidylcholinen und Lysophosphatidylcholinen nach intravenöser Glukosegabe bei den TCF7L2-Genträgern im Vergleich zu den Nichtrisikogenträgern (Publikation eingereicht). Möglicherweise ist also der TCF7L2 rs7903146-Genotyp mit spezifischen Veränderungen von Plasmaphospholipiden assoziiert, die bereits in einem Stadium auftreten, in dem die Glukosetoleranz noch im Normbereich liegt. Inwiefern diese Änderungen des Lipidmetabolismus auch die Progression zum Typ 2 Diabetes mit verursachen bleibt unklar und muss in prospektiven Studien geklärt werden.

## V.2 Diskussion der Ergebnisse des FTO-Polymorphismus

Ein Zusammenhang zwischen „Fat Mass and Obesity“-Genpolymorphismen und Typ 2 Diabetes in der europäischen Bevölkerung wurde in einer Vielzahl von Studien bestätigt (Rees et al., 2011, Han et al., 2010, Bressler et al., 2010, Frayling et al., 2007, Hertel et al., 2011, Tan et al., 2008, Legry et al., 2009, Andreasen et al., 2008, Renström et al., 2009, Hertel et al., 2008, Scott et al., 2007, Consortium, 2007). Bei der Untersuchung anderer Ethnien, z.B. asiatischer und ozeanischer Bevölkerungen oder den „African Americans“ finden sich z.T. abweichende Resultate (Bressler et al., 2010).

Frayling et al. identifizierten 2007 den SNP rs9939609 in einer GWAS mit 1924 britischen Diabetikern und 2938 britischen Kontrollpersonen und stellten eine starke Assoziation zwischen dem „high-risk“ A-Allel und Diabetes fest. Die Risikogenvariante trat mit einer Häufigkeit von 39% in der Bevölkerung auf, in 16% der Fälle lag es in homozygoter Form vor. 37% der Probanden waren dagegen Träger des in Bezug auf die Entstehung eines Diabetes mellitus protektiv wirkenden T-Polymorphismus (Frayling et al., 2007).

Das Risiko bei Trägern einer FTO-Risikovariante, an Typ 2 Diabetes zu erkranken, wird unterschiedlich beziffert. Das „Wellcome Trust Control Consortium“ geht von einem um 25% erhöhten Risiko aus (Consortium, 2007), Legry et al. ermittelten bei AA-Trägern eine um 48% gesteigerte Erkrankungswahrscheinlichkeit (Legry et al., 2009) und Scott et al. schätzen diese bei Trägern des A-Risikoallels sogar auf 50% (Scott et al., 2007). Allerdings herrscht Uneinigkeit darüber, auf welche Weise dieses erhöhte Risiko zustande kommt. Demnach befürworten die meisten Studien die Theorie, dass die Prädisposition für Typ 2 Diabetes über den Einfluss von FTO-Polymorphismen auf die Entstehung einer Adipositas vermittelt wird und dass erst diese die Entwicklung einer Insulinresistenz und letztlich des Diabetes mellitus bedingt. Zu diesem Schluss kommen die betreffenden Wissenschaftler, da bei ihren Untersuchungen die Assoziation zwischen FTO-Risikovarianten und Typ 2 Diabetes bei Adjustierung für den BMI oder andere Indices hinsichtlich einer Adipositas verschwindet (Rees et al., 2011, Frayling et al., 2007, Tan et al., 2008, Andreasen et al., 2008, Renström et al., 2009, Consortium, 2007). Rees et al. konnten in einer Metaanalyse von sechs Studien, die sich mit der europäischen Bevölkerung befassen, einen stark abgeschwächten Zusammenhang zwischen FTO-

Polymorphismen und Typ 2 Diabetes nach Adjustierung für den BMI nachweisen (Rees et al., 2011). Andere Studienergebnisse dagegen legen nahe, dass FTO-Varianten auch z.T. unabhängig von einer Adipositas für den Typ 2 Diabetes prädisponieren, da hier die Assoziation zwischen FTO und Diabetes auch bei Berücksichtigung des BMI bestehen bleibt (Han et al., 2010, Li et al., 2010, Bressler et al., 2010, Hertel et al., 2011, Legry et al., 2009, Hertel et al., 2008). Es muss hinzugefügt werden, dass jedoch einige Autoren der zuletzt genannten Studien bezweifeln, ob eine einzige BMI-Bestimmung ausreicht, um die Auswirkung von FTO-Varianten auf Adipositas und den Stoffwechsel akkurat abzubilden (Bressler et al., 2010, Hertel et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden nichtdiabetische Träger von Risikopolymorphismen im FTO-Gen rekrutiert und untersucht. Da die Selektion der Probanden nur anhand des Genotyps, des Alters, eines normalen oGTT-Befundes und eines BMI im Bereich bis 35 kg/m<sup>2</sup> erfolgte, ist es interessant, dass in unserem Kollektiv keinerlei Unterschiede hinsichtlich des BMI-Werts im Vergleich zu den Nicht-Genträgern oder den Probanden mit dem TCF7L2-Risikoallel zu beobachten war. Auch Parameter, die indirekt auf eine Steatosis hepatis schließen lassen, waren bei den FTO-Risikogenträgern nicht erhöht.

Fast alle Studien, die sich mit dem FTO-Gen befassen, stimmen darin überein, dass ein Zusammenhang zwischen dem Genpolymorphismus und der Entwicklung einer Adipositas besteht (Han et al., 2010, Bressler et al., 2010, Li et al., 2010, Tschritter et al., 2007, Frayling et al., 2007, Hertel et al., 2011, Tan et al., 2008, Do et al., 2008, Freathy et al., 2008, Legry et al., 2009, Andreasen et al., 2008, Renström et al., 2009, Thorleifsson et al., 2009, Hertel et al., 2008, Hotta et al., 2008, Scott et al., 2007, Scuteri et al., 2007, Dina et al., 2007, Hunt et al., 2008, Hinney et al., 2007, Grant et al., 2008, Wardle et al., 2008, Consortium, 2007). Diese Assoziation kann nachgewiesen werden, wenn als Parameter für die Adipositas der BMI herangezogen wird (Han et al., 2010, Do et al., 2008, Legry et al., 2009, Andreasen et al., 2008, Hertel et al., 2008, Scott et al., 2007, Hunt et al., 2008, Wardle et al., 2008) oder andere Indices wie das Körpergewicht, der Körperfettanteil, der Bauchumfang oder die „Waist-Hip-Ratio“ verwendet werden (Do et al., 2008, Freathy et al., 2008, Legry et al., 2009, Andreasen et al., 2008, Scuteri et al., 2007, Hinney et al., 2007). Das erhöhte Körpergewicht wiederum ist bedingt durch eine Zunahme der gesamten

Körperfettmasse und nicht vorrangig durch die Anhäufung viszeralen Fetts (Andreasen et al., 2008, Renström et al., 2009). Mehrere Studien beschäftigten sich mit dem Ausprägungsgrad der Adipositas. Dina et al. bescheinigen dem FTO-Haplotyp, der auch in der vorliegenden Studie untersucht wurde, ein Risiko von 22% für die Entstehung einer stark ausgeprägten Adipositas (Dina et al., 2007). Renström et al. gehen von einer Erhöhung des Körpergewichts pro Risikoallel des SNP rs1121980 um 1,03kg aus (Renström et al., 2009) und Frayling et al. beobachteten sogar eine Gewichtssteigerung um 3kg bei AA-homozygoten Trägern von FTO rs9939609 gegenüber Nicht-Merkmalsträgern (Frayling et al., 2007). Im Hinblick darauf, wann die Gewichtszunahme erfolgt, sind sich mehrere Autoren einig, dass dies bereits in der Kindheit und Jugend geschieht, sie sprechen daher von einer „early-onset“ Adipositas (Hertel et al., 2011, Hunt et al., 2008, Hinney et al., 2007, Andreasen et al., 2008). Dina et al. stellten eine starke Assoziation mehrerer SNPs des FTO-Gens mit frühzeitiger und ausgeprägter Adipositas bei Kindern europäischen Ursprungs fest, die sich bis ins Erwachsenenalter fortsetzt (Dina et al., 2007). Frayling et al. beobachteten einen Zusammenhang zwischen FTO rs9939609 und Gewichtszunahme sowie BMI-Veränderungen bereits bei Kindern ab sieben Jahren, die bis in die Pubertät und darüber hinaus persistieren (Frayling et al., 2007). Da in unserer Studie bei den Probanden mit einem mittleren Alter von 50 Jahren keine ausgeprägte Adipositas vorlag, besteht wahrscheinlich eine gewisse Vorselektion von Probanden, die aus nicht bekannten Gründen keine Anlage zur frühzeitigen Entwicklung einer Adipositas oder der Entstehung einer schweren Form von Adipositas aufweisen. Denkbar sind günstige Umwelteinflüsse und Lebensstil sowie die Protektion durch vor Adipositas schützenden Genmerkmalen.

Zur Pathogenese der Adipositas bei FTO-Risikogenträgern bietet die Literatur verschiedene Ansätze.

Das FTO Gen liegt auf Chromosom 16q12.2 und kodiert für eine nukleäre DNA-Demethylase, welche die Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Demethylierung von 3-Methylthymine in einzelsträngiger DNA katalysiert. Es wird vermutet, dass Änderungen der FTO-Expression Auswirkungen auf eine Vielzahl von Genen haben, die durch Methylierung reguliert werden (Frayling et al., 2007, Gerken et al., 2007). Das FTO-Gen enthält neun Exons, jedoch liegen alle mit Adipositas assoziierten SNPs in Introns. Es ist daher unklar, ob Änderungen in der FTO-Expression und „-

Splicing“ als Ursache für die Entstehung einer Adipositas herangezogen werden können oder ob vielmehr regulatorische Elemente innerhalb des ersten Introns „upstream“- oder „downstream“-Gene beeinflussen (Bressler et al., 2010, Church et al., 2009).

FTO wird in menschlichen Geweben beinahe ubiquitär exprimiert, unter anderem in Pankreas, Leber und Fettgewebe (Frayling et al., 2007, Grunnet et al., 2009), aber vor allem auch in der Muskulatur, was vermuten lässt, dass FTO die Insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur hemmen könnte (Andreasen et al., 2008). Die höchste Konzentration findet sich jedoch im Gehirn im Hypothalamus (Bressler et al., 2010, Frayling et al., 2007) und dort besonders in Nuclei, die den Energiehaushalt steuern. Dies konnten Gerken et al. im Mausmodell belegen. Darüber hinaus stellten sie fest, dass der FTO-Spiegel im Nucleus arcuatus bei Mäusen durch Füttern und Fasten reguliert wird (Gerken et al., 2007). Da das Gen besonders stark im Hypothalamus exprimiert wird, schreiben Bressler et al. ihm eine mögliche Rolle in der Appetitregulation oder der Energiebilanz zu (Bressler et al., 2010). Im Einklang dazu behaupten Fischer et al., dass FTO direkt in den Energiehaushalt involviert ist und begründen dies damit, dass der Verlust von FTO bei Mäusen zu postnataler Wachstumsretardierung und Schlankheit führt. Die Schlankheit ergibt sich als Konsequenz eines erhöhten Energieaufwands und systemischer Aktivierung des Sympathikus (Fischer et al., 2009). Andreasen et al. wiesen nach, dass ein Mangel an körperlicher Bewegung bei homozygoten AA-Trägern von FTO rs9939609 im Gegensatz zu TT-Trägern mit einem erhöhten BMI einhergeht (Andreasen et al., 2008). Grunnet et al. fanden heraus, dass eine erhöhte Energieeffizienz in oxidativen Muskelfasern nach körperlicher Betätigung zur Entwicklung einer Adipositas bei Trägern der AA-Variante des FTO-Gens beitragen könnte, da AA-Träger gesteigerte Erholungsraten von Phosphokreatinin und anorganischem Phosphat aufwiesen (Grunnet et al., 2009). Des Weiteren beschreiben Wardle et al. eine signifikant reduzierte Sättigungsantwort bei AA-Homozygoten von rs9939609 und folgern daraus eine Beeinflussung des Appetits (Wardle et al., 2008). Dergleichen gehen Tschritter et al. von einer Störung der zentralen Appetitregulation und/oder der Koordination des Ganzkörperenergiemetabolismus aus, da sie eine zerebrokortikale Insulinresistenz bei Trägern einer Risikovariante von FTO entdeckten. Zumal Insulin im Gehirn als Sättigungssignal fungiere, könne eine verminderte Insulinantwort zur

Appetitsteigerung und somit zu Übergewicht führen (Tschritter et al., 2007). Es bleibt also unklar, ob ein vermehrter Appetit – Energieaufnahme –, eine erhöhte Energieeffizienz oder ein Zusammenspiel beider die Entstehung der Adipositas verschuldet.

In der vorliegenden Studie konnten wir keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der glukoseabhängigen Insulinsekretion im ivGTT und der Insulinsensitivitätsindices gemessen im Glukose-Clamp-Test zwischen FTO-Risikoträgern und Trägern von Nichttrisikopolymorphismen beobachten. Es waren auch keine Erhöhungen der basalen Glukose- oder Insulinkonzentrationen bei Trägern des FTO-Risikogentyps nachweisbar, wie sie in einigen Publikationen beschrieben werden (Freatly et al., 2008, Legry et al., 2009, Hunt et al., 2008). Grunnet et al. bemerkten eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem A-Polymorphismus von FTO rs9939609 und erhöhter Nüchternglukose- und Nüchterninsulinkonzentration und bezeichneten die hepatische Insulinresistenz als Schlüsselabnormalität, die die Erhöhung der Nüchternglukose verursacht, da sie eine um 18% gesteigerte basale hepatische Glukoseproduktion nachweisen konnten (Grunnet et al., 2009). In unserer Untersuchung gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich HOMA-IR und der basalen Indices  $1 / \text{Nüchtern-Insulin}$  und  $\text{Nüchtern-Glukose} / \text{Nüchtern-Insulin} - \text{Ratio}$ , die in einigen Studien beschrieben wurden (Do et al., 2008, Legry et al., 2009). Interessanterweise waren in unserer Studie die frühe und die späte Insulinsekretion in der FTO-Risikogengruppe gegenüber den Kontrollpersonen sogar leichtgradig nichtsignifikant gesteigert. Diese Befunde könnten am ehesten darauf zurückzuführen sein, dass bei ähnlichem BMI das Ausmaß der Insulinresistenz und die Insulinsekretionskapazität bei den FTO-Risikogenvarianten vergleichbar der der Nicht-Risikoträger ist.

Neben der Wirkung auf die Insulinresistenz wurde bei den mit Adipositas assoziierten FTO-Polymorphismen auch ein Effekt auf den Lipidstoffwechsel beschrieben. Wåhlén et al. stellten die These auf, FTO greife durch Beeinflussung der Lipolyse in die Körperfettregulation ein, nachdem sie bei gesunden, weiblichen, homozygoten Trägern des in Bezug auf Adipositas protektiv wirkenden T-Allels eine um 30% gesteigerte lipolytische Aktivität entdeckt hatten (Wåhlén et al., 2008). Wir verzeichneten dagegen in unserer FTO-Gruppe keine erniedrigten oder erhöhten

Werte der freien Fettsäuren gegenüber den Kontrollpersonen. Zudem fanden wir keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der FTO- und der Kontrollgruppe bezüglich der basalen Cholesterin- und Triglyceridspiegel. Diese Feststellung deckt sich mit Andreasen et al., die wie wir keinen Zusammenhang zwischen FTO-Polymorphismen und erhöhten basalen Blutfetten fanden (Andreasen et al., 2008). In anderen Studien war dagegen vom Auftreten erhöhter Triglyceridspiegel und erniedrigter HDL-Cholesterinwerte bei Trägern von FTO-Risikogenotypen berichtet worden (Freathy et al., 2008, Hunt et al., 2008). Diese waren jedoch nicht mehr signifikant nach Adjustierung für den BMI, sodass die Änderungen primär auf die Adipositas und nicht auf das FTO-Gen per se zurückzuführen sind.

Unabhängig vom BMI wurde bei Trägern des A-Allels von FTO rs9939609 von einer signifikanten Assoziation mit zirkulierenden CRP-Spiegeln berichtet (Fisher et al., 2009). FTO-Risikogenotypen könnten demnach die Entstehung eines Inflammationszustands des Fettgewebes begünstigen und sogar eine systemische Entzündungsreaktion hervorrufen. Dieser Gedankengang ist vor allem im Hinblick auf die Pathogenese des Typ 2 Diabetes von Interesse, da hier ein Zusammenhang zwischen Adipositas, einer chronischen Entzündungsreaktion und der Ausbildung einer Insulinresistenz besteht (Zeyda and Stulnig, 2009, Schwarz, 2009). In unserer Studie konnten wir keine erhöhten CRP-Spiegel in der FTO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die Gründe für diese diskrepanten Befunde sind bislang unklar.

Zusammenfassend interpretieren wir die vorliegenden Daten in der Weise, dass die Assoziation zwischen Polymorphismen im FTO-Gen und dem Typ 2 Diabetes überwiegend durch Adipositas vermittelt wird und deshalb in der vorliegenden Studie bei Trägern von FTO-Risikogenvarianten kein unabhängiger Einfluss auf die Insulinsensitivität oder -sekretion zu verzeichnen war.

## VI. Zusammenfassung

---

Ziel der vorliegenden Studie war es, ein besseres Verständnis der Wirkung der Diabetes-assoziierten FTO- und TCF7L2-Genpolymorphismen zu erreichen, sodass zukünftig Personen mit einem erhöhten Krankheitsrisiko frühzeitig erkannt und gegebenenfalls therapiert werden können. Wir stellten uns daher die Frage, ob sich nichtdiabetische Träger von Diabetesrisikogenen von Kontrollprobanden hinsichtlich ihrer anthropometrischen Daten, ihrer Routine-Laborparameter, ihres Lipidstoffwechsels, aber vor allem in Bezug auf Insulinsekretion und -sensitivität unterscheiden.

Wir untersuchten 65 nichtdiabetische, männliche Probanden europäischen Ursprungs und führten bei diesen nach einem standardisierten Protokoll eine Erhebung der Anamnese, der anthropometrischen Daten und der basalen Laborparameter sowie anschließend einen intravenösen Glukosetoleranztest und einen hyperinsulinämisch euglykämischen Glukose-Clamp-Test durch.

Wir verzeichneten bei den Trägern des TCF7L2-Risikopolymorphismus eine im Vergleich zu den Kontrollpersonen signifikante Reduktion der frühen Phase der Insulinausschüttung, die wir dahingehend interpretieren, dass sie Folge einer gestörten intrinsischen Funktion pankreatischer  $\beta$ -Zellen und/oder durch eine Verminderung der  $\beta$ -Zelle-Masse bedingt ist. Darüber hinaus wiesen die TCF7L2-Risikoträger erniedrigte Plasmaglukagonspiegel im Nüchternzustand sowie während des „Steady State“ im Glukose-Clamp-Test auf. Erniedrigte Glukagonspiegel schwächen den parakrinen Effekt ab, durch den Glukagon stimulierend auf die Insulinsekretion einwirkt, was wiederum zur intrinsischen  $\beta$ -Zell-Dysfunktion beitragen könnte.

Die Träger des FTO-Risikopolymorphismus unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollprobanden bezüglich Indices zur Einschätzung der Insulinsensitivität und -sekretion. Wir gehen davon aus, dass die in der Literatur beschriebene Assoziation zwischen dem FTO-Gen und Typ 2 Diabetes überwiegend durch die Entwicklung einer Adipositas bei den betreffenden Genträgern vermittelt wird und kein unabhängiger Einfluss auf die Insulinsensitivität und -sekretion besteht. Da sich in der vorliegenden Studie die FTO-Risikoträger von den Kontrollpersonen nicht hinsichtlich ihrer anthropometrischen Daten, speziell des BMI, unterschieden, konnte der Einfluss der Adipositas auf die Glukosehomöostase nicht erfasst werden.

## VII. Literaturverzeichnis

---

- ADLER**, A. I., et al. (2003) Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*, **63** (1), 225-32.
- ALIBEGOVIĆ**, A. C., et al. (2010) The T-allele of TCF7L2 rs7903146 associates with a reduced compensation of insulin secretion for insulin resistance induced by 9 days of bed rest. *Diabetes*, **59** (4), 836-43.
- ANDREASEN**, C. H., et al. (2008) Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes*, **57** (1), 95-101.
- ARKAN**, M. C., et al. (2005) IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*, **11** (2), 191-8.
- ASSOCIATION**, A. D. (2007) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **30 Suppl 1**, S42-7.
- BATLLE**, E., et al. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, **111** (2), 251-63.
- BECK-NIELSEN**, H., et al. (2003) Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects--experiences from relatives and twin studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **17** (3), 445-67.
- BEKS**, P. J., et al. (1995) Peripheral arterial disease in relation to glycaemic level in an elderly Caucasian population: the Hoorn study. *Diabetologia*, **38** (1), 86-96.
- BRESSLER**, J., et al. (2010) Risk of type 2 diabetes and obesity is differentially associated with variation in FTO in whites and African-Americans in the ARIC study. *PLoS One*, **5** (5), e10521.
- BUTLER**, A. E., et al. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52** (1), 102-10.
- BYTZER**, P., et al. (2001) Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med*, **161** (16), 1989-96.
- CAMPBELL**, R. K. (2009) Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J Am Pharm Assoc (2003)*, **49 Suppl 1**, S10-5.
- CAMPIÓN**, J., et al. (1999) Inhibition by aldosterone of insulin receptor mRNA levels and insulin binding in U-937 human promonocytic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **70** (4-6), 211-8.

- CAUCHI**, S., et al. (2007) TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med (Berl)*, **85** (7), 777-82.
- CAUCHI**, S., et al. (2006) Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes. *Diabetes*, **55** (10), 2903-8.
- CHURCH**, C., et al. (2009) A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet*, **5** (8), e1000599.
- COBELLI**, C., et al. (2007) Assessment of beta-cell function in humans, simultaneously with insulin sensitivity and hepatic extraction, from intravenous and oral glucose tests. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293** (1), E1-E15.
- CONSORTIUM**, W. T. C. C. (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, **447** (7145), 661-78.
- CONSTANTINIDOU**, E. (2008) Effekte einer kurzfristigen kohlenhydratreichen Ernährung auf die Insulinsensitivität und den intramyozellulären Lipidgehalt bei gesunden Nachkommen von Typ 2 Diabetikern. *MEDIZINISCHEN FAKULTÄT*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- DAHLGREN**, A., et al. (2007) Variants of the TCF7L2 gene are associated with beta cell dysfunction and confer an increased risk of type 2 diabetes mellitus in the ULSAM cohort of Swedish elderly men. *Diabetologia*, **50** (9), 1852-7.
- DAMCOTT**, C. M., et al. (2006) Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes*, **55** (9), 2654-9.
- DEFRONZO**, R. A., et al. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, **237** (3), E214-23.
- DEL GUERRA**, S., et al. (2007) Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose. *Diabetes Metab Res Rev*, **23** (3), 234-8.
- DEL GUERRA**, S., et al. (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*, **54** (3), 727-35.
- DINA**, C., et al. (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*, **39** (6), 724-6.
- DO**, R., et al. (2008) Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes*, **57** (4), 1147-50.

- DONATH**, M. Y., et al. (2009) Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)*, **24**, 325-31.
- EHSES**, J. A., et al. (2007) Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*, **56** (9), 2356-70.
- ELBEIN**, S. C., et al. (2007) Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and type 2 diabetes, glucose homeostasis traits and gene expression in US participants of European and African descent. *Diabetologia*, **50** (8), 1621-30.
- FISCHER**, J., et al. (2009) Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*, **458** (7240), 894-8.
- FISHER**, E., et al. (2009) Association of the FTO rs9939609 single nucleotide polymorphism with C-reactive protein levels. *Obesity (Silver Spring)*, **17** (2), 330-4.
- FLOREZ**, J. C., et al. (2006) TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med*, **355** (3), 241-50.
- FONSECA**, S. G., et al. (2009) Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol*, **9** (6), 763-70.
- FRAYLING**, T. M., et al. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, **316** (5826), 889-94.
- FREATHY**, R. M., et al. (2008) Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*, **57** (5), 1419-26.
- FRYIRS**, M., et al. (2009) Cholesterol metabolism and pancreatic beta-cell function. *Curr Opin Lipidol*, **20** (3), 159-64.
- GERKEN**, T., et al. (2007) The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, **318** (5855), 1469-72.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ**, J. L., et al. (2008) Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population. *Diabetologia*, **51** (11), 1993-7.
- GRANT**, S. F., et al. (2008) Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PLoS One*, **3** (3), e1746.
- GRANT**, S. F., et al. (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, **38** (3), 320-3.

- GROVES**, C. J., et al. (2006) Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes*, **55** (9), 2640-4.
- GRUNNET**, L. G., et al. (2009) Increased recovery rates of phosphocreatine and inorganic phosphate after isometric contraction in oxidative muscle fibers and elevated hepatic insulin resistance in homozygous carriers of the A-allele of FTO rs9939609. *J Clin Endocrinol Metab*, **94** (2), 596-602.
- HAN**, X., et al. (2010) Implication of genetic variants near SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, TCF2, KCNQ1, and WFS1 in type 2 diabetes in a Chinese population. *BMC Med Genet*, **11**, 81.
- HANSSON**, O., et al. (2010) Molecular function of TCF7L2: Consequences of TCF7L2 splicing for molecular function and risk for type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, **10** (6), 444-51.
- HELGASON**, A., et al. (2007) Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet*, **39** (2), 218-25.
- HENRIKSEN**, E. J., et al. (2001) Selective angiotensin II receptor receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension*, **38** (4), 884-90.
- HERTEL**, J. K., et al. (2008) Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1,638 unselected patients with type 2 diabetes and 1,858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the HUNT study). *Diabetologia*, **51** (6), 971-7.
- HERTEL**, J. K., et al. (2011) FTO, type 2 diabetes, and weight gain throughout adult life: a meta-analysis of 41,504 subjects from the Scandinavian HUNT, MDC, and MPP studies. *Diabetes*, **60** (5), 1637-44.
- HINNEY**, A., et al. (2007) Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One*, **2** (12), e1361.
- HOLMAN**, R. R., et al. (2008) 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, **359** (15), 1577-89.
- HOTTA**, K., et al. (2008) Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet*, **53** (6), 546-53.
- HUNT**, S. C., et al. (2008) Association of the FTO gene with BMI. *Obesity (Silver Spring)*, **16** (4), 902-4.
- ICKS**, A., et al. (1997) Blindness due to diabetes: population-based age- and sex-specific incidence rates. *Diabet Med*, **14** (7), 571-5.

- IP**, W., et al. (2012) The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 is upregulated by insulin and represses hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **303** (9), E1166-76.
- KAMINSKA**, D., et al. (2012) Adipose tissue TCF7L2 splicing is regulated by weight loss and associates with glucose and fatty acid metabolism. *Diabetes*, **61** (11), 2807-13.
- KANETO**, H., et al. (1996) Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J*, **320 ( Pt 3)**, 855-63.
- KANNEL**, W. B. (1997) Cardiovascular risk factors in the elderly. *Coron Artery Dis*, **8** (8-9), 565-75.
- KANNEL**, W. B. and MCGEE, D. L. (1979) Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes Care*, **2** (2), 120-6.
- KATZ**, A., et al. (2000) Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **85** (7), 2402-10.
- KIRCHHOFF**, K., et al. (2008) Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia*, **51** (4), 597-601.
- KORINEK**, V., et al. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*, **19** (4), 379-83.
- KRISTIANSEN**, O. P. and MANDRUP-POULSEN, T. (2005) Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*, **54 Suppl 2**, S114-24.
- LASTRA-LASTRA**, G., et al. (2009) Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **71** (1), 1-6.
- LEGRY**, V., et al. (2009) Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism*, **58** (7), 971-5.
- LEHTOVIRTA**, M., et al. (2000) Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins. *Diabetologia*, **43** (3), 285-93.
- LI**, X., et al. (2010) A genetic variation in the fat mass- and obesity-associated gene is associated with obesity and newly diagnosed type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabetes Metab Res Rev*, **26** (2), 128-32.
- LOOS**, R. J., et al. (2007) TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and beta-cell function in a British European population. *Diabetes*, **56** (7), 1943-7.

- LUPI**, R. and DEL PRATO, S. (2008) Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab*, **34 Suppl 2**, S56-64.
- LUPI**, R., et al. (2002) Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*, **51** (5), 1437-42.
- LYSSENKO**, V., et al. (2005) Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. *Diabetes*, **54** (1), 166-74.
- LYSSENKO**, V., et al. (2007) Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*, **117** (8), 2155-63.
- MAEDLER**, K., et al. (2003) Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*, **52** (3), 726-33.
- MARZI**, C., et al. (2007) Variants of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) are strongly associated with type 2 diabetes but not with the metabolic syndrome in the MONICA/KORA surveys. *Horm Metab Res*, **39** (1), 46-52.
- MCCARTHY**, M. I. and ZEGGINI, E. (2009) Genome-wide association studies in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, **9** (2), 164-71.
- MEDICI**, F., et al. (1999) Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia*, **42** (2), 146-50.
- MEIGS**, J. B., et al. (2000) Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*, **49** (12), 2201-7.
- MORGAN**, C. L., et al. (2000) Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage. *Diabetes Care*, **23** (8), 1103-7.
- MORGAN**, N. G. (2009) Fatty acids and beta-cell toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **12** (2), 117-22.
- MORRIS**, A. P., et al. (2012) Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet*, **44** (9), 981-90.
- MUNIYAPPA**, R., et al. (2008) Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **294** (1), E15-26.
- MUNOZ**, J., et al. (2006) Polymorphism in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with reduced insulin secretion in nondiabetic women. *Diabetes*, **55** (12), 3630-4.

- OH**, K. J., et al. (2012) TCF7L2 modulates glucose homeostasis by regulating CREB- and FoxO1-dependent transcriptional pathway in the liver. *PLoS Genet*, **8** (9), e1002986.
- OLIVARES-REYES**, J. A., et al. (2009) Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, **302** (2), 128-39.
- PALMER**, N. D., et al. (2008) Association of TCF7L2 gene polymorphisms with reduced acute insulin response in Hispanic Americans. *J Clin Endocrinol Metab*, **93** (1), 304-9.
- PERRY**, J. R. and FRAYLING, T. M. (2008) New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **11** (4), 371-7.
- PILGAARD**, K., et al. (2009) The T allele of rs7903146 TCF7L2 is associated with impaired insulinotropic action of incretin hormones, reduced 24 h profiles of plasma insulin and glucagon, and increased hepatic glucose production in young healthy men. *Diabetologia*, **52** (7), 1298-307.
- POITOUT**, V. and ROBERTSON, R. P. (2008) Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*, **29** (3), 351-66.
- POULSEN**, P., et al. (2005) Heritability of insulin secretion, peripheral and hepatic insulin action, and intracellular glucose partitioning in young and old Danish twins. *Diabetes*, **54** (1), 275-83.
- RASMUSSEN-TORVIK**, L. J., et al. (2009) Preliminary report: No association between TCF7L2 rs7903146 and euglycemic-clamp-derived insulin sensitivity in a mixed-age cohort. *Metabolism*, **58** (10), 1369-71.
- RATHMANN**, W., et al. (2003) High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia*, **46** (2), 182-9.
- REES**, S. D., et al. (2011) An FTO variant is associated with Type 2 diabetes in South Asian populations after accounting for body mass index and waist circumference. *Diabet Med*, **28** (6), 673-80.
- RENSTRÖM**, F., et al. (2009) Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet*, **18** (8), 1489-96.
- ROEHRICH**, M. E., et al. (2003) Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem*, **278** (20), 18368-75.
- RUCHAT**, S. M., et al. (2009) Association between insulin secretion, insulin sensitivity and type 2 diabetes susceptibility variants identified in genome-wide association studies. *Acta Diabetol*, **46** (3), 217-26.

- SAXENA**, R., et al. (2006) Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes*, **55** (10), 2890-5.
- SAXENA**, R., et al. (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*, **316** (5829), 1331-6.
- SCHENK**, S., et al. (2008) Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*, **118** (9), 2992-3002.
- SCHERBAUM**, W. A. and KIESS, W. (2004a) Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Alter.) Evidenzbasierte Leitlinie DDG - Aktualisierung 2004, [www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de)
- SCHERBAUM**, W. A. and KIESS, W. (2004b) Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland.) Evidenzbasierte Leitlinie DDG - Aktualisierung 2004, [www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de).
- SCHWARZ**, V. (2009) [Inflammation as a factor of the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes]. *Ter Arkh*, **81** (10), 74-80.
- SCHÄFER**, S. A., et al. (2007) Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*, **50** (12), 2443-50.
- SCOTT**, L. J., et al. (2006) Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes*, **55** (9), 2649-53.
- SCOTT**, L. J., et al. (2007) A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*, **316** (5829), 1341-5.
- SCUTERI**, A., et al. (2007) Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*, **3** (7), e115.
- SHU**, L., et al. (2009) Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Hum Mol Genet*, **18** (13), 2388-99.
- SLADEK**, R., et al. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, **445** (7130), 881-5.
- SOLINAS**, G., et al. (2007) JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab*, **6** (5), 386-97.
- SOOP**, M., et al. (2000) The hyperinsulinaemic-euglycaemic glucose clamp: reproducibility and metabolic effects of prolonged insulin infusion in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*, **98** (4), 367-74.

- STEGMAYR**, B. and **ASPLUND**, K. (1995) Diabetes as a risk factor for stroke. A population perspective. *Diabetologia*, **38** (9), 1061-8.
- STOLERMAN**, E. S., et al. (2009) TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. *Diabetologia*, **52** (4), 614-20.
- STRATTON**, I. M., et al. (2000) Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, **321** (7258), 405-12.
- STUMP**, C. S., et al. (2006) Effect of antihypertensive agents on the development of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc*, **81** (6), 796-806.
- TAJIRI**, Y., et al. (1997) Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. *Endocrinology*, **138** (1), 273-80.
- TAN**, J. T., et al. (2008) FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. *Diabetes*, **57** (10), 2851-7.
- THORLEIFSSON**, G., et al. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet*, **41** (1), 18-24.
- TKÁČ**, I. (2009) Effect of intensive glycemic control on cardiovascular outcomes and all-cause mortality in type 2 diabetes: Overview and metaanalysis of five trials. *Diabetes Res Clin Pract*, **86 Suppl 1**, S57-62.
- TSCRITTER**, O., et al. (2007) Variation in the FTO gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans. *Diabetologia*, **50** (12), 2602-3.
- UYSAL**, K. T., et al. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, **389** (6651), 610-4.
- VAN DE WETERING**, M., et al. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, **111** (2), 241-50.
- VAN VLIET-OSTAPTCHOUK**, J. V., et al. (2007) Association of variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) with susceptibility to type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Diabetologia*, **50** (1), 59-62.
- VILLAREAL**, D. T., et al. (2010) TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes*, **59** (2), 479-85.
- VOIGHT**, B. F., et al. (2010) Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet*, **42** (7), 579-89.
- WALLACE**, T. M., et al. (2004) Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*, **27** (6), 1487-95.

- WANG**, F., et al. (2001) Islet amyloid develops diffusely throughout the pancreas before becoming severe and replacing endocrine cells. *Diabetes*, **50** (11), 2514-20.
- WARDLE**, J., et al. (2008) Obesity associated genetic variation in FTO is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab*, **93** (9), 3640-3.
- WEGNER**, L., et al. (2008) Impact of TCF7L2 rs7903146 on insulin secretion and action in young and elderly Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab*, **93** (10), 4013-9.
- WEYER**, C., et al. (1999) The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **104** (6), 787-94.
- WIENER**, C. M., et al. (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine. Self-Assessment and Board Review*.
- WOLF**, G. (2008) Role of fatty acids in the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nutr Rev*, **66** (10), 597-600.
- WREDE**, C. E., et al. (2002) Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem*, **277** (51), 49676-84.
- WÅHLÉN**, K., et al. (2008) The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res*, **49** (3), 607-11.
- YI**, F., et al. (2005) TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*, **280** (2), 1457-64.
- ZEGGINI**, E., et al. (2008) Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*, **40** (5), 638-45.
- ZEGGINI**, E., et al. (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, **316** (5829), 1336-41.
- ZETHELIUS**, B., et al. (2004) Insulin resistance, impaired early insulin response, and insulin propeptides as predictors of the development of type 2 diabetes: a population-based, 7-year follow-up study in 70-year-old men. *Diabetes Care*, **27** (6), 1433-8.
- ZEYDA**, M. and STULNIG, T. M. (2009) Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*, **55** (4), 379-86.
- ZHANG**, C., et al. (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes*, **55** (9), 2645-8.

**ZIEGLER**, D., et al. (1993) Prevalence and clinical correlates of cardiovascular autonomic and peripheral diabetic neuropathy in patients attending diabetes centers. The Diacan Multicenter Study Group. *Diabete Metab*, **19** (1 Pt 2), 143-51.

**ZIEMKE**, F. and MANTZOROS, C. S. (2010) Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*, **91** (1), 258S-261S.

## VIII. Danksagung

---

Für die freundliche Bereitstellung dieser Arbeit danke ich dem Direktor der Medizinischen Klinik Innenstadt des Klinikums der Universität München, Herrn Prof. Dr. med. M. Reincke.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. J. Seißler für die Überlassung dieser Arbeit und die intensive und kontinuierliche Betreuung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. med. Cornelia Then bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für Ihre Beratung bei der statistischen Auswertung der Arbeit möchte ich Frau Dipl.-Stat. Christine Adrion vom Institute for Medical Information Sciences, Biometry and Epidemiology (IBE) des Klinikums der Universität München Danke sagen.

Bester Dank sei auch Frau Katharina Aimer und Frau Christine Grünfeldt für ihre Unterstützung bei der Bestimmung der Glukagon- und C-Peptid-Werte ausgesprochen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Diabeteszentrums am Klinikum der Universität München, vor allem Frau Monika Offers, danke ich ganz herzlich sowohl für ihre Hilfe und Unterstützung als auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.