

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
-Abteilung für Molekulare Zellbiologie-
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. U. Beisiegel

**Assoziation des C1431T Polymorphismus
im humanen Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor γ Gen
(hPPAR γ)
mit dem Lipid- und Glukosestoffwechsel**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Arndt Christian Hagemann

aus Hamburg

Hamburg, im April 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, Vorsitzender:

Prüfungsausschuß, 2. Gutachter:

Prüfungsausschuß, 3. Gutachter:

Vorblatt, Inhaltsverzeichnis, Abkürzungen	i-iii
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Einführung	1
1.1.1. Der Glukosestoffwechsel	2
1.1.2. Der Lipidstoffwechsel	3
1.1.3. Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Syndrom X	5
1.2. Nukleäre Rezeptoren	8
1.2.1. Genetik und Expression des nukleären Rezeptors PPAR γ	11
1.2.2. Die Responsiblen Elemente und Liganden von PPAR γ	15
1.2.3. PPAR γ und die Differenzierung des Fettgewebes	17
1.2.4. PPAR γ und Insulinsensitivität	18
1.2.5. Polymorphismen im PPAR γ Gen	20
1.3. Problemstellung	23
1.4. Ziel der Arbeit	24
2. Methoden	25
2.1. Patientenkollektiv	25
2.2. DNA Gewinnung	25
2.3. Theoretische Grundlagen und experimentelle Durchführung der Versuche	26
2.3.1. PCR, RFLP, SSCP und Färbemethoden	26
2.3.2. PCR-RFLP von Pro12Ala	28
2.3.3. PCR-SSCP von C1431T	29
2.3.4. Sequenzierung	30
2.4. Statistische Analyse	31
2.5. Verwendete Chemikalien, Mischungen und Geräte	32
3. Ergebnisse	35
3.1. Charakterisierung des Kollektivs	35
3.2. Assoziation des C1431T Polymorphismus mit NIDDM und Glukose	39
3.3. Assoziation des C1431T Polymorphismus mit Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie	41
3.4. Assoziation des C1431T Polymorphismus mit dem Syndrom X	42

3.5. Kopplung des C1431T und Pro12Ala Polymorphismus	43
3.6. Zufallsbeobachtung: Ein SSCP im Exon 6	46
4. Diskussion	49
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturreferenzen	53
Lebenslauf, Danksagung, Eigenständigkeitserklärung	

ACO	Acyl-CoA-Oxidase
ADD1	Adipocyte determination differentiation dependent factor 1
AMP	Amoniumpersulfat
Apo	Apolipoprotein
BMI	Body mass index
C/EBP	CCAATT-enhancer binding protein
CAP	c-Cbl assoziiertes Protein
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAS	Fatty acid synthetase
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GCK	Glukokinase
GLUT	Glukose Transport Protein
GNRH	Gonadotropin releasing hormon
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA
HNF	Hepatocyte nuclear factor
IDDM	Insulin abhängiger Diabetes mellitus
IGF 1	Insulin-like growth factor 1
IPF1	Insulin promotor factor
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
MAP	Mitogene activated protein
MI	Myocardinfarkt
MODY	Maturity onset diabetes of the young
NADPH2	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NIDDM	Nicht Insulin abhängiger Diabetes mellitus
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PPAR	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	PPAR-responsible Element
RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RXR	Retinonsäure-X-Rezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SREBP1	Sterol regulatory element binding protein 1
SSCP	Single stranded confirmation polymorphism
TBE	Tris-Bor-EDTA
TC	Gesamtcholesterin
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyzeride
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRR	Terminator ready reaction mix
TSR	Template suppression reagent
TZD	Thiazolidinedion

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Die durch Atherosklerose entstehenden Krankheitsbilder Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Apoplex führen neben den Krebserkrankungen die durch Krankheiten verursachte Letalität und Morbidität in den Industrienationen an und sind deswegen Schwerpunkt medizinischer Forschung. Die Aufklärung dieser Gesundheitsprobleme ist volkswirtschaftlich sinnvoll.

Risikofaktoren zur Entwicklung einer Atherosklerose sind Nikotinabusus, fettreiche und hochkalorische Ernährung, Streß, das Alter, das männliche Geschlecht, körperliche Inaktivität und einige klassische Erkrankungen des Alters wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Dyslipoproteinämie (hohe TG, niedriges HDL sowie Hypercholesterinämie) und Adipositas. Diese Risikofaktoren sind seit der epidemiologischen Framingham Studie anerkannt [28 72]. Einige dieser Atherosklerose prädisponierenden Erkrankungen wie Koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt (MI), Hypertonus und Diabetes mellitus Typ II treten in manchen Familien gehäuft auf. Sie werden als polygen angesehen, also verursacht durch multiple genetische Faktoren an unabhängigen Genorten, da sie im allgemeinen nicht den Mendelschen Gesetzen folgen. Später wurde auch noch die Bezeichnung multifaktoriell hinzugefügt, um den vielfältigen Faktor Umwelt mit einzubeziehen [46 115]. Es sind also polygene Erkrankungen durch multiple interagierende Gene, die in ihren besonderen Konstellationen ein genetisches Risiko bergen, im Zusammenhang mit bestimmten Umweltfaktoren die Erkrankung zu begünstigen oder gar auszulösen. Eine genetische Prädisposition im Sinne einer genetischen Variante kann die Sensibilität für Risikofaktoren wie z.B. Alkohol, Nikotin und hochkalorische Ernährung potenzieren und auf diese Weise eine genetische Determination für die Erkrankung darstellen. Daher wird in der Therapie und Prävention solcher Erkrankungen der Ausschluß dieser Risikofaktoren immer von entscheidender Bedeutung sein.

Alle diese Gegebenheiten erschweren die Erkenntnis, ob ein neu entdeckter Polymorphismus eine Krankheit begünstigt oder gar verursacht, enorm. Im Gegensatz zu den monogenen Krankheiten, bei denen vielleicht einfache Stammbaumanalysen Aufklärung bringen, sind polygene multifaktorielle Krankheiten nicht problemlos mit einem Polymorphismus zu assoziieren, da Umwelteinflüsse und Interaktionen auf genetischer Ebene schwer zu erfassen sind. Gängiger Weise bedient man sich heute der Assoziationsstudien, wobei Polymorphismen innerhalb eines Kandidatengens im Verhältnis zum Wildtyp in einem größeren Kollektiv untersucht und statistisch analysiert werden. Diese Methode wurde auch in dieser Arbeit verfolgt. Allerdings muß zwischen Assoziation und der zufälligen Kopplung einer Variation mit dem Phänotyp unterschieden werden, damit sich keine Fehler in der Interpretation einschleichen [149].

Als Kandidatengen für eine Assoziationsstudie mit Hinblick auf Atherosklerose prädisponierende Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II oder Dyslipidämie würde z.B. ein Gen in Frage kommen, welches den Lipid- oder Glukosestoffwechsel reguliert. Ein Polymorphismus in einem solchen Gen würde sich durch Symptome offenbaren, die mit der Funktion bzw. Dysfunktion der beeinflussten Gene und Proteine im Zusammenhang stehen.

1. Einleitung

Eine Familie nukleärer Transkriptionsfaktoren mit dem Namen Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR), von denen gegenwärtig die drei Subtypen α , β/δ (ehemals als NUC-1 oder FAAR benannt) und γ bekannt sind, stellen ein wichtiges Bindeglied in der Lipid- und Glukosehomöostase dar [99 112 114 118]. Diese nukleären Rezeptoren regulieren die Lipid- und Glukosehomöostase durch Regulation der Expression von Genen des Glukose- sowie des intra- und extrazellulären Lipidstoffwechsels. Ferner sind sie an der Adipogenese beteiligt [43 108 113 114 118]. Als durch Fettsäuren aktivierte nukleäre Rezeptoren sind sie in diesem Zusammenhang besonders interessant.

Die Gruppe der synthetischen Thiazolidinedione (TZD) und der N-Aryl-Tyrosine [11] und Isoxazolidinedione [81] stellen hoch selektive Liganden von PPAR γ dar. TZD ziehen eine deutlich verbesserte Insulin Sensibilität und Blutzucker senkende Wirkung nach sich [58 76 109]. Offensichtlich wird dieser Effekt durch PPAR γ moduliert, sollte kein unbekanntes Protein durch diese Substanzen beeinflusst werden [139]. Insofern ist der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor γ ein geeignetes und interessantes Kandidatengen.

Seit der ersten gelungenen Klonierung durch Issemann *et al* Green S [60] sind die PPAR's bereits Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten im Hinblick auf die erwähnten Erkrankungen gewesen. Andere Schwerpunkte der PPAR Forschung sind die direkte Beteiligung von PPAR's an der Atherogenese [107 108] sowie die potentielle Fähigkeit einer Transdifferenzierung maligner Zellen durch synthetische PPAR γ Agonisten [31 43 66 70 90 91 108 110].

1.1.1. Der Glukosestoffwechsel

Der Stoffwechsel der Glukose beginnt nach der Hydrolyse der Kohlenhydrate und der nachfolgenden Resorption über die Darmmukosa mit der Aufnahme der Glukose aus dem Blut durch die Hepatozyten und andere Zellen in der Peripherie. Die intrazelluläre Aktivierung für den weiteren Stoffwechsel stellt die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) durch die Hexokinase oder die hepatische Glukokinase dar. Von diesem Ausgangsprodukt aus sind verschiedene Stoffwechselwege in Abhängigkeit der physiologischen oder pathologischen situativen Rahmenbedingungen möglich. Die physiologischen Rahmenbedingungen des Glukosestoffwechsels werden besonders durch die Hormone Insulin und Glukagon geprägt. G-6-P kann z.B. als Glykogenpolymer in der Leber oder im Muskel gespeichert werden. Die Muskulatur kann einmal aufgenommene Glukose nicht mehr in die Peripherie abgeben, da in der Muskulatur keine G-6-P-Phosphatase exprimiert wird.

Der Abbau des G-6-P zu Pyruvat stellt den wesentlichen Abbauprozess der Glukose dar, Pyruvat wird dann dem oxidativen Abbau im Citratzyklus zugeführt oder unter anaeroben Verhältnissen zu Laktat abgebaut. Das v.a. in der Muskulatur entstandene Laktat kann wieder ins Blut abgegeben und in der Leber der Glukoneogenese zugeführt werden (Cori-Zyklus).

Die Regulation der Glykolyse und der Glukoneogenese muß der Stoffwechselsituation zur Aufrechterhaltung eines konstanten Blutzuckerspiegels stets angepaßt sein. Hierzu dienen hormonelle Regulationsmechanismen der einzelnen Enzyme des Glukosestoffwechsels auf Transkriptionsebene (der nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR γ z.B. reguliert die Expression der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase als Schrittmacherenzym der Glukoneogenese [128]) sowie die direkte allosterische Produkt-Enzym Hemmung (Die Reaktionsrichtung der Laktatdehydrogenase ist abhängig von der Konzentration des Substrates und des Produkts). Auch Phosphorylierungen einzelner Enzyme durch cAMP oder ATP-abhängige Proteinkinasen sind bekannt (siehe z.B. die regulativen Enzyme der Phosphorylasen beim Glykogenabbau, die sogenannten Phosphorylase-Kinasen).

G-6-P kann auch in den Pentosephosphatzyklus eintreten. Der Pentosephosphatweg ist eine wichtige Quelle der NADPH+H-Synthese und der Ribosephosphatsynthese. Ribosephosphate sind wiederum Ausgang der Synthese von Nukleinsäuren, Nucleotiden, Purinen und Pyrimidinen [15].

1.1.2. Der Lipidstoffwechsel

Der Lipidstoffwechsel wird in einen exogenen und einen endogenen Weg unterteilt. Der exogene Weg beinhaltet die Aufnahme der durch Gallensäuren emulgierten Nahrungsfette (Triglyzeride, Phospholipide und Cholesterin) nach Einwirken der pankreatischen Lipase. In den Mukosazellen werden aus Fettsäuren (FS) und Glycerol Triglyzeride (TG) resynthetisiert und mit Cholesterin und Phospholipiden in Chylomikronen inkorporiert. Die Chylomikronen enthalten neben Apo C-III auch Apo B-48, ein nur in Chylomikronen und "remnants" vorkommendes Apolipoprotein, und werden auf lymphatischen Wege über den Ductus thoracicus in den rechten Vorhof drainiert. Nur kurz- bis mittelkettige Fettsäuren vermögen direkt im Blut gelöst über die Vena portae die Leber zu erreichen.

Auf dem Weg zur Leber werden die Chylomikronen durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) durch Hydrolyse der TG erheblich in Masse und Volumen reduziert, wodurch den peripheren Zellen freie FS angeboten werden können. Die Reste der Chylomikronen, die "remnants", die v.a. noch Cholesterin enthalten, werden von der Leber über den spezifischen "remnant" Rezeptor aufgenommen. Das Cholesterin kann von den Hepatozyten in Gallensäuren umgewandelt oder zur weiteren Synthese verwandt werden. Cholesterin ist Bestandteil der Zellmembran und ein Grundbaustein wichtiger Steroidhormone wie z.B. des Cortisols, Progesterons und Provitamin D. Der Körper ist zur Eigensynthese des Cholesterins durch die Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase befähigt und folglich müßte Cholesterin nicht mit der Nahrung aufgenommen werden.

Ausgeschieden wird Cholesterin als Gallensäure bzw. als gelöstes Cholesterin in der Galle. Teilweise wird das Cholesterin auch wieder aus dem Darm resorbiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als "enterohepatischen Kreislauf".

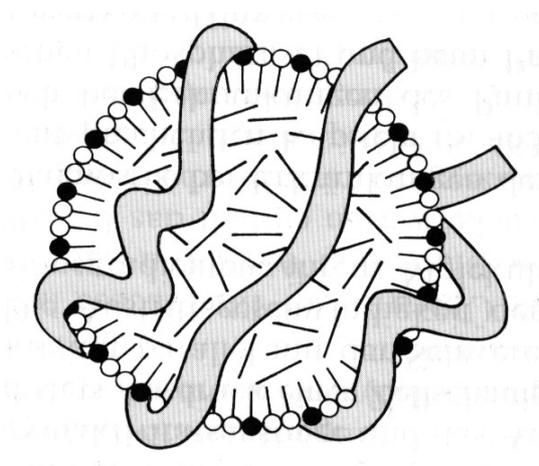


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Lipoproteins. Das Apolipoprotein ist um den hydrophoben Kern aus Triglyzeriden und Cholesterin-Estern gewickelt. Die äußere Schicht enthält allerdings auch Phospholipide und nicht verestertes Cholesterin. Aus Buddecke E [15].

1. Einleitung

Als endogenen Lipidstoffwechsel bezeichnet man den Kreislauf der in der Leber gebildeten Lipoproteine. Lipoproteine, die in unterschiedlicher Dichte vorkommen (VLDL, IDL, LDL, HDL), beinhalten Apolipoproteine, die die hydrophoben Fette in Lösung bringen und den Metabolismus beeinflussen. Von den Apolipoproteinen gibt es im wesentlichen fünf Familien mit unterschiedlichen Charakteristika, die Apolipoproteine A-E.

Die Hepatozyten bilden nach Aufnahme der "remnants" über den "remnant" Rezeptor triglyzeridreiche Lipoproteine aus den "remnants", das VLDL, die v.a. die Apolipoproteine Apo C-III und Apo B-100 enthalten. Über den Blutweg und die Lipoproteinlipase werden wieder FS an periphere Zellen abgegeben und die Zusammensetzung der VLDL Fraktion wird konsekutiv reicher an Cholesterin, sie werden dann IDL genannt und tragen Apo E.

IDL wird teils wieder von der Leber aufgenommen, teils verbleibt die Fraktion jedoch auch im Blut und wird durch weitere Abgabe von FS in der Peripherie und Übernahme von Cholesterin aus HDL zu LDL modifiziert. LDL enthält daher sehr viel Cholesterin und kann von allen peripheren Zellen und Hepatozyten über den LDL-Rezeptor, v.a. auch von Makrophagen und Monozyten über den "Scavenger"-Rezeptor, aufgenommen werden. Die peripheren Zellen benötigen das Cholesterin als Membranbestandteil oder zur Synthese von Steroidhormonen. Die LDL-Rezeptor vermittelte Aufnahme der LDL durch die Leber mit der Resynthese von VLDL sowie der Produkt-Enzym Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch das aufgenommene Cholesterin wird als LDL-Clearance verstanden.

Erhöhtes LDL > 160 mg/dl (ohne Risikofaktoren, mit Risikofaktoren sollte LDL < 130 mg/dl, bei Patienten mit peripherer oder koronarer Verschlusskrankheit sogar < 100 mg/dl betragen) stellt ein Risiko für Atherosklerose dar.

Neben den "Cholesterin verteilenden" Lipoproteinen gibt es auch noch das "Cholesterin sammelnde" HDL. HDL wird in der Leber synthetisiert und trägt v.a. Apo A-I und Apo A-II, aber auch Apo D. Ein Großteil des Cholesterins aus den peripheren Zellen wird durch HDL mit Hilfe des Enzyms Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) und dem Cholesterinester-Transportprotein (CETP) an IDL oder VLDL weitergegeben. HDL wird auch direkt in der Leber metabolisiert. HDL ist das bedeutendste Lipoprotein des "reversen Cholesterintransportes" und zeigt koronarprotektive Eigenschaften [15 28 45 46 72 113 114].

Tabelle 1: Eigenschaften und Funktionen von Apolipoproteinen. Nach Schwandt P *et al* [115].

	Molmasse (kDa)	Vorkommen	Funktion
Apo A-II	28	HDL	LCAT-Aktivierung
Apo A-III	17	HDL	Phospholipidbindung
Apo B-100	550	LDL, VLDL	Sekretion von TG aus Leber und Dünndarm
Apo B- 48	265	Chylomikronen, "remnants"	Resorption von Lipiden/fett-löslichen Vitaminen im Darm
Apo C-II	8,8	VLDL, Chylomikronen	Aktivierung der LPL
Apo C-III	8,9	VLDL, Chylomikronen	Inhibition der LPL
Apo D	29	HDL-3	LCAT-Aktivierung
Apo E	34	VLDL, Chylomikronen, HDL-E	Ligand für LDL-Rezeptor

1. Einleitung

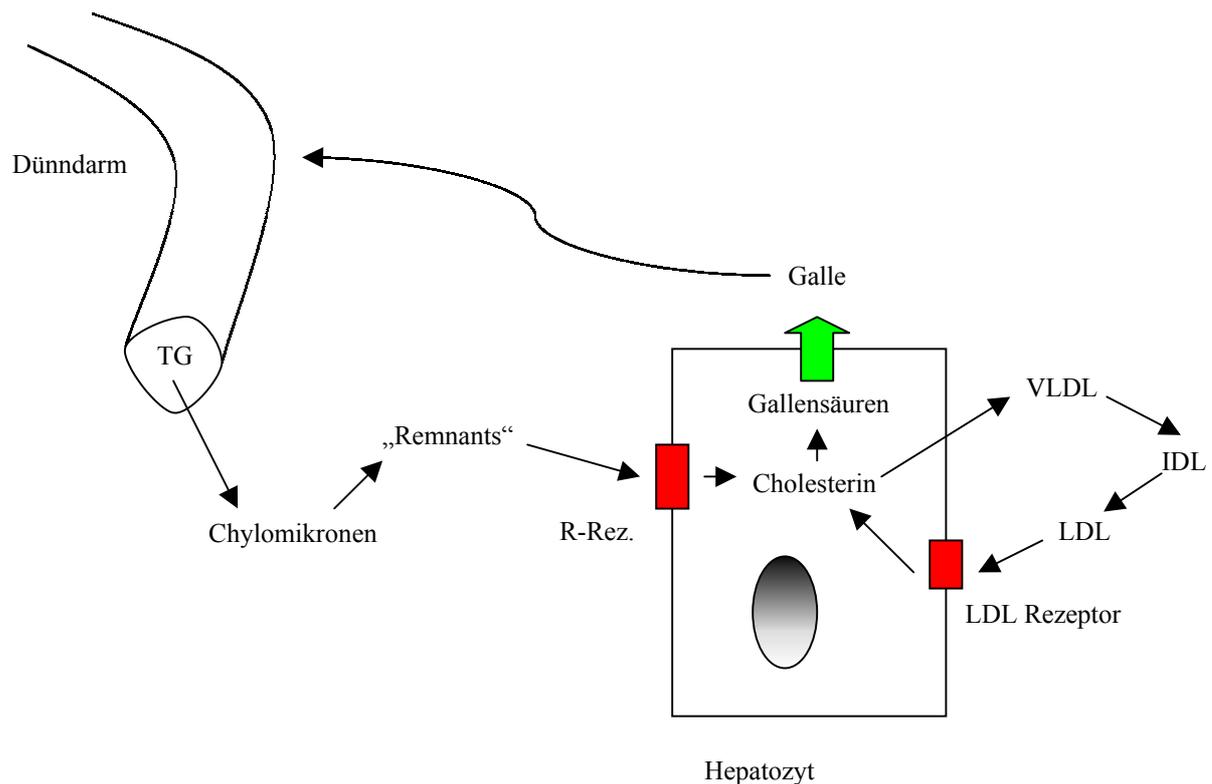


Abb. 2. Schematische Darstellung des exogenen (links) und endogenen (rechts) Lipoprotein-Stoffwechsels. Bei der Umwandlung von Chylomikronen in Remnants und von VLDL über IDL in LDL spielt die endothelständige Lipoproteinlipase der Peripherie eine wesentliche Rolle (nicht abgebildet). R-Rez.: Remnant-Rezeptor.

1.1.3. Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Syndrom X

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, in deren Folge nach Jahren Schäden an Blutgefäßen, Niere, Retina und peripherem Nervensystem auftreten. Der Diabetes wird in zwei Typen eingeteilt, den Insulin-pflichtigen Typ I ("insulin dependent diabetes mellitus" IDDM) und den nicht Insulin-pflichtigen Typ II ("non insulin dependent diabetes mellitus" NIDDM).

Der Insulin-pflichtige Typ I (IDDM), bei dem zusätzlich zur Genetik eine Virus Ätiologie diskutiert wird und der ferner Beziehung mit bestimmten HLA-Typen (DR 3 und DR 4) aufweist, ist ein Insulin-Mangel-Diabetes. Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, da Insulinantikörper, Insellzellantikörper und Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase der β -Zellen sowie die Tyrosinphosphatase IA-2 gefunden werden [46 54]. Die Diagnose stellt sich klinisch durch Polydipsie, Ketoseneigung mit evtl. metabolischer Azidose, Hyperglykämie (> 126 mg/dl nüchtern und > 200 mg/dl nach zwei Stunden im OGTT), Poly- und Glukosurie, sowie verminderte Spiegel von C-Peptid und Insulin. Die Erstmanifestation ist meist akut und im Jugendalter. Die Behandlung des IDDM konzentriert sich auf die Substitution des Insulins und Diät [27 46].

Dagegen ist der Diabetes mellitus Typ II (NIDDM) pathophysiologisch durch eine Insulinresistenz begründet und wird als polygene und multifaktorielle Erkrankung angesehen [46 54 115]. Die Insulinresistenz beim NIDDM kann auf einem Mangel oder Defekt an Rezeptoren, auf einem Fehler in der Signaltransduktion der Insulinkaskade distal des Rezeptors oder auf einer gestörten Glukoseverwertung in der Zelle beruhen [27 46 54 115].

Der NIDDM ist mit einer Prävalenz von 5-7 % in der Bevölkerung der Industrienationen eine sehr häufige Erkrankung mit zunehmender Tendenz (weltweit ca. 200 Millionen Fälle [54 89], Häufigkeit des Typ I lediglich im Promille-Bereich). Die gesundheitsökonomischen Konsequenzen sind gravierend, die jährlichen Kosten der Behandlung des Diabetes und seiner Folgen belaufen sich in Deutschland auf ca. 16 Milliarden Euro [79].

Der NIDDM wird ferner in die Typen IIa und IIb unterteilt, wobei Typ IIa den nicht adipösen und Typ IIb den adipösen NIDDM kennzeichnet. Der NIDDM ist im allgemeinen nicht Insulin-pflichtig, erst im späteren Verlauf kann es im Rahmen einer endokrinen Pankreas β -Zell Erschöpfung zum Insulinmangel kommen. Dem geht häufig eine Jahre überspannende Phase eines physiologisch erhöhten C-Peptid- sowie Insulinspiegels voraus, um der Insulinresistenz entgegen zu wirken. Unglücklicherweise resultiert die Hyperinsulinämie in einer "Downregulation" der Insulinrezeptoren, was den circulus vitiosus komplettiert [46 54 115].

Die Diagnose des NIDDM stellt sich klinisch aus Hyperglykämie und Insulinresistenz (evtl. mit Hyperinsulinämie und erhöhtem C-Peptid), pathologischer OGTT, Glukosurie, meistens schleichender und später Beginn > 40. Lebensjahr, selten Ketose (eher ein hyperosmolares Koma), Infektionsneigung und Pruritus, sehr häufig begleitende Adipositas und Hypertriglyceridämie.

Der NIDDM wird primär konservativ (mit Gewichtsreduktion, Blutglukosekontrollen (auch HbA1c- und Fibrinogen-Kontrollen), Diät und Mobilisation des Patienten) und nur wenn notwendig medikamentös mit Antidiabetika behandelt. Dafür stehen Sulfonylharnstoff-derivate (z.B. Glibenclamid), das Biguanid Metformin, α -Glukosidase-Inhibitoren oder neuere Substanzen wie z.B. Repaglinide und Thiazolidinedione zur Verfügung.

Da die Adipositas einen wesentlichen Manifestationsfaktor des NIDDM darstellt, wäre eine medikamentöse Therapie häufig nicht notwendig, wenn die Reduktion des Gewichts gelingen würde, wie Präventivstudien (z.B. die "Diabetes Prevention Study") gezeigt haben [131]. Dies ist leider noch viel zu selten der Fall. Die Adipositas ist wesentlich von den Lebensumständen und der Ernährung abhängig, genetische Ursachen werden jedoch diskutiert [39 40].

Der NIDDM kann mit anderen Erkrankungen vergesellschaftet oder durch sie verursacht sein. Dabei wären besonders der Morbus Cushing und der Morbus Conn zu erwähnen. Auch Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Phäochromozytome, Akromegalie, die Hämochromatose ("Bronzediabetes"), CMV-Infektion, Hyperthyreose, die Gestation, kongenitale Röteln-Infektion, lipoatrophische Erkrankungen und sogar seltene Tumore wie Glucagonome, Somatostatinoide oder Aldosteronome können einen NIDDM hervorrufen. Der NIDDM ist ferner mit genetischen Syndromen wie z.B. dem Klinefelter-, dem Down- und dem Turner-Syndrom assoziiert [27 46 54].

Der NIDDM kann Folge iatrogener Maßnahmen sein, insbesondere der durch Applikation von Medikamenten induzierte NIDDM bei Cortikoiden, auch STH und ACTH, die zum sogenannten Steroid-Diabetes führen können. Auch β -Adrenergika und Thiazide lösen selten einen NIDDM aus. Der pankreoprive Diabetes tritt nach totaler oder partieller Pankreatektomie auf [27 54].

Den häufigsten Manifestationsfaktor des NIDDM stellt jedoch bei weitem das Übergewicht dar [27 46 54 115].

Eine seltene Sonderform des Diabetes ist der MODY. MODYs fallen durch sehr frühe Manifestation des NIDDM im Alter vor dem 25. Lebensjahr sowie einen primären Defekt der Insulinsekretion auf [41 49]. MODYs zeigen häufig nur eine mäßige Hyperglykämie und sind resistent gegenüber einer Ketose. Es sind keine Insellantikörper nachweisbar.

Die Genetik ist bereits relativ genau beschrieben. Für den Vererbungsmodus autosomal-dominant sprechen die häufige direkte Transmission durch drei Generationen einer Familie,

1. Einleitung

das 1:1 Verhältnis diabetischer und nicht-diabetischer Kinder bei einem Elter mit MODY, ferner die hohe Penetranz der bisher bekannten Defekte (90% aller Allelträger werden phänotypisch auch Diabetiker) sowie die direkte Vererbung von Vater auf Sohn, die einen X-chromosomalen Erbgang ausschließt [46].

Ca. 55 % der Diabetiker versterben am Herzinfarkt oder Apoplex und viele leiden bei nicht effektiver Zuckereinstellung an koronarer oder peripherer Verschlusskrankheit sowie diabetischer Neuropathie, Retinopathie oder Nephropathia Kimmelstiel-Wilson (diabetische Glomerulohyalinose). Diese Komplikationen sind Folgen der unspezifischen Makro- und diabetischen Mikroangiopathie. Auch eine intramurale Koronarsklerose tritt auf ("small vessel disease"). Die diabetische Mikroangiopathie beruht vermutlich auf einer nicht enzymatischen Glykosilierung der Basalmembranen der Endstrombahn.

Die Prognose des Diabetes Patienten hängt stark vom Zustand der Gefäße und somit von der BZ Einstellung ab. Weitere Kontrollparameter stellen HbA1c und Fibrinogen dar. Die zweithäufigste Todesursache ist die terminale Niereninsuffizienz (ca. 30 % aller Dialyse-Patienten sind Diabetiker).

Allerdings erleiden auch viele optimal eingestellte Patienten nach langem Verlauf eine oder mehrere Komplikationen: einige Faktoren sind hier offensichtlich noch nicht genau bekannt [27 46 54 115].

Dyslipidämie stellt einen ungenauen Begriff für die Störung einzelner oder mehrerer Bestandteile des Lipidstoffwechsels dar. Es gibt Dystriglyceridämien, Dyscholesterinämien, Dyslipoproteinämien und Dysapolipoproteinämien. Von Hypertriglyceridämie, die zur Pankreatitis prädisponiert, spricht man bei TG > 180 mg/dl. Das Gesamtcholesterin sollte nicht > 200 mg/dl liegen (Hypercholesterinämie), wobei diagnostisch der LDL Fraktion wegen des Koronarrisikos besonderes Interesse zukommt: LDL sollte nicht > 160 mg/dl liegen (Hyperlipoproteinämie), bei bekanntem Risiko < 130 mg/dl, bei manifester KHK oder AVK sogar < 100 mg/dl. HDL als koronarprotektiver Faktor sollte > 40 mg/dl messen [28 45 46 72]. Bei den Dysapolipoproteinämien ist das Lipoprotein(a) oder Apo(a) mit einer besonders hohen Atherogenität vergesellschaftet [115].

Das Syndrom X (oder metabolische Syndrom) ist definiert als Kombination von Hyperinsulinämie mit Insulinresistenz, Adipositas, Hypertonus, Dyslipidämie (erhöhte TG und ein vermindertes HDL) sowie Hyperurikämie und verkörpert eine klassische Wohlstandskrankheit. Alle Faktoren des Syndroms X begünstigen per se die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen der Gefäße und beim Syndrom X sind gleich mehrere dieser Faktoren miteinander in einer Person vergesellschaftet. Patienten mit dieser Erkrankung haben somit ein erhöhtes Risiko an Atherosklerose zu erkranken und die Folgen dieser Gefäßveränderung wie KHK, MI, arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Apoplex zu erleiden [30 46 54 115]. Das Koronarrisiko eines Patienten mit dem Syndrom X soll mindestens verdoppelt sein [115].

Für die eigentlich klinisch zu stellende Diagnose liegt werden unterstützend folgende Parameter verwendet: Insulin-Spiegel > 13 mU/l, TG > 1,7 mmol/l, HDL < 40 mg/dl. Das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu HDL liegt häufig bei > 5. Klinische Zeichen der Insulinresistenz sind ein BMI > 30 kg/m², stammbetonte Adipositas, Hypertonus (systolisch > 160 mmHg und diastolisch > 96 mmHg) und mindestens ein Verwandter 1. Grades mit NIDDM. Häufig ist auch das Fibrinogen erhöht.

Insulinresistenz und "buffalo neck" können iatrogen bedingte klinische Symptome der antiretroviralen Therapie mit Indinavir sein. Durch Interaktion des Indinavir mit "sterol regulatory element binding protein 1" (SREBP1) könnte laut Caron M *et al* die Insulinresistenz bei diesen Patienten begründet sein [17].

1.2. Nukleäre Rezeptoren

Die Zellen stehen permanent im Austausch mit ihrer unmittelbaren Umgebung und müssen auf systemische Kontrollsignale reagieren. Dazu dienen unterschiedliche Rezeptoren. Hydrophile Signalsubstanzen und Transmitter binden an Rezeptoren, die sich in der Plasmamembran befinden und mittels einer Signaltransduktion durch "second messenger" die Information an das Innere der Zellen leiten. Dagegen können lipophile Stoffe wie zum Beispiel Steroidhormone durch einfache oder erleichterte Diffusion die Zellmembran überwinden und an intrazellulär im Cytosol oder Nucleus lokalisierte nukleäre Rezeptoren binden. Diese nukleären Rezeptoren treten dann direkt in Kontakt mit dem Genom und übermitteln ihren regulativen Einfluß als Transkriptionsfaktoren. Die nukleären Rezeptoren stellen die größte bekannte Familie der Transkriptionsfaktoren in Eukaryozyten dar [114].

Die nukleären Rezeptoren enthalten eine DNA bindende Domäne, die aus zwei Zink-Finger-Komplexen besteht. Den Zink-Finger-Komplexen folgen α -helikale Strukturen, durch die Basen spezifische Kontakte mit dem Genom ermöglicht werden, und zwar mit einer komplementären Basensequenz (responsible Element). Einmal an die DNA gebunden wird die Gentranskription aktiviert oder inhibiert. Dies geschieht durch die direkte Interaktion mit dem Transkriptions-Präinitiations-Komplex [113 114]. Dabei können sie wiederum durch Phosphorylasen induziert oder inhibiert werden, z.B. durch MAP-Kinase [1 57 145 146]. Green S beschrieb, daß nukleäre Rezeptoren eine gewisse Promiskuität aufweisen und die Freiheit haben, unterschiedliche responsible Elemente mit unterschiedlicher Affinität anzusprechen [52]. Auch können verschiedene Liganden an diese Rezeptoren ansetzen. Diese Stufen unterschiedlicher Affinität könnten ein Hinweis dafür sein, das es noch subtilere und bisher unbekannte Mechanismen der Regulation von "target" Genen gibt, von denen noch nichts bekannt ist [113].

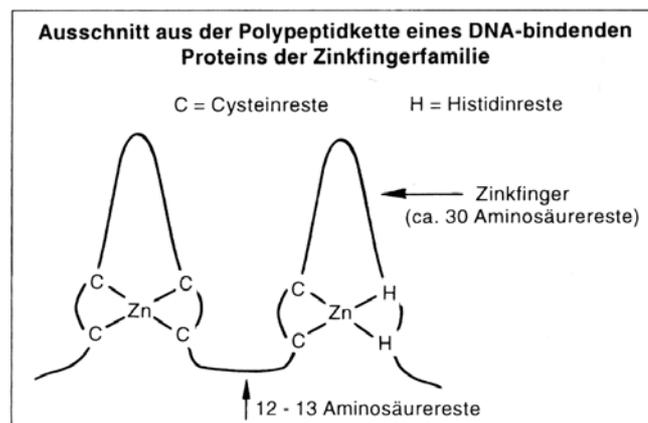


Abb. 3. Allgemeine schematische Darstellung eines Zinkfingermodells aus Buddecke E [15].

Die nukleären Rezeptoren können nach ihrem DNA Bindungsverhalten in vier Klassen unterteilt werden [83]. Klasse I umfaßt die Steroid Rezeptoren, die im Cytosol lokalisiert sind und nach Bindung eines Liganden in den Nucleus diffundieren. Zu den Liganden der Klasse I gehören Glukocortikoide, Androgene, Progesteron, Östrogen und Mineralkortikoide.

Klasse II Rezeptoren heterodimerisieren mit Retinonsäure-X-Rezeptor (RXR). Sie befinden sich im Cytosol und im Nukleus. Der Thyreoidrezeptor, der Retinonsäurerezeptor, der Vitamin-D-Rezeptor und Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren gehören zu dieser Klasse. Dabei werden sie von zahlreichen hormonellen und nutritiven Faktoren beeinflusst [113 114].

Klasse III Rezeptoren heterodimerisieren direkt an repetitive DNA wie z.B. der 9-cis Retinonsäurerezeptor und der Hepatozyten-Nukleäre-Faktor 4 (HNF-4).

Klasse IV Rezeptoren binden als Monomere an eine einzelne hexamere "core site", die sich einige Sequenzen vor dem eigentlichen Motiv befindet. Zu dieser Gruppe gehört SF-1, RZR- α , Rev-erb- α und - β sowie NGF-1B [114].

Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR), die der Klasse II angehören und mit RXR heterodimerisieren, existieren in verschiedenen Subtypen. PPAR α , PPAR γ und PPAR β/δ (ehemals als NUC-1 oder FAAR benannt), sind bekannt. PPAR γ koexistiert wiederum in drei Isotypen. In Form von Transkriptionsfaktoren stehen PPAR's mit dem Fettstoffwechsel, der Lipid- und Glukosehomöostase sowie der Adipogenese, Atherogenese, Differenzierung und Zellwachstum im Zusammenhang [3 43 108 112 113 114 119 136]. Evolutionsanalysen haben bestätigt, daß PPAR's eine eigene und neue Superfamilie von nukleären Rezeptoren darstellen, die nur in höheren Vertebraten und Mammalia gefunden wird [32].

Die Bezeichnung Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) für diese Transkriptionsfaktoren ist historisch bedingt. Lange Zeit war bekannt, daß viele Substanzen wie Fibrate, Fettsäuren, Herbizide, Hormone, NSAR, Glukokortikoide, aber auch Hunger, Vitamin E Mangel, Hyperthyreose und ein entgleister Diabetes eine Proliferation von Peroxisomen auf zellulärer Ebene zufolge hatten [114]. Nach der Entdeckung vermeintlicher Rezeptoren für dieses Phänomen nannte man sie PPARs. Die erste Klonierung wurde von Issemann I *et* Green S vorgenommen [60].

PPAR α kontrolliert die Lipidoxidation sowie Energiehomöostase und beeinflusst Entzündung [112]. Vom Namen her den meisten unbekannt, ist doch eine PPAR α aktivierende Substanz seit langer Zeit im klinischen Einsatz. Fibrate induzieren nämlich via PPAR α die hepatische LPL und reduzieren die Expression von Apo C-III in der Leber, weswegen Fibrate auch therapeutisch bei VLDL/LDL Hypercholesterinämien und Hypertriglyceridämien genutzt werden [63 75 112 120]. PPAR α wird fast ausschließlich in der Leber exprimiert [113 114].

PPAR α ist von existentieller Bedeutung bei der Regulation von Enzymen der β - und ω -Oxidation. In Mäusen mit einer durch homologe Rekombination provozierten "knock out" Mutagenese im PPAR α Gen konnte gezeigt werden, daß eine Induktion von β -oxidativen Enzymen durch PPAR γ Aktivatoren nicht mehr möglich war [13 108]. Auch wenn diese Mäuse mit PPAR α Aktivatoren behandelt werden, können sie weder β - noch ω -oxidative Enzyme exprimieren [73].

Einige inflammatorische Arachidonsäure-Metaboliten wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene aktivieren PPAR α . Dadurch stimulieren diese Mediatoren die β - und ω -Oxidation. Durch PPAR α stimulieren diese Entzündungsmediatoren also ihren eigenen Katabolismus. Somit nimmt PPAR α Einfluß auf den Verlauf der Entzündung, was für Leukotrien B4 bereits gezeigt werden konnte [77]. Glucocortikoide nehmen ferner Einfluß auf die Transkription von PPAR α [121].

Der L162V Polymorphismus in PPAR α ist bei Diabetikern mit einem niedrigeren BMI assoziiert [37]. Für eine genauere Beschreibung der Charakteristik von PPAR α möchte ich verweisen auf Schoonjans K *et al* und Rosen ED *et al* [108 112 113].

1. Einleitung

PPAR β/δ (ehemals als NUC-1 oder FAAR benannt) wird kaum in der Leber exprimiert, aber in allen anderen Geweben, besonders stark in Hirn und Fettgewebe. Funktionell sind keine gesicherten Aspekte dieses Gens bekannt [114].

PPAR γ reguliert die Lipid- und Glukosehomöostase, die Adipozytendifferenzierung und Erhaltung des differenzierten Zustandes dieser Zellen, sowie die Insulinsensitivität. Die durch PPAR γ beeinflussten Enzyme und Proteine sind meist im intra- und extrazellulären Fettstoffwechsel beteiligt, v.a. Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation und des Fettsäuretransports. Es werden jedoch zahlreiche andere Gene von diesem Transkriptionsfaktor beeinflusst, die weiter unten beschrieben werden [43 99 107 108 112 113 114 118].

PPAR γ Funktionsübersicht

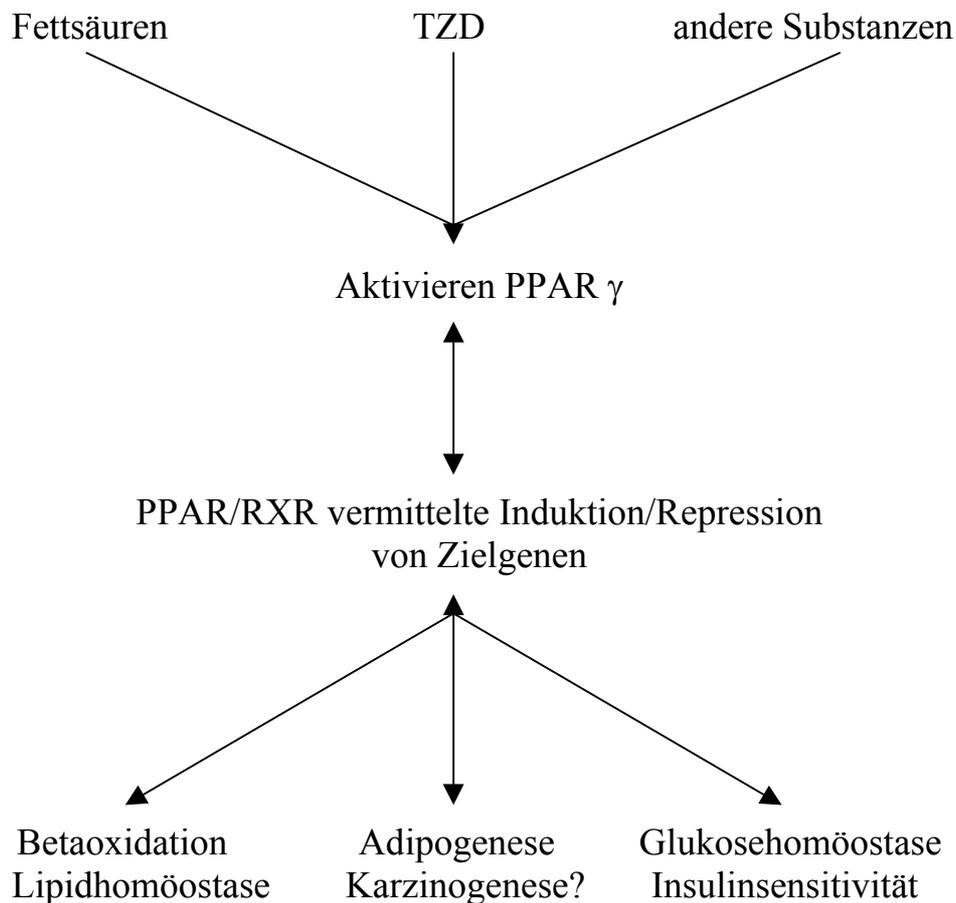


Abb. 4. PPAR γ Funktionsübersicht. Andere PPAR γ Aktivatoren sind z.B. Arachidonsäuremetaboliten und Pharmaka wie Indometacin (u.a. NSAR), Dexamethason und Thiazolidinedione (TZD).

1.2.1. Genetik und Expression des nukleären Rezeptors PPAR γ

PPAR γ wird in zwei Isotypen unterteilt, $\gamma 1$ und $\gamma 2$. Kürzlich wurde auch ein dritter Isotyp von PPAR γ nachgewiesen, der nur im Fettgewebe und im Kolon exprimiert wird und einen eigenständigen Promotor aufweist [44]. Über PPAR $\gamma 3$ ist jedoch außer seiner Aktivierung durch TZD und Prostaglandin J-Derivate noch nichts bekannt.

Die Expression der Isotypen $\gamma 1$ und $\gamma 2$ wird durch unterschiedliche Promotor und alternatives Splicing eines Gens ermöglicht, welches auf Chromosom 3, Band 3p25 lokalisiert ist [6]. Die Expression ist ferner in einer Gewebs-spezifischen Weise unterschiedlich reguliert [138].

PPAR $\gamma 1$ wird durch 8 Exons kodiert, PPAR $\gamma 2$ durch 7 Exons [42]. Die 5'-Sequenz von PPAR $\gamma 1$ wird durch die Exons A1 und A2, die 5'-Sequenz von PPAR $\gamma 2$ durch Exon B kodiert, ein zwischen den Exons A1 und A2 gelegenes Exon [42]. Die kodierende Region, die beide Isoformen miteinander teilen, umfaßt 6 Exons, Exon 1-6 [6 42]. Dieser Umstand erleichtert das Screening möglicher Polymorphismen in den beiden Isotypen $\gamma 1$ und $\gamma 2$ innerhalb der gemeinsamen Exons 1-6. Die Sequenz von PPAR $\gamma 1$ und PPAR $\gamma 2$ ist identisch mit der Ausnahme von 84 zusätzlichen Nukleotiden am 5' Ende von PPAR $\gamma 2$, die eine aus dem Exon B resultierende N-terminale Verlängerung um 28 Aminosäuren mit sich bringt [6 35].

Die zusätzlichen 28 Aminosäuren von PPAR $\gamma 2$ stellen eine Aktivierungsdomäne dar. Diese Domäne kann Liganden unabhängig durch Phosphorylierung aktiviert werden. PPAR $\gamma 2$ kann also wie viele andere Klasse II Rezeptoren durch Liganden sowie Liganden unabhängig (z.B. durch Insulin) aktiviert werden [138 146]. Die Potenz von PPAR $\gamma 2$ ist als Folge dessen 5-6 fach so hoch wie die von PPAR $\gamma 1$.

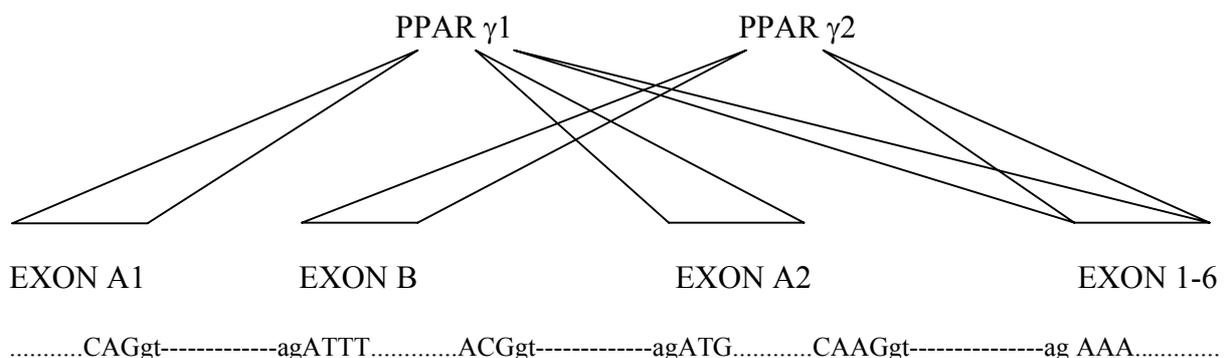


Abb. 5. Splicing der zwei PPAR γ Isotypen aus einem Gen. Introns gestrichelt, Exons gepunktet. Alle Introns unterliegen der gt...ag Regel. Modifiziert nach Fajas L *et al* [42]. PPAR $\gamma 3$ bleibt unberücksichtigt.

Die DNA Bindungsdomäne von PPAR $\gamma 1$ und PPAR $\gamma 2$ wird durch die Exons 2 und 3 kodiert, jedes Exon für einen separaten Zinkfinger kodierend (66 Aminosäuren laut [113]). Die Zinkfinger ermöglichen die Bindung an PPAR-responsible Elemente (PPRE), die vor dem Promotor des funktionalen Teils des Zielgens liegen. Die Liganden Bindungsdomäne wird durch die Exons 5, 6 und 7 codiert. Die Größe der Introns im PPAR γ Gen entspricht denen anderer Säugetiere [35 53]. Alle Introns unterliegen der gt...ag Regel [6]. Insgesamt hat sich die Sequenz des PPAR γ Gens in der Phylogenese

1. Einleitung

seit den Vertebraten konstant gehalten, ein Zeichen für die Eminenz dieses Gens [32 35]. Ein PPAR homologes Gen in *Drosophila melanogaster* ist der Transkriptionsfaktor E75 [114].

Durch die Sequenzierung von PPAR γ 1 und PPAR γ 2 wurde die Messung der Expression der beiden Isoformen in Geweben durch "RNase protection assay" ermöglicht. Die Expression von PPAR γ 1 ist konstant höher als die von PPAR γ 2 [143].

PPAR γ 1 wird beim Menschen in hohem Ausmaße im Fettgewebe und Kolon (im Kolon auch PPAR γ 3) exprimiert [42 44]. Mäßig dagegen ist die Expression in der Leber und der Niere, und erstaunlicher Weise nur gering in quergestreiftem Muskel, wo im wesentlichen die Insulin vermittelte Metabolisierung der Glukose stattfindet [42 138].

PPAR γ 2 wird in Fettgewebe und in der Leber, jedoch nur minimal detektierbar in Muskulatur exprimiert [42]. Die Expression von PPAR γ 2 ist deutlich durch nutritive Faktoren sowie Adipositas beeinflusst [133 134].

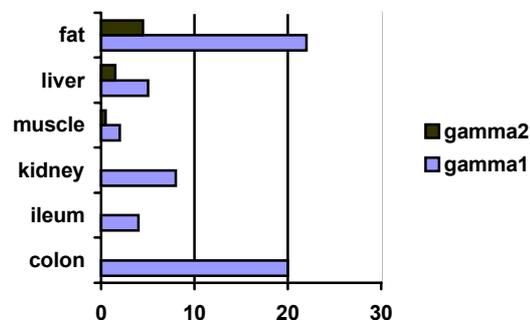


Abb. 6. Expression von PPAR γ mRNA aus Fajas L *et al* [42]. PPAR γ 3 ist nicht berücksichtigt, alle Angaben in nmol/μg RNA.

Die Präsenz von PPAR γ 1 und PPAR γ 3 im Kolon ist wegen der bekannten Beteiligung von Arachidonsäure Metaboliten und Fettsäuren an der Entwicklung von Pathologien des Kolons interessant. Ω -3-Fettsäuren stehen im Verdacht entzündliche Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu begünstigen [9 122].

Diäten reich an Lipiden tierischer Herkunft prädisponieren die Entstehung autonomer Gewebe im Kolon, wobei der genaue Mechanismus der Tumor-Initiation nicht bekannt ist [50 137]. PPAR γ als Rezeptor für Fettsäuren könnte hier ein Bindeglied darstellen. Stimulation von PPAR γ mit synthetischen Agonisten in C57BL/61-APCMin/+ Mäusen rief vermehrt Kolon Karzinome hervor [74].

Allerdings sind hier auch viele Ergebnisse veröffentlicht, die PPAR γ und dessen Stimulation mittels synthetischen selektiven Agonisten wie Troglitazone (erstes von der FDA zugelassene TZD) mit inhibiertem Zell- und Tumorwachstum sowie einer zunehmenden Differenzierung assoziieren. Kolon Karzinome könnten also durch PPAR γ Agonisten zu einem differenzierterem und somit eher benignem autonomen Gewebe im Sinne eines neoadjuvanten "down-staging" oder einer "Differenzierungstherapie" moduliert werden [43 66 89 108 110]. Auch Zellen aus Liposarkomen, Adenokarzinomen der Mamma und der Lunge, Karzinomen von Magen, Ösophagus, Prostata, Niere, Leber und Pankreas, B-Zell-

1. Einleitung

Lymphome und Astrozytome des Menschen ließen sich mit TZD in histopathologisch höher differenziertere Tumore konvertieren oder es wurde Apoptose ausgelöst [16 19 31 33 43 51 59 62 70 90 91 92 108 111 127 130].

Kürzlich erschien eine Untersuchung die zwar den antiproliferativen "anticancer-effect" der TZD bestätigte, jedoch wurde die Hypothese einer PPAR γ unabhängigen Wirkung vorgestellt. TZD sollen die Initiation der Translation inhibieren oder direkt Apoptose von Krebszellen auslösen, was auch in PPAR γ Knockout Zellen gelang [51 98]. Mittlerweile gibt es sogar die Idee einer Chemoprävention von Brustkrebs mit PPAR γ Liganden [11].

Die Expression von PPAR γ wird wesentlich auf Transkriptionsebene durch Insulin, "adipocyte determination differentiation dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1" (ADD1/SREBP1), TZD und Tumornekrosefaktor α (TNF α) beeinflusst [145 146]. Während insbesondere Insulin einen induktiven Faktor darstellt, ist TNF α ein repressiver Faktor, der zusätzlich via MAP-Kinase PPAR γ 2 am Serin 112 inhibitorisch zu phosphorylieren vermag [1 43 57 90 102 145 146]. TNF α wird daher als führender Antagonist des Insulins hinsichtlich der PPAR γ Expression angesehen [145]. Auch die GATA-2 und GATA-3 Transkriptionsfaktoren und Prostaglandin F₂ α inhibieren die Expression von PPAR γ [43 102]. GATA ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die an (A/T)GATA(A/G) Basensequenzen binden.

Initial in der embryonalen und fetalen Periode stellen "CCAATT/enhancer binding protein" (C/EBP) β und C/EBP δ die wesentlichen Faktoren für den Anstoß der PPAR γ Expression und die Adipogenese dar [42].

1. Einleitung

1	ATGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTATTGACCCAGAAAGCGATTCCCTTCACTGATACACTGTCTGCAA	70
1	M G E T L G D S P I D P E S D S F T D T L S A N	24
71	ACATATCACAAAGAAATGACCATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCCACCAACTTTGGGATCAGCTC	140
24	I S Q E M T M V D T E M P F W P T N F G I S S	47
141	CGTGGATCTCTCCGTAATGGAAGACCACTCCCCTCCTTTGATATCAAGCCCTTCACTACTGTTGACTTC	210
47	V D L S V M E D H S H S F D I K P F T T V D F	70
211	TCCAGCATTTCTACTCCACATTACGAAGACATTCCATTCACAAGAACAGATCCAGTGGTTGCAGATTACA	280
71	S S I S T P H Y E D I P F T R T D P V V A D Y K	94
281	AGTATGACCTGAAACTTCAAGAGTACCAAAGTGCAATCAAAGTGGAGCCTGCATCTCCACCTTATTATTC	350
94	Y D L K L Q E Y Q S A I K V E P A S P P Y Y S	117
351	TGAGAAGACTCAGCTCTACAATAAGCCTCATGAAGAGCCTTCCAACCTCCCTCATGGCAATTGAATGTCST	420
117	E K T Q L Y N K P H E E P S N S L M A I E C R	140
421	GTCTGTGGAGATAAAGCTTCTGGATTTCTACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTCTTCC	490
141	V C G D K A S G F H Y G V H A C E G C K G F F R	164
491	GGAGAACAATCAGATTGAAGCTTATCTATGACAGATGTGATCTTAACTGTGGATCCACAAAAAAGTAG	560
164	R T I R L K L I Y D R C D L N C R I H K K S R	187
561	AAATAAATGTCAGTACTGTGGTTTTCAGAAATGCCTTGCAGTGGGGATGCTCATAATGCCATCAGGTTT	630
187	N K C Q Y C R F Q K C L A V G M S H N A I R F	210
631	GGCGGATGCCACAGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTGGCGGAGATCTCCAGTGATATCGACCAGCTGAATC	700
211	G R M P Q A E K E K L L A E I S S D I D Q L N P	234
701	CAGAGTCCGCTGACCTCCGGCCCTGGCAAACATTTGTATGACTCATACATAAAGTCCCTCCCGCTGAC	770
234	E S A D L R A L A K H L Y D S Y I K S F P L T	257
771	CAAAGCAAAGGCGAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACAACAGACAATCACCATTGCTTATCTATGACATG	840
257	K A K A R A I L T G K T T D K S P F V I Y D M	280
841	AATTCCTTAATGATGGGAGAAGATAAAATCAAGTTCAAACACATCACCCCCCTGCAGGAGCAGAGCAAAG	910
281	N S L M M G E D K I K F K H I T P L Q E Q S K E	304
911	AGGTGGCCATCCGCATCTTTCAGGGCTGCCAGTTTCGCTCCCTGGAGGCTGTGCAGGAGATCACAGAGTA	980
304	V A I R I F Q G C Q F R S V E A V Q E I T E Y	327
981	TGCCAAAAGCATTCCTGGTTTTGTAATCTTGACTTGAACGCCAAGTAACTCTCCTCAATATGGAGTC	1050
327	A K S I P G F V N L D L N D Q V T L L K Y G V	350
1051	CACGAGATCATTTACACAATGCTGGCCTCCTTGATGAATAAAGATGGGGTTCTCATATCCGAGGGCCAAG	1120
351	H E I I Y T M L A S L M N K D G V L I S E G Q G	374
1121	GCTTCATGACAAGGGAGTTTCTAAAGAGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTGACTTTATGGAGCCAAGTTTGA	1190
374	F M T R E F L K S L R K P F G D F M E P K F E	397
1191	GTTTGTGTGAAGTTCAATGCCTGGAATTAGATGACAGCGACTTGGCAATATTTATTGCTGTCAATTATT	1260
397	F A V K F N A L E L D D S D L A I F I A V I I	420
1261	CTCAGTGGAGACCGCCAGGTTTCTGCTGAATGTGAAGCCCATTGAAGACATTCAAGACAACCTGCTACAAG	1330
421	L S G D R P G L L N V K P I E D I Q D N L L Q A	444
1331	CCCTGGAGCTCCAGCTGAAGCTGAACCCACCTGAGTCCCTCACAGCTGTTTGCCAAAGCTGCTCCAGAAAAT	1400
444	L E L Q L K L N H P E S S Q L F A K L L Q K M	467
1401	GACAGACCTCAGACAGATTGTACCGAACACGTCAGCTACTGCAGGTGATCAAGAAGACGGAGACAGAC	1470
467	T D L R Q I V T E H V Q L L Q V I K K T E T D	490
1471	ATGAGTCTTACCCGCTCCTGCAGGAGATCTACAAGGACTTGACTAG	1513
491	M S L H P L L Q E I Y K D L Y * 506	

Abb. 7. Basen- und Aminosäuresequenz von PPAR γ 2 aus Elbrecht A *et al* [35]. Methionin 29 entspricht dem Initiator Methionin von PPAR γ 1.

1.2.2. Die verantwortlichen Elemente und Liganden von PPAR γ

Wie erwähnt bindet PPAR γ als Heterodimer mit RXR an "direct repeats" oder PPRES, die DR-1 genannt werden. PPAR α und PPAR δ binden an die gleichen PPRES [113 114]. Es handelt sich dabei um repetitive Motive (AGGTCA- oder TGACCT-Motive) mit variierenden intermittierenden Nukleotiden, die unmittelbar vor den Promotoren der "target"-Gene liegen. Nach Bindung des PPAR/RXR Heterodimers an ein PPRE ist die induktive oder repressive Regulation der Transkription durch direkte Interaktion mit dem Transkriptions-Präinitiations-Komplex ermöglicht. Aus den zumeist induzierten Proteinen lassen sich die Funktionen und Effekte von PPAR γ (und den anderen PPARs) ableiten. Die PPRES werden von verschiedenen Subtypen der PPARs in gleicher Weise stimuliert, da die PPARs die selben PPRES benutzen [108 113 114]. Das Schlüssel-Schloß-Prinzip ist bei diesen Rezeptoren aufgehoben [52], das einzige bisher beschriebene PPRE, daß nur von PPAR γ aktiviert wird, ist PEPCK [128 129]. Die Spezifität der Regulation wird durch das unterschiedliche Expressionsmuster der PPAR Subtypen in verschiedenen Geweben gewährleistet [113 114]. Allerdings kann eine genaue Trennung der einzelnen PPARs hier nicht erfolgen, so daß in diesem Kapitel die PPRES der PPARs wie bei Schoonjans K *et al* zusammengefaßt sind [113 114]. Genauere Literaturangaben hinsichtlich der einzelnen PPRES, so nicht anders angegeben, finden sich in Schoonjans K *et al* [113 114].

PPAR senkt die Plasmatriglyzeride durch gesteigerte Hydrolyse infolge induzierter Lipoproteinlipase (LPL) in Hepatozyten und Adipozyten sowie verminderter Apo C-III und Apo B-Expression, wodurch eine verstärkte Clearance von VLDL sowie eine verminderte hepatische Synthese von VLDL ermöglicht ist. Apo C-III inhibiert die membranständige LPL und verhindert die zelluläre Aufnahme von Fettsäuren aus VLDL, Apo B wird für die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Darm benötigt.

Die PPRES in Enzymen wie LPL, Fettsäuretransport-protein (FATP), Acyl-CoA-Synthetase (ACS) und anderen Enzymen wie das Adipozyten Fettsäure-Bindungsprotein P2 (aP2), das Leber Fettsäure-Bindungsprotein (L-FABP) und Acyl-CoA-Bindungsprotein ermöglichen die Beeinflussung der Enzyme, die FS in die Zellen befördern und für den weiteren Metabolismus aktivieren. So wird der Rückfluß der Fettsäuren aus den Zellen in die Peripherie verhindert. Auch die Enzyme der β -Oxidation enthalten größtenteils induzierende PPRE's, z.B. Acyl-CoA-Oxidase (ACO), Enoyl-CoA-Hydratase (HD) und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase.

Die Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) (das Schrittmacherenzym der Fettsäuresynthese) und der Fettsäuresynthase-Komplex (FAS) wird negativ reguliert, was zur Senkung der endogenen TG Produktion beiträgt. Ein weiteres "down-regulierendes" PPRE ist im Leptin Gen zu finden [85 112]. Ein verminderter Leptin-Spiegel hat ein erhöhtes Hungergefühl zur Folge [61 132].

Eine Senkung des TC wird bei Gabe von TZD beobachtet, allerdings wird diese Senkung durch eine PPAR γ unabhängige Inhibition der HMG-CoA-Reduktase herbeigeführt, wobei die TC Synthese zu 80% gesenkt wird [135]. Ein PPRE wurde im HMG-CoA-Reduktase-Gen nicht gefunden. Zum Vergleich: HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wie Simvastatin senken LDL um 40% und Triglyzeride um 25% [63].

PPAR vermittelt den induktiven Effekt von freien Fettsäuren auf HDL durch Induktion der Transkription von Apo A-I und Apo A-II. Apo A-I und Apo A-II sind die wesentlichen Apolipoproteine von HDL. HDL bindet freie Phospholipide und nimmt Cholesterin auf. Mit HDL ist eine koronarprotektive Funktion verbunden [45 69 113 114].

1. Einleitung

Neben der Expressionsebene (Induktion durch ADD1/SREBP1 und C/EBP-Familie, Inhibition durch TNF α) wird PPAR γ durch unterschiedliche Substanzen (PPAR γ 2 auch Liganden unabhängig durch Phosphorylasen) aktiviert. Dabei spielen Arachidonsäure-metaboliten, also v.a. Prostaglandin J2-Derivate (v.a. 15-d-PG J2), die vermutlich die endogenen Liganden von PPAR γ darstellen, eine besondere Rolle [113 114]. Auch freie Fettsäuren und ω -3 Fettsäuren aktivieren PPAR γ [42].

Die jedoch relativ geringe Affinität von 15-d-PG J2 spricht für andere, bisher noch nicht entdeckte endogene Liganden. Dabei könnte vielleicht "polyunsaturated fatty acids" (PUFA) besondere Bedeutung zukommen [12 118]. Es gibt noch einige Unklarheiten bezüglich des Hauptliganden von PPAR γ , so es überhaupt einen gibt, da nukleäre Rezeptoren promiskuitives Verhalten zeigen [52]. Fragwürdig ist auch, ob einige in Frage kommenden Substanzen überhaupt in der für eine Aktivierung notwendigen Konzentration im Zellkern vorkommen [43 102]. Relativ starke PPAR γ aktivierende Pharmaka sind z.B. Indometacin, Acetylsalicylsäure und Glukokortikoide [114 121].

Die Gruppe der synthetischen und antidiabetischen Thiazolidinedione (TZD) haben höhere Affinität zu PPAR γ als 15-d-PG J2 und binden selektiv alle drei Isotypen [35 44 76 118]. Isoxazolidinedione und N-Aryltyrosine sind kürzlich als PPAR γ Aktivatoren beschrieben worden [11 81]. TZD senken ferner die Blutglukose bei adipösen Diabetikern sowie TC und TG [18 26 69 76 114 135 143].

TZD verbessern die Insulinsensitivität und vermindern eine Insulinresistenz [58 109 139]. Dies wird womöglich durch Ausgleicheung einiger Defekte in der Signalkaskade distal des Insulinrezeptors sowie erhöhter Expression von IRS-1, GLUT1, GLUT2 und GLUT4 und einer erhöhten Glykolyserate in Hepatozyten erreicht [26 64 69]. TZD können in ihrer Wirkungsweise auch eine durch Isoproterenol oder TNF α ausgelöste Inhibition der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase in 3T3-L1 Adipozyten antagonisieren [56 80 147].

TZD senken via PPAR γ auch den Blutdruck in hypertensiven NIDDM Patienten und verhindern scheinbar die Proliferation, Hypertrophie und Migration von "vascular smooth muscle cells" durch Inhibition der MAP-Kinase [69] und Suppression proinflammatorischer Signalstoffe der Makrophagen innerhalb der Gefäßwand wie IL-6, IL-1 β , TNF α , Gelatinase und SR-A [108]. Auch der LDL senkende Einfluß der TZD hemmt die Atherogenese.

Damit könnten TZD als selektive Aktivatoren von PPAR γ zur Prävention von atherosklerotischen Veränderungen sowie typischen diabetischen Organkomplikationen beitragen [69 89 108 136].

TZD lösen in menschlichen Krebszellen in vitro Differenzierung, Apoptose und "cell cycle arrest" aus, wobei dieser Vorgang eventuell unabhängig von PPAR γ ist [33 43 51 70 90 98 127 130].

Leider sind bei der Applikation von Troglitazone (erstes von der FDA zugelassene TZD Derivat, 1997 zugelassen, 2000 zurückgezogen) bei NIDDM Patienten hepatotoxische Ereignisse beobachtet worden, in einer indischen Studie sogar bei 2% aller Patienten [124 142]. In dieser Studie sprachen weitere 20% überhaupt nicht auf Troglitazone an. Allerdings wurden Rosiglitazone und Pioglitazone, zwei weitere TZD, von der FDA 1999 zugelassen und scheinen weit weniger hepatotoxischen Nebenwirkungen zu haben. Die bisher gesehenen Nebenwirkungen beschränkten sich auf Ödeme, Gewichtszunahme, Hb-Abfall, ALT (Alanin-Amino-Transferase oder GPT) Anstieg und eventuell Hypoglykämie, wenn mit anderen Antidiabetika kombiniert wird [89]. Mittlerweile liegt einige Erfahrung mit TZD vor, alleine in den USA wurden bereits im Jahr 2000 mehr als eine Million Patienten mit TZD behandelt [91]. Auch ist eine NIDDM Präventionsstudie bei Frauen mit Gestationsdiabetes durchgeführt worden mit dem Ergebnis 56 %-iger Risikoreduktion (TRIPOD-Studie) [14].

1.2.3. PPAR γ und die Differenzierung des Fettgewebes

Die Determination der Adipoblasten aus omnipotenten Mesenchymzellen und die Entwicklung von Adipozyten aus Adipoblasten wird durch drei unterschiedliche Familien von Transkriptionsfaktoren gewährleistet, der "CCAATT-enhancer binding protein" (C/EBP) Familie, PPAR γ sowie dem "adipocyte determination differentiation dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1" (ADD1/SREBP1) [3 42 113 119]. ADD1/SREBP1 ist ein Helix-Loop-Helix Protein mit zweifacher DNA Bindungs Domäne und transaktiviert den Promotor von FAS und Leptin [65].

Die Expression von PPAR γ wird durch C/EBP β [113] und C/EBP δ [42] induziert und stellt entwicklungsbiologisch den initialen Trigger für das adipogene Programm dar. Im späteren Verlauf kommt es zu einer simultanen Aktion von PPAR γ und C/EBP α [129], ADD1/SREBP1 wird ebenfalls sehr früh und kontinuierlich exprimiert [129]. PPAR γ 2 und ADD1/SREBP1 sind bereits in sehr frühen Stadien der Adipogenese in Präadipozyten stark vermehrt detektierbar [118]. All diese Faktoren sind nicht nur zur Differenzierung der Adipozyten, sondern auch für den Erhalt der Funktionalität des Fettgewebes während der gesamten Lebenszeit notwendig [43].

Während der Differenzierung werden zahlreiche spezifische Enzyme des Fettsäure- und Lipidmetabolismus und der Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle induziert und vermehrt exprimiert, z.B. aP2, LPL, FATP, FAS, ACS, PEPCK, ACO, HD, L-FABP und verschiedene Apolipoproteine (Apo A-II und Apo A-I), die alle PPREs enthalten [45 69 113 114]. Die Menge der im Fettstoffwechsel integrierten und von PPAR „kontrollierten“ Enzyme legt dabei die bedeutsame Rolle von PPAR γ in der Differenzierung von Adipozyten nahe.

PPAR γ und C/EBP α können eine Transdifferenzierung von Myoblasten in Adipozyten induzieren. Fibroblasten konvertieren bei Koexpression von PPAR γ und C/EBP α ohne Aktivator zu Adipozyten [118 129]. Auch durch Applikation von PPAR γ Aktivatoren wie 15-d-PG J2 oder TZD wurden Fibroblasten in Adipozyten transdifferenziert [118 129]. Aus diesen Beobachtung ist die Schlußfolgerung zu ziehen, daß PPAR γ Aktivatoren wie z.B. freie Fettsäuren, TZD, Fibrate und auch Prostanoiden adipogenes Potential haben und die Adipozytendifferenzierung induzieren und intensivieren können [20 113 114 129]. Daher kann es bei Therapie mit TZD zur Gewichtszunahme kommen. Die erwähnten Beobachtungen legten auch den Grundstein der Hypothese einer möglichen "Differenzierungstherapie" maligner Zellen.

Physiologische Stimulatoren der Adipogenese in vivo sind Insulin, "insulin like growth factor 1" (IGF-1), Wachstumshormone, Corticosteroide und auch TZD [12 26 134], die allesamt die adipogenen Transkriptionsfaktoren stimulieren. Insulin z.B. hat ein responsables Element in ADD1 [134]. Die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase scheint bei der Signaltransduktion physiologischer Stimuli der Adipogenese eine wichtige Rolle zu spielen. Tatsächlich konnten mit Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Inhibitoren die frühe Phase des Differenzierungsprogrammes in einer Zeit und Dosis abhängigen Art und Weise blockiert werden, wobei auch die Expression von PPAR γ mRNA signifikant erniedrigt war [141].

Prostaglandin F 2α blockiert die Adipogenese durch Aktivierung der MAP-Kinase, die ebenfalls durch TNF α aktiviert wird und in einer inhibitorischen Phosphorylierung von PPAR γ resultiert. Eine Inhibition der Adipogenese wird auch durch die GATA-2 und GATA-3 Rezeptoren ermöglicht [43 102 145].

1.2.4. PPAR γ und Insulinsensitivität

TZD und andere PPAR γ Aktivatoren haben Insulin sensibilisierende Effekte [11 18 26 69 81 125 143]. Wie PPAR γ Agonisten die verbesserte Insulinsensitivität ermöglichen, ist bisher relativ unklar, zumal PPAR γ wesentlich im Fettgewebe exprimiert wird und dieses nur geringfügig (10% laut Schoonjans K *et al* [112]) an der Insulin vermittelten Glucose Clearance beteiligt ist. Die wesentliche Insulin vermittelte Glukosemetabolisierung findet jedoch in der Muskulatur statt, wo nur sehr wenig PPAR γ exprimiert wird (siehe Abb. 6. aus Elbrecht A *et al* [35]). Ferner könnten TZD, die nachgewiesen die Differenzierung von Adipozyten auslösen können, vermutlich einen Diabetes eher begünstigen als verhindern, da Adipositas NIDDM begünstigt. Dies ist allerdings nicht der Fall [siehe z.B. 14]. Die Differenzierung einer physiologischen Menge an Fettgewebe ist mit einer verbesserten Insulinsensitivität assoziiert, da im Rahmen der Adipozytendifferenzierung Rezeptoren der Glukosehomöostase wie z.B. der Insulinrezeptor, die Insulin Rezeptor Substrate IRS-1 und IRS-2 und die Glukose Transporter GLUT1, GLUT2 und GLUT4 exprimiert werden [26 64 69 99]. Ab einer kritischen Masse an Fett kommt es durch TNF α und MAP-Kinase vermehrt zur Interferenz mit der Signaltransduktion des Insulins und es kann sich eine Insulinresistenz entwickeln [56 80]. Mit TZD kann man dieser pathologischen Entwicklung entgegenwirken. Voraussetzung für die Expression von GLUT und IRS ist die Expression von C/EBP α [36 43 140]. In der Tat fehlt in Zellen ohne C/EBP α der Insulin vermittelte Glukose "uptake" total, und Menschen mit lipatrophischen Erkrankungen (u.a. durch CEB/P Mangel verursacht) können extrem resistent gegenüber Insulin sein.

Ein von PPAR γ kontrollierter Baustein, der am Signalweg des Insulins distal des Rezeptors Anteil nimmt, ist das c-Cbl-assoziierte Protein (CAP). CAP wird nur in Insulinsensitiven Zellen exprimiert und ist auf der intrazellulären Seite mit dem Insulinrezeptor vergesellschaftet. Insulin-Stimulation führt zur Dissoziation des CAP vom Insulinrezeptor [104]. CAP potenziert die Insulin induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von c-Cbl und trägt so erheblich zur Membraneinschmelzung von GLUT4 bei. PPAR γ erhöht die Transkription von CAP nach TZD Gabe insbesondere im Fettgewebe [103]. CAP könnte somit zur TZD vermittelten Insulinsensitivität beitragen [103 104].

Eine weitere Vorstellung war die mögliche Sezernierung von Botenstoffen, die im Fettgewebe produziert und ausgeschüttet die Insulinsensitivität der Muskulatur beeinflussen. Shimomura S *et al* [116] haben bereits mögliche Kandidaten, sogenannte Adipozytokine, identifiziert. Ein prominenter Vertreter dieser Gruppe ist der TNF α , dessen gesteigerte Ausschüttung aus dem Fettgewebe (bei Adipositas) die systemische Insulinsensitivität durch Interferenz der Signaltransduktion vermindert [56], und zwar durch Inhibition der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase [80]. Die Expression von PPAR γ mRNA wird Zeit und Dosis abhängig durch TNF α herabgesetzt [145]. TNF α aktiviert ferner die MAP-Kinase, die PPAR γ 2 inhibitorisch phosphoryliert [1 57 102 146]. Bei Applikation von TZD wird die Expression von TNF α via PPAR γ reduziert, wodurch die verbesserte Insulinsensitivität bei Applikation von TZD mitbegründet sein könnte [55].

Interleukin-6 (IL-6) scheint vermutlich auf ähnlichem Wege Insulinresistenz zu verursachen [108]. Kürzlich wurde ein weiteres von Adipozyten endokrin sezerniertes Hormon namens Resistin entdeckt, welches den gleichen Effekt hat. Mit Resistin-Antikörpern konnte Insulinresistenz gemindert und die Aufnahme von Glukose nach intrazellulär bei adipösen Probanden normalisiert werden [108 123].

Das Adipozytokinin Adiponectin ist bei verminderten Spiegeln beim Menschen mit Insulinresistenz korreliert und Applikation von Adiponectin in einem Mausmodell führte zu verbesserter Insulinsensitivität [99].

Ein weiteres Adipozytokinin, Leptin, könnte laut Cohen B *et al* [23] in die Signaltransduktion eingreifen. Als Wirkort von Leptin wurden bisher die *nuclei arcuatus et paraventricularis* im Hypothalamus angenommen, wo Leptin über selektive Leptinrezeptoren durch Suppression von Neuropeptid Y den "food intake" reduziert und über einen erhöhten Sympathikotonus die Thermogenese steigert. Auch der Blut-Glukose-Spiegel scheint durch Leptin gesenkt zu werden [61 132]. Neuerdings sind auch Leptinrezeptoren im Hippocampus bekannt, die Rückschlüsse auf psychologische und erlernte Faktoren bei der Ausprägung der Nahrungsaufnahme zulassen, sowie weitere Substanzen, die ebenfalls das Sättigungsverhalten modulieren, wie Serotonin, Cholezystokinin und GnRH [Prof. Lehninger]. Ansonsten wird der Appetit wesentlich durch den Hypothalamus reguliert. Eine experimentelle Läsion des Nucleus ventralis posteromedialis ruft unersättlichen Appetit, eine Läsion der lateralen hypothalamischen Kerne Appetitlosigkeit hervor [71].

Die verringerte Produktion von Leptin in Adipozyten nach Applikation von TZD könnte im Falle einer Signaltransduktionshemmung der Insulin-Kaskade durch Leptin zur verbesserten Glukose-Aufnahme sowie einem erhöhten "food intake" führen. Es sind allerdings widersprüchliche Berichte über die Interferenz von Leptin mit der Signaltransduktion des Insulins bekannt, und zwar sowohl als positive sowie negative Regulation.

Die Expression von Leptin ist wiederum durch C/EBP α und ADD1/SREBP1 über binding sites im Leptin-Promotor induziert [65]. Leptin forciert die Expression von PPAR γ um 70-80% [100], während PPAR γ die Expression von Leptin drosselt [85 112]. Dies wird von Schoonjans K *et al* [112] als wesentlicher Wirkungsmechanismus von PPAR γ bezeichnet, denn somit würde PPAR γ nicht nur die Differenzierung von Fettgewebe mit der damit gekoppelten besseren Insulinsensitivität induzieren, sondern auch die verringerte Ausschüttung von Leptin gefolgt von einer erhöhten Aktivität von Neuropeptid Y und einem höheren "food intake".

Über andere Adipozytokine wie Adipsin, Angiotensinogen, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor und adiponectin Q und ihre Wirkungsweisen in diesem Zusammenhang ist weiter noch nichts wesentliches bekannt [114].

Weitere wichtige Mediatoren der Insulinsensitivität stellen Fettsäuren dar. Beobachtungen von Randle PJ *et al* haben gezeigt, daß erhöhte FS-Spiegel im Blut den Glukose-Metabolismus in der Muskulatur senken können [101]. TZD steigern die LPL und FS-Transportproteine, die FS nach intrazellulär befördern und den peripheren Spiegel senken. Der gesteigerten FS-Clearance folgt, vermittelt durch eine gesteigerte Insulinsensitivität der Muskulatur, ein erhöhter Glukose Metabolismus in der Muskulatur. Spiegelmann BM [118] zitiert diesen Vorgang als Randle-Effekt.

Alle bisher beschriebenen Mechanismen müssen in ihrer Gesamtheit gesehen werden. Gemeinsam mit bisher unbekanntem Funktionsweisen der TZD ist der Einfluß dieser PPAR γ aktivierenden Substanzgruppe auf die Insulinsensitivität der Zellen zu verstehen. Die genannten Mechanismen setzen ein funktionsfähiges PPAR γ Protein voraus. Polymorphismen könnten diese Funktionsfähigkeit stören oder herabsetzen.

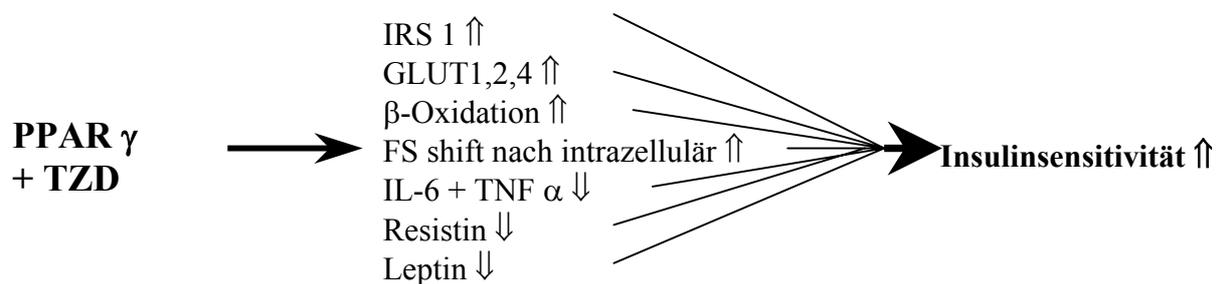


Abb. 8. Die einzelnen Effekte der TZD müssen summiert werden um die Auswirkung der TZD auf die Insulinsensitivität zu erklären. Der FS-shift nach intrazellulär bewirkt eine erhöhte Insulinsensitivität gemäß dem Randle Effekt [101].

1.2.5. Polymorphismen im PPAR γ Gen

Die vollständige Funktion des PPAR γ Proteins in allen seinen Aufgaben setzen unter physiologischen Bedingungen ein vollständig funktionsfähiges PPAR γ Gen voraus. Nach der Ein-Gen-ein-Protein Hypothese sind bei einem Polymorphismus innerhalb eines Gens nur Effekte im kodierten Protein zu erwarten. Solche Effekte treten besonders bei Polymorphismen auf, die zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz und somit der Proteinkonfiguration führen, also Deletionen, Translokationen und Insertionen. Bei Punktmutationen (Einzel-Nukleotid-Polymorphismen), v.a. "silent mutations", sind wegen des fehlenden Aminosäureaustauschs solche Konsequenzen nicht direkt zu erwarten.

1997 wurden durch Yen C-J *et al* [144] zwei Polymorphismen im PPAR γ identifiziert. Bei einem dieser Polymorphismen handelt es sich um eine "silent mutation" im codon 477, Nukleotid 1431, in der CAC zu CAT substituiert wurde und somit keinen Aminosäure Austausch hervorgerufen wird, da beide Codons die Aminosäure Histidin kodieren (i.F. C1431T genannt). Dieser Polymorphismus wird im Englischen Sprachgebrauch auch H449H oder C161T benannt, hier gab es noch keine Einigung hinsichtlich der Benennung. Es wurde jedoch in allen Untersuchungen der gleiche Primer innerhalb Exon 6 verwendet, allerdings mit unterschiedlichen Referenzen bzgl. der Codon und Nukleotid Nummerierung in der Wildtyp Sequenz. Die Benennung C1431T bezieht sich auf die Nummerierung der Nukleotidsequenz von Elbrecht A *et al* [35].

Ein weiterer mit einem Aminosäure Austausch einhergehender Polymorphismus im codon 12 (Exon B), Nukleotid 39, CCG zu GCG, führt zu einer Substitution von Prolin zu Alanin, genannt Pro12Ala.

Der C1431T Polymorphismus ist wegen seiner Lage im Exon 6 in allen drei γ Isoformen enthalten, während der Pro12Ala Polymorphismus exklusiv in der N-terminalen Domäne von PPAR γ 2 lokalisiert ist.

1. Einleitung

Es sind noch weitere Polymorphismen in PPAR γ bekannt, wie z.B. der von Ristow M *et al* beschriebene und sehr seltene und vermutlich nicht an der Entstehung einer Adipositas beteiligte Pro115Gln Polymorphismus [34 39 40 106]. Dieser Polymorphismus beeinflusst die Phosphorylierung von PPAR γ am Serin 114 durch die MAP Kinase [57 99].

Freake HC [47] hat einen Polymorphismus in PPAR γ beschrieben, der mit extremer Fettsucht vergesellschaftet ist. PPAR γ kann in diesem sehr seltenen Fall nicht inaktiviert werden.

Barroso I *et al* [4] beschrieben die P467C (CCG - CTG) und V290M (GTG - ATG) Polymorphismen bei Patienten mit schwerster Insulinresistenz.

Hegele RA *et al* [53] berichten vom F388L (T1164A) Polymorphismus im Exon 5, der mit familiärer Lipodystrophie einhergeht.

Da es sich bei dem C1431T Polymorphismus um einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus handelt, der im kodierten Protein keinen Aminosäure Austausch verursacht, da beide Kodons CAC und CAT für die Aminosäure Histidin kodieren, ist eine Konsequenz des C1431T Polymorphismus hinsichtlich der Funktion des PPAR γ Proteins unsicher. Es gibt jedoch verschiedene Vorstellungen, wie auch eine Punktmutation ohne Aminosäureaustausch Auswirkung auf die Funktion des kodierten Proteins haben kann.

Eine veränderte Basensequenz könnte sich in einem veränderten Methylierungsmuster der DNA niederschlagen mit eventueller Folge auf Transkription und Translation.

Die Faltung der DNA zusammen mit den Histonen im Zellkern könnte verändert oder eine Anlagerung der Polymerase an den Promotor erschwert sein.

Verringerte Translation der variierten mRNA und somit im Endeffekt verringerte Expression könnte zu einer Art Haplotypen-Insuffizienz führen, weil nur ein Haplotyp funktionsfähig ist. Ein verändertes "splicing" der Introns (soll auch abhängig vom Methylierungsmuster sein) könnte ebenfalls die Folge einer "silent mutation" sein, oder schlichtweg eine größere Instabilität des Proteins, gefolgt von einer zeitlich bedingten geringeren Aktivität [8 148].

Bei der Translation kann es, wie für Prokaryonten im Gegensatz zu Eukaryonten bereits beschrieben, bei unterschiedlichen Triplets, die für eine Aminosäure und deren t-RNA kodieren, zu Präferenz des Wildtyp Triplets kommen, während der variierte Triplet wegen geringerer Affinität weniger favorisiert wird. Auch eine verringerte Transkriptionsrate ist denkbar [8 117].

Eine verbesserte Funktionalität infolge eines jeden Einzel-Nukleotid-Polymorphismus ist generell nicht auszuschließen. Ein evolutionsbiologischer Sinn der genetischen Variation ließe sich darin erkennen. Der für die Sichelzellanämie verantwortliche Einzel-Nukleotid-Polymorphismus im Hämoglobin z.B. bedeutet einen Selektionsvorteil gegenüber der durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufenen Malaria tropica und ist deswegen in Africa weit verbreitet. Für den häufiger untersuchten Pro12Ala Polymorphismus in PPAR γ 2 (hierbei allerdings auch Aminosäureaustausch) sind auch Veröffentlichungen erschienen, die den Polymorphismus mit einer verbesserten Insulinsensitivität assoziieren [2 29 68 87].

Der Pro12Ala Polymorphismus wurde infolge des Aminosäure Austausches als möglicher Determinationsfaktor von metabolischen Krankheiten wie NIDDM angesehen, da die Protein Konformation und die Funktion verändert sein könnte, zumal die N-terminale Domäne von PPAR γ 2 mit zusätzlichen 28 Aminosäuren anscheinend 5-6 mal effektiver ist als PPAR γ 1. Das N-terminus ist Liganden unabhängig durch Phosphorylierung aktivierbar [133 138]. Der Polymorphismus Pro12Ala befindet sich gerade in dieser hochfunktionellen Region. Das PPAR γ Ala Allel zeigte geringere Bindungs Affinität zu Promotoren und verminderte Aktivierung der verantwortlichen Elemente von z.B. LPL und ACO bei Anwesenheit eines TZD [29].

Für Pro12Ala wurden die Allelfrequenzen in mehreren Populationen gescreent, wobei in verschiedensten Populationen die Präsenz des Polymorphismus mit unterschiedlichen

1. Einleitung

Allelfrequenzen nachgewiesen werden konnte, von 0.12 in Kaukasischen Amerikanern bis 0.01 in Chinesen [144]. Die Allelfrequenzen schwanken also innerhalb unterschiedlicher ethnischer Gruppen erheblich. Mit Hilfe dieser Assoziationsstudien wurde versucht ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und BMI, Dyslipoproteinämie, Adipositas und NIDDM aufzuzeigen, wobei die unterschiedlichen Ergebnisse kontrovers diskutiert werden.

Beamer BA *et al* [7] und Li W-D *et al* [78] assoziierten das Ala Allel mit einem erhöhten BMI.

Mori Y *et al* [88], Ringel J *et al* [105], Swarbrick MM *et al* [126] und Mancini FP *et al* [82] können den Pro12Ala Polymorphismus in ihren jeweiligen Probandengruppen nicht mit erhöhtem BMI oder Diabetes in Zusammenhang bringen.

Deeb SS *et al* [29], Altshuler D *et al* [2] und Koch M *et al* [68] können in ihren Kollektiven den Polymorphismus mit einer verbesserten Insulinsensitivität oder einem geringeren NIDDM Risiko assoziieren. Mori H *et al* [87] können in einem sehr großen japanischen Kollektiv ebenfalls ein geringeres NIDDM Risiko für Ala12 assoziieren, meinen aber eine Tendenz zu schwereren Verläufen der Erkrankung in NIDDM Patienten mit Ala12 Genotyp zu sehen.

Ek J *et al* [34] und Evans D *et al* [39 40] konnten keine Beziehung zwischen dem Polymorphismus und Adipositas in einem dänischen und einem deutschen Kollektiv aufzeigen.

Der C1431T Polymorphismus ist wegen eines fehlenden Aminosäure Austauschs noch nicht häufig untersucht worden. Meirhaeghe A *et al* [85] screenen diesen Polymorphismus in 820 Franzosen mit einer T Allelfrequenz von 0,14. Eine signifikante Assoziation mit BMI oder Plasma-Leptin-Spiegeln war nicht gegeben, wengleich das T Allel in Probanden mit hohem BMI mit erhöhten Leptin-Spiegeln einherging. Laut Considine RV *et al* [25] ist Leptin ein Marker für den prozentualen Anteil des Fettgewebes am Körpergewicht und somit haben die T-Allelträger laut Meirhaeghe A *et al* [85] in dieser Untersuchung einen niedrigeren BMI als vom Leptin-Spiegel her zu erwarten wäre.

Ogawa S *et al* [93] screenen den C1431T Polymorphismus in 404 Frauen in der Postmenopause und erhielten eine Allelfrequenz von 0,851 versus 0,149. Eine Assoziation des Polymorphismus mit der Knochendichte wird berichtet und ein möglicher Zusammenhang mit Osteoporose bei älteren Frauen vorgeschlagen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen das PPAR γ TNF α antagonisiert. TNF α gehört zur Gruppe der Osteoklasten aktivierenden Faktoren. PPAR γ scheint laut Mbalaviele G *et al* die Osteoklastogenese zu hemmen, und TZD sollen sogar antiosteoporotische Effekte haben [84 94].

Wang XL *et al* [136] screenen C1431T in 647 australischen Kaukasiern mit KHK mit einer T Allelfrequenz von 0,163. Eine Assoziation mit BMI wird nicht berichtet, hingegen zeigen die T-Allelträger (CT- + TT-Genotyp) ein signifikant erniedrigtes Risiko gegenüber den homozygoten C Allelträgern an KHK zu leiden. Diese Beobachtung ist bei Heterozygoten Genotypen besonders stark ausgeprägt. Eine Rolle von PPAR γ in der Atherogenese über einen direkten Gefäßwand-Prozeß wird vorgeschlagen, da der signifikante Zusammenhang mit KHK unabhängig von Diabetes, Rauchen, BMI und Lipid-Profil gesehen wird.

Evans D *et al* [38] haben die C1431T und Pro12Ala Polymorphismen gemeinsam auf eine mögliche Prädisposition des NIDDM untersucht. In dieser Untersuchung wird der Haplotyp Ala12/C1431 mit NIDDM assoziiert (nicht signifikant wegen geringer Fallzahlen). Ein in unmittelbarer Umgebung von Ala12/C1431 gelegener, noch nicht beschriebener Polymorphismus wird in Erwägung gezogen.

Zhou X-P *et al* [148] zeigen eine Überrepräsentanz des Polymorphismus bei Amerikanern mit Glioblastoma multiforme.

Smith WM *et al* [117] assoziieren den Polymorphismus mit dem Endometrium Karzinom.

Eine "silent mutation" kann schwerwiegende Komplikationen in der Interpretation der genetischen Epidemiologie auslösen. Wegen bereits weiter oben angeführten Gründen bzgl. der Schwierigkeit, einer genetischen Variation ihren Stellenwert für die Entstehung polygener Erkrankungen zuzusprechen, muß bei "silent mutations" ganz besonders darauf hingewiesen werden, daß zwischen Assoziaton und Kopplung unterschieden werden muß. Die Variation kann ätiologisch unbedeutend sein, aber in der Nähe eines funktionell bedeutenden Polymorphismus liegen, was natürlich auch für andere Polymorphismen gilt. Sie wäre dann eine Art Sonde oder Marker für den eigentlich bisher unbekanntem Polymorphismus. Die Distanz zwischen dem Krankheitsgen und der beobachteten "Sonde" entscheidet dann über die Signifikanz des Auftretens des Polymorphismus in der Erkrankung, der eventuell pathoätiologisch nichts mit der beobachteten Erkrankung zu tun hat. Je weiter sich die "Sonde" von dem eigentlichen Krankheitsgen entfernt, desto höher ist die Chance einer Entkopplung der beiden durch "cross-over" in der Gamete. Diese Problematik wurde von Ziegler A diskutiert [149]. Meirhaeghe A *et al* bezeichneten C1431T als eine solche "Sonde", die mit einer bisher nicht entdeckten funktionellen Mutation im PPAR γ Gen selbst oder einem anderen nahe gelegenen Locus auf dem Chromosom 3 gelinkt sein könnte [85]. Diese Hypothese wird durch die Haplotypen-Block-Theorie gestützt [48].

Ferner sind Einzel-Nukleotid-Polymorphismen alles andere als selten, sie stellen mit ca. 90 % den häufigsten Anteil genetischer Variationen im Menschen dar [24]. Bislang sind alleine durch das Humane Genom Projekt ungefähr 2,1 Millionen meist phänotypisch unbedeutende Einzel-Nukleotid-Polymorphismen identifiziert worden, was bei einer beim Menschen angenommenen Mutationsrate von einer pro 50 Millionen Basen pro Generation nicht verwundert (bei ca. 3,2 Mrd. Basen pro Individuum bedeutet das statistisch 64 Einzel-Nukleotid-Polymorphismen pro Generation). Geschätzt soll es etwa 11 Millionen solcher Polymorphismen geben, wobei diejenigen interessant sind und vermutlich eine Rolle hinsichtlich verschiedener Erkrankungen spielen, welche eine Allelfrequenz von über 1 % aufweisen. Allelfrequenzen unter 1 % sprechen für erhöhten Selektionsdruck [22].

1.3. Problemstellung

In einem polygenen Vererbungsmuster können Effekte, die durch genetische Variation entstanden sind, sehr schwer nachvollziehbar sein, da die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Genen und Proteinen vielfältig sind. Defizite der Funktion eines Gens können eventuell über andere Stoffwechselwege oder verstärkte Expression eines anderen am gleichen Vorgang beschäftigten Proteins ausgeglichen werden. Daher werden Assoziationsstudien in solchen Fällen angewandt, um eventuelle Einflüsse auf einen Phänotyp abzuschätzen. Um Einflüsse des C1431T Polymorphismus in PPAR γ auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel zu erfassen, soll dazu ein Kollektiv auf den C1431T Polymorphismus untersucht und nach statistischer Auswertung ein eventueller Zusammenhang gezeigt werden. Der Pro12Ala Polymorphismus, der wegen des Aminosäureaustausches bereits von verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Ergebnissen im Zusammenhang mit Insulinresistenz und Adipositas betrachtet wurde, könnte bei synchronem Auftreten mit dem C1431T Polymorphismus eindeutigerere Effekte haben. Der Haplotyp Ala/T oder Ala/C stellt eventuell eine genetische Determination des metabolischen Syndroms und Insulinresistenz dar. Deswegen wird eine kleine Gruppe auf beide Polymorphismen untersucht. So kann eine Kopplung der Polymorphismen erkannt werden.

1. Einleitung

1.4. Ziel der Arbeit

Im Verlaufe dieser Arbeit sollen 366 Probanden auf den C1431T Polymorphismus mittels PCR-SSCP und 157 Probanden auf den Pro12Ala Polymorphismus mittels PCR-RFLP untersucht werden.

Die SSCP Analyse des C1431T Polymorphismus im Exon 6 stellt gleichzeitig ein Screening nach neuen Polymorphismen im Exon 6 aller drei Isoformen von PPAR γ dar, die dann gegebenenfalls sequenziert werden sollen.

Die Befunde sollen einer statistischen Analyse im Sinne einer Assoziationsstudie unterzogen werden, um einen Zusammenhang zwischen dem C1431T Polymorphismus und biologischen Parametern aufzuzeigen. Der Schwerpunkt des Interesses liegt auf Parametern des Lipid- und Glukosestoffwechsels. Dafür werden die unterschiedlichen Genotypen mit NIDDM, Glukose, TC, TG, HDL, LDL, BMI, dem Alter, Gewicht und Geschlecht der Probanden ins Verhältnis gesetzt, um eventuelle Einflüsse des Polymorphismus aufzuzeigen. Alle diese Informationen werden aus den Akten der Patienten entnommen.

Es soll ferner hinsichtlich des Pro12Ala Polymorphismus gezeigt werden, ob spezielle Haplotypen Konstellationen wie z.B. Ala/T oder Ala/C häufiger bei NIDDM vorkommen und ob das synchrone Auftreten beider Polymorphismen im Sinne einer Kopplung zum Syndrom X prädisponiert.

2. Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die 674 Patienten kamen aus unterschiedlichen Kollektiven. 248 Adipositas per magna Patienten (BMI > 40 kg/m²) stammen aus dem Evangelischen Krankenhaus Dinslaken. Nach Ausschluß von IDDM und "missing data" werden 224 Patienten aus dieser Gruppe in die Untersuchung einbezogen. 131 Diabetes Patienten wurden in der Diabetiker-Schulung des Universitätskrankenhauses in Hamburg Eppendorf (UKE) rekrutiert. Alle diese Probanden haben NIDDM. 85 werden nach Ausschluß von "missing data" in die Analyse einbezogen. 208 Patienten stammen aus der Lipidambulanz des UKE. Diese Probanden wurden nach Ausschluß von "missing data" in zwei Gruppen unterteilt, einer Kohorte aus 84 Probanden mit Hypertriglyceridämie (TG > 180 mg/dl, 26 % NIDDM) und einer Kohorte aus 89 Probanden mit Hypercholesterinämie (TC > 200 mg/dl, 2 % NIDDM).

Es wurden die Lipidwerte TC, TG, LDL, HDL sowie allgemeine Daten wie BMI, Geschlecht, Alter und ferner Erkrankungen, die die Diagnose Diabetes oder Dyslipidämie beeinflussen, aufgenommen. Glukose-Werte liegen nur bei der Diabetiker Gruppe vor. Patienten mit IDDM, pankreoprivem Diabetes oder Steroid-Diabetes wurden aus der Statistik ausgeschlossen.

Die 71 Probanden der Kontrollgruppe wurden aus dem allgemeinen Blutspenderkollektiv des UKE rekrutiert und zeigen ein als Normbereich definiertes Spektrum an Lipidwerten und BMI sowie keinen NIDDM (siehe Tabelle).

Alle Probanden waren über das Ziel der Untersuchung und mit den damit verbundenen Risiken aufgeklärt worden (bei jedem Probanden wurde eine Blutprobe per venöser Punktion entnommen) und das Einverständnis schriftlich niedergelegt.

2.2. DNA-Gewinnung

Die DNA wird nach Standardmethode von Miller SA *et al* [86] aus Blut gewonnen. Das Blut wird bei 2500 rpm, 4°C 10 min zentrifugiert. Die Interphase zwischen Erythrozyten und Serum wird großzügig abpipettiert. In dieser Interphase sind die DNA-haltigen Blutzellen, der sogenannte "Buffycoat". Dieser wird bis zur Isolierung bei -20°C gelagert, wodurch sämtliche Erythrozyten hämolysiert werden.

Der Buffycoat und STE-Puffer werden mehrfach bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert, 2-3 mal 15 min, wobei jedesmal der Überstand abgegossen und neuer STE-Puffer auf das Pellet gegeben wird. Somit werden Lymphozyten gewonnen, die im Pellet zurückbleiben.

Diese werden mit 3 ml Lyse-Puffer, 1 ml Proteinkinase K und 200 µl SDS 10% bei 37°C über Nacht inkubiert.

Nach weitere Zugabe von 3,4 ml Lyse-Puffer und 2,3 ml NaCl 6M fällt jegliches Protein während 20 min Zentrifugation bei 4°C, 3000 rpm aus. Die genomische DNA befindet sich im klaren Überstand und dieser wird in 100%-igen Ethanol pipettiert, wobei die DNA ausfällt. Die gefällten DNA-Knäuel werden mit sterilen Pasteur-Pipetten aus dem Alkohol gefischt und in 70%-igem Ethanol gewaschen.

Die DNA-Knäuel werden in 500 µl TE-Puffer gegeben und bei 37°C 48 Stunden auf einem Schütteltisch gelöst. Die weitere Lagerung der DNA haltigen Tubes erfolgt bei 4° C im Kühlraum.

2.3. Theoretische Versuchsgrundlagen und experimentelle Durchführung der Versuche

2.3.1. PCR, RFLP, SSCP, Färbemethoden

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung spezieller DNA- oder RNA-Sequenzen in vitro.

Die Spezifität der PCR basiert auf dem Einsatz von zwei Oligonukleotiden (Primer), die zu den Enden der zu amplifizierenden Sequenz auf der Ursprungs-DNA komplementär sind.

Durch Erhitzen (meistens bei 91°C) wird die zu amplifizierende DNA in Einzelstränge aufgetrennt und die Primer binden gemäß ihrer komplementären Struktur an den 5' und den 3' Strang. Bei geringerer Temperatur (60-70°C, optimale Temperatur wird empirisch bestimmt) werden die Stränge am jeweiligen Primer beginnend durch eine Hitze-stabile DNA-Polymerase amplifiziert. Der Vermehrungszyklus kann beliebig oft wiederholt werden, sofern ausreichend dNTP, Primer und das richtige Medium für die Reaktion vorhanden sind (auch die Konzentrationen von dNTP, Primern und der Pufferlösung sind optimal empirisch zu bestimmen).

Da in jedem Zyklus beide Stränge als Matrize genutzt werden, nimmt die Zahl der DNA Moleküle exponentiell zu, bei 30 Zyklen um den Faktor 10^9 [15].

Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Polymorphismus während der PCR von der Taq Polymerase überlesen wird, ist extrem klein (Die Fehlerrate der Taq Polymerase liegt bei einer Base auf 20000 Basen). Die von uns amplifizierten Genabschnitte sind nur 200 bzw. 270 bp lang.

Um einen solchen Lesefehler später auf dem Gel zu erkennen, müßte ein Lesefehler in den ersten Zyklen stattfinden, damit der Lesefehler in ausreichender Menge amplifiziert und somit als Bande dargestellt wird.

Der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) basiert auf dem Einsatz sequenzspezifischer Endonukleasen, die an speziellen, meist pallindromischen Sequenzen DNA schneiden können.

Auf amplifizierte Genabschnitte kann ein Restriktionsenzym-Verdau angewendet werden und die von der Anzahl der Schnittstellen abhängige Anzahl der Bruchstücke kann später u.a. elektrophoretisch aufgetrennt werden (nach Anzahl und auch Motilität, wobei das Wanderungsverhalten wesentlich von Ladung und Masse der Bruchstücke und der Dichte des Gels abhängt). Dabei können im Gel Genbruchstücke ab einem Längenunterschied von ca. 10 Basen unterschieden werden.

Das verwendete Restriktionsenzym entscheidet über das zu verwendende Medium und eventuell benötigte Kofaktoren wie z.B. ATP oder Mg-Ionen.

Durch Polymorphismen in Sequenzen können Schnittstellen erzeugt oder zerstört werden, so daß solche Polymorphismen sich nach einem Restriktionsverdau vom Wildtyp im Laufverhalten in den meisten Fällen unterscheiden. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine RFLP mit dieser Methode unentdeckt bleibt, d.h. zwei unterschiedliche Genabschnitte identisches Laufverhalten aufweisen, ist sehr gering [15]. Voraussetzung ist natürlich, daß der Polymorphismus in der Schnittstelle des Verdauungsenzyms liegt. Eine andere Möglichkeit ist die von uns angewandte Methode, bei der bereits während der PCR ein sogenannter

mutagener Primer verwendet wird. Dieser Primer entspricht nicht 100%-ig der komplementären zu vervielfältigenden Basensequenz und fügt so eine Schnittstelle für das verwendete Restriktionsenzym ein, wenn der Polymorphismus vorliegt.

Der Restriktionsverdau zur Bestimmung des Pro12Ala Polymorphismus wurde nicht im optimalen Puffer des Restriktionsenzym BstU1 durchgeführt, sondern im PCR-Puffer.

Ausgleichend werden die Menge des eingesetzten Restriktionsenzym erhöht und die Inkubationszeit verlängert. Die Gele zeigen, daß der Restriktionsverdau einwandfrei funktionierte.

Der single stranded confirmation polymorphism (SSCP) ist eine von Orita M *et al* beschriebene Methode, bei der man sich die intramolekulare und hochspezifische Faltblattstruktur eines DNA-Einzelstranges zu Nutze macht [95 96]. Der SSCP ist eine ausgezeichnete, einfache und billige Methode, Polymorphismen in Genabschnitten nachzuweisen. Dazu wird der amplifizierte Genabschnitt zu Einzelsträngen denaturiert, worauf sich intramolekular ähnlich wie bei Proteinen eine Faltblattstruktur ausbildet, die hochspezifisch gemäß der Basensequenz ist. Unterschiedliche Faltblattstrukturen zeigen dann ein unterschiedliches Laufverhalten in der Elektrophorese mit einem 10 %-igen Polyacrylamidgel, daß zusätzlich mit 10 % Glycerol versehen ist, wobei hier die jeweilige Molekülstruktur bedeutsam ist [95 96]. Es wurde gezeigt, das bereits eine einzige veränderte Base ein unterschiedliches Laufverhalten hervorruft.

In Amplikons bis zu 450 bp werden 90 % und in Amplikons bis zu 300 bp nahezu 99 % aller Polymorphismen durch diese Methode nachgewiesen [95 96]. Die in dieser Arbeit untersuchten Genstücke sind 200 bzw. 270 bp lang.

Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei unterschiedliche räumliche Konformationen das gleiche Laufverhalten an den Tag legen, ist vernachlässigbar gering.

Die Faltblattstrukturen der einzelsträngigen denaturierten DNA haben genau wie Proteine die Möglichkeit, Komplexe mit Ionen zu bilden. Die Silberfärbung der SSCPs nach Bassam BJ *et al* [5] basiert auf dieser Grundlage, die Silberionen werden in der Gelmatrix von der Faltblattstruktur komplexgebunden. Durch Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber wird während eines photochemischen Entwicklungs- und Fixationsprozesses die DNA sichtbar gemacht.

Die Angaben von Bassam BJ *et al* [5] wurden in Bezug auf die Zeit und Temperatur Angaben hinsichtlich der Entwicklung und Imprägnation an die Labor spezifischen Bedingungen empirisch angepaßt.

Die Ethidiumbromidfärbung beruht auf der Fähigkeit des Detergenz 3,8,-Diamino-6-ethyl-5-phenanthridiumbromid (Ethidiumbromid) sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Die Banden lassen sich dann nach der Anfärbung des Gels mittels Transluminatation bei UV-Licht sichtbar machen und photographieren.

2.3.2. PCR-RFLP von Pro12Ala.

Für die PCR-RFLP des Pro12Ala Polymorphismus in PPAR γ 2 wird der Vorwärts-Primer 5'GCC AAT TCA AGC CCA GTC-3' und der mutagene Rückwärts-Primer 5'GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG TCG CTT TCC G-3' verwendet, der eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstU 1 einführt, wenn die bekannte C/G Substitution im 39. Nukleotid im Exon B vorhanden ist [144]. Der Primer induziert so eine Schnittstelle und ermöglicht die Identifikation des Polymorphismus mittels Gelelektrophorese.

Tabelle 2: Pro12Ala PCR-Pipettierschema

	1* in μ l	20* in μ l	Endkonzentration
H2O	14,9	298	
Puffer 10*	2,0	40	1*
dNTP	0,4	8	0,2 mmol
5' Primer	0,8	16	8 pmol
3' Primer	0,8	16	8 pmol
Taq-Polymerase	0,06	1,2	0,3 Units

Gemäß dem Pipettierschema wurde immer die 20-fache Menge als Mastermix für 19 Proben sowie eine Kontrollprobe angesetzt.

Nach Einbringen von 19 μ l des Mastermixes in eine Eppendorf-Küvette und Zugabe von 1 μ l genomischer DNA eines Individuums wird das Gemisch mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, um Kondensation und Temperaturverzug zu vermeiden.

Die PCR-Maschine durchläuft 34 Zyklen bei einer Denaturierungstemperatur von 95° C, Annealing temperature 55° C und Elongation bei 72° C.

BstU 1 von *Bacillus steatophilus* ist ein Restriktionsenzym welches die Sequenz CG|CG schneidet. Es werden 2 μ l einer 1:5 Verdünnung von BstU 1 direkt in das PCR-Produkt unterhalb des Mineralöls gegeben. Der Restriktionsverdau wird bei 50°C über Nacht im Brutschrank durchgeführt.

Das verdaute Restriktionsprodukt wird mit Loading Puffer versehen und elektrophoretisch bei 30 mA 30 min auf einem 10% Polyacrylamid-Gel bei Raumtemperatur aufgetrennt. Anschließend wird das Gel 5 min in Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenanthridiumbromid) gefärbt. Dieses Detergenz interkaliert sequenzunspezifisch in DNA. Die Banden werden darauf mittels Transluminatation bei UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Die erwarteten Bruchstücke nach dem Verdau mit BstU 1 sind 270 bp für homozygote Wildtype, 227bp und 43bp bei Pro12Ala Homozygoten und 270bp, 227bp und 43bp bei Heterozygoten.

2.3.3. PCR-SSCP von C1431T.

Für die PCR-SSCP des C1431T Polymorphismus, bei dem es sich um eine silent-mutation im codon 477 von PPAR γ 1 und γ 2 handelt, genauer C/T Substitution im Nukleotid 1431 (Exon 6), wird der Vorwärts-Primer 5'-AGT TCC AGC TGA AGC TGA AC-'3 und der Rückwärts-Primer 5'-AAA TGT TGG CAG TGG CTC AGG-3' verwendet. Das amplifizierte Exon 6 umfaßt 200 bp.

Tabelle 3: C1431T PCR-Pipettierschema

	1* in μ l	20* in μ l	Endkonzentration
H ₂ O	14,1	282	
Puffer 10*	2,0	40	1*
MgCl ₂	0,8	16	2,5 mmol
dNTP	0,4	8	0,2 mmol
5'Primer	0,8	16	8 pmol
3'Primer	0,8	16	8 pmol
Taq-Polymerase	0,06	1,2	0,3 Units

Auch für diese PCR wird ein 20-facher Mastermix gemäß Pipettierschema angesetzt und nach Verteilung auf 20 Eppis 1 μ l genomische DNA jeweils eines Individuums auf 19 Eppis zugegeben, eine Leerprobe wird auch hier durchgeführt. Es wird mit Mineralöl überschichtet.

Die PCR-Maschine durchläuft 33 Zyklen bei einer Denaturierungstemperatur von 95° C, Annealing temperature 65° C und Elongation 72° C.

Die Proben werden nach der PCR 1:40 mit SSCP-Mix verdünnt und 5 min bei 95° C zu einzelstrangförmiger DNA denaturiert. Sofort werden die Proben auf Eis gestellt.

Es bilden sich hochspezifische Einzelstrang Konformationen infolge intramolekularer Basenpaarung aus. Diese Methode von Orita M *et al* [95 96] ist sehr sensibel. Eine einzige ausgetauschte Base genügt eine unterschiedliche Faltstruktur und somit unterschiedliches Laufverhalten auszuprägen.

Daraufhin werden 2,5 μ l der Proben auf ein 10%-iges Glycerol sowie 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und 2,5 h bei 15mA bei Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt.

Eine Silberfärbung nach Bassam BJ *et al* [5] (an die spezifischen Laborbedingungen empirisch angepaßt) wird durchgeführt. Die Gele werden nach 30 min Fixierung in 10%-iger Essigsäure dreimal 3 min in eiskaltem H₂O gewaschen. Daraufhin werden die Gele 30 min in einer Silbernitrat Lösung imprägniert, wobei die Ag-Ionen von den einzelsträngigen Nukleinsäure Konformationen Komplex-gebunden werden. Erneutes Waschen 10 min in eiskaltem H₂O, darauf in die Hälfte der Entwicklungslösung für 10 sec, abgießen und abgedunkelt 10 min in den Rest der Entwicklungslösung, wodurch die Ag-Ionen zu elementarem Silber reduziert werden.

Die Gele werden in ein 10%-iges Essigsäure Stoppbad gelegt und darauf zwei Tage in Gelfix gelagert. Anschließend werden die Gele getrocknet.

2.3.4. Sequenzierung

Die Grundlage der Sequenzierung ist die Didesoxy-Methode von Sanger, die nur durch technische Weiterentwicklung von z.B. hitzebeständigen DNA Polymerasen und der Kapillarelektrophorese abgewandelt wurde.

Die DNA wird in denaturierter Form einer Sequenzreaktion unterzogen. Die Sequenzreaktion entspricht wesentlich einer PCR zur Vervielfältigung des zu sequenzierenden Genabschnittes. Dabei werden jedoch nebst den normalen dNTPs auch dNTP-Dye Terminatoren zugegeben, die einen zufälligen Abbruch der Sequenzreaktion bewirken. Somit erhält man Abschriften des kopierten Abschnitts in allen Längen von 2 bp bis zur gesamten Länge des zu sequenzierenden Abschnitts, wobei die terminale Base der Dye Terminator Nukleotid ist. In dieser Untersuchung waren diese terminierenden Nukleotide mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, wobei hier auch andere Möglichkeiten wie z.B. radioaktiv markierte Substanzen zur Verfügung stehen.

Die während der Sequenzreaktion entstandenen unterschiedlich langen DNA-Ketten können darauf in einer hochauflösenden Polyacrylamidgelelektrophorese, in unserem Fall einer Kapillarelektrophorese, aufgetrennt werden. Die fluoreszierenden Terminatoren werden über eine Laserdiode gemäß ihrer Fluoreszenz identifiziert und durch die entsprechende Software die Sequenz berechnet. Diese Reaktion läuft vollautomatisch in einem Perkin Elmer Abi PrismTM 310 Genetic Analyzer mit der dazugehörigen Software ab.

Die Sequenzierung eines PCR Produktes ist nicht unbedingt die beste Ausgangssituation für ein sauberes Sequenzprodukt. Trotzdem sind im Falle des Exon 6 von PPAR γ die Sequenzen nach Aufreinigung des PCR Produktes mit QIAQuick sehr gut lesbar. Die Sequenzen weisen eine gute Signalstärke auf, und waren allesamt reproduzierbar.

Vor der Sequenzreaktion wird das PCR-Produkt mit Quingen (QIAQuick) gemäß Angaben des Herstellers aufgereinigt, um eine sauberere Sequenz zu erhalten (QIAQuick PCR Purification Kit 250). Dazu wird in einem Verhältnis von 5:1 Buffer BP zum PCR Produkt gegeben, ohne das Mineralöl vorher zu entfernen. Dieses Gemisch wird in eine QIAQuick Säule überführt, diese wurde vorher in einem 2 ml Sammelgefäß plaziert. Diese Säulen enthalten eine Silikongel-Membran, die selektiv DNA binden kann. Während die DNA an der Membran adsorbiert, können Rückstände und Unreinheiten mit speziellen Puffern ausgewaschen werden. Die Säule wird 60 sec zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen. Erneut wird mit 0,75 ml Buffer PE 60 sec zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen. 60 sec wird trocken zentrifugiert, danach kann die an die Silikongel-Membran adsorbierte DNA mit aqua dest unter Zentrifugation eluiert werden. Man erhält ca. 50 μ l aufgereinigtes PCR-Produkt. Eine DNA-Konzentrationsmessung wird nicht durchgeführt. Anschließend wird die Sequenzreaktion in 5' sowie 3' Richtung angesetzt.

Tabelle 4: Pipettierschema der Sequenzreaktion, alle Angaben in μ l

	TRR-Mix	PCR-Produkt	DMSO	Aqua dest
5'Primer 0,5 μ l	2,5	3,0	1,0	13,0
3'Primer 0,5 μ l	2,5	3,0	1,0	13,0

Die Sequenzreaktion läuft abgedunkelt bei 60° C ab. Anschließend werden die Produkte mit 2 μ l 3 M Natriumacetat und 50 μ l absolutem Alkohol 30 min abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Pellets erneut mit 70%-igem Ethanol 15 min

zentrifugiert. Nach der Ethanol-fällung werden die Überstände wiederum verworfen und die Pellets trocken bei 4°C gelagert. Vor der eigentlichen Sequenzierung werden die Pellets 20 min in 25 µl TSR gelöst. Nach kurzem Vortexen werden die gelösten Produkte in Genetic Analyzer sample tubes überführt und 2 min auf 96° C erhitzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Die Proben werden darauf in den Perkin Elmer Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer plaziert und das Programm gestartet.

2.4. Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen wurde die Statistica software (Statsoft, 1997) verwendet.

Eine statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ im Mann-Whitney U-Test bzw. im χ^2 angenommen. Da alle Analysen unter Ausschluß von "missing data" durchgeführt wurden, ist bei allen Ergebnissen das n angegeben, wenn Daten fehlten.

Die Verwendung von Assoziationsstudien ist nicht unproblematisch. Da man meist nur einen Polymorphismus in einem Kandidatengen untersucht, gehen Effekte anderer eventuell bisher unbekannter Polymorphismen, die sich in unmittelbarer Nähe des untersuchten Polymorphismus befinden, verloren. Insbesondere in einer Erkrankung, die als multifaktoriell und polygen bezeichnet wird, ist die Konzentration auf einen Polymorphismus vielleicht sehr trügerisch und so manche Wechselwirkungen mit anderen Polymorphismen müssen unbemerkt bleiben. Auch die Charakteristik des Kollektivs muß berücksichtigt werden.

Seltene Genotypen wie z.B. der in dieser Arbeit beobachtete Ala/C Haplotyp liegen in sehr geringen Fallzahlen vor. Die Qualität der Statistik ist jedoch stark von der Anzahl der Probanden abhängig. Im Ergebnisteil wird mehrfach von stark unterschiedlichen T Allelfrequenzen in kleineren Untergruppen berichtet, die vermutlich durch unglückliche, zufällige Allelverteilung bei kleinen Fallzahlen zu begründen sind.

2. Methoden

2.5. Verwendete Chemikalien, Mischungen und Geräte

DNTP 10 mM	Boehringer-Mannheim
Primer	Applied Biosystem
Taq-DANN-Polymerase	Boehringer-Mannheim
Reaktionspuffer	Boehringer-Mannheim
Magnesiumchlorid 25mM	Boehringer-Mannheim
Mineralöl	Sigma
Urea	Merck
Restriktionsenzym BstU1	Boehringer-Mannheim
Acrylamid/Bisacrylamid	Appligene
Tris-Borat	TBE Merck
Ammoniumpersulfat	Serva
Tetraethylmethylendiamid	TEMED Serva
Glycerol	Merck
EDTA	Sigma
Bromphenolblau	Merck
1 kb ladder 1 µl/µg	Gibco
Ethidiumbromid	Merck
Silbernitrat 10%	Roth
Formaldehyd 37%	Merck
Natriumthiosulfat	Sigma
Natriumkarbonat 10%	Merck
Essigsäure	Merck
Methanol	Merck
DNA-Sequencing Kit	Perkin Elmer
DYE Terminatoren	Perkin Elmer
PCR Purification Kit 250	Qiagen
DMSO	Serva
TRR DNA Sequencing Kit	Abi Prism PE Applied Biosystems
Natriumacetat 3M	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Natriumchlorid 6M, 5M	Merck
Proteinkinase K	Boehringer Mannheim
SDS	Merck
BP-Buffer	Qiagen
PE-Buffer	Qiagen
Tris HCl 1M pH=7,4	Gibco

2. Methoden

Laufpuffer	Tris-Borat 0,09 M + EDTA 0.002 M
Loadingpuffer	Tris-Borat + 40% Glycerol + Bromphenol-Blau
SSCP-Mix	Urea 55,5%, aqua dest 33,3%, 11,2% TBE, Bromphenolblau
Gele	40% Acrylamid/Bisacrylamid, 10% Ammoniumpersulfat, 0,4% TEMED, 10* TBE (SSCP Gele auch 10% Glycerol)
Silbernitratlösung	2 ml Silbernitrat, 150 µl Formaldehyd auf 200ml aqua dest
Entwicklungslösung	300 µl Formaldehyd, 60 µl Natriumthio- sulfat, 30 ml Natriumkarbonat auf 180 ml eiskaltes aqua dest
Stoppbad	10%-ige Essigsäure
Sequenzreaktion	TRR, DMSO, Primer, gereinigtes PCR Produkt
Salzfällung	3M Natriumacetat
Ethanol-fällung	Absoluter Ethanol verdünnt auf 70%
STE Waschpuffer	20 ml Tris-HCl, 1 ml NaCl 5M, 200 µl EDTA 0,5M auf 1 l aqua dest, filtriert und autoklaviert
Lyse Puffer	10 ml Tris HCl, 8 ml NaCl 5M, 400 µl EDTA 0,5M auf 100 ml aqua dest, filtriert und autoklaviert
TE Puffer	1% Tris-HCl 1M, 0,4% EDTA 0,5M filtriert und autoklaviert
Proteinkinase K Mix	100 mg Proteinkinase K, 10 ml 10% SDS, 20 ml EDTA 0,5M auf 70 ml aqua dest
Gelfix	30% Glycerol, 3% Methanol, aqua dest

2. Methoden

S-Monovetten	Sarstedt
Sequenziergerät	Perkin Elmer Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer incl Software
PCR Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf safe ware
PCR Trio Thermoblock	Biometra
Netzgerät Biorad	Biometra LKB Bromma
UV-Tischlampe	Biometra
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Glas Pipetten	Pasteur
QIAquick Filtersystem	Qiagen

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Kollektivs

Die Probandengruppe wurde aus unterschiedlichen Quellen mit verschiedenen Schwerpunkten rekrutiert. Die Diabetikergruppe (DIA-Gruppe) umfaßt 85 Personen aus der Diabetesambulanz des UKE. Die Adipositasgruppe (APM-Gruppe) umfaßt 224 Personen aus dem Evangelischen Krankenhaus Dinslaken. Die Hypertriglyceridgruppe (TG-Gruppe) mit 84 Personen und die Hypercholesteringruppe (TC-Gruppe) mit 89 Personen stammen aus der Lipidambulanz des UKE. Die Kontrollgruppe mit 71 Personen sind Blutspender des UKE. Im Folgenden werden diese Gruppen charakterisiert.

Die Kontrollgruppe enthält keine Diabetiker und zeigt ein physiologisches Spektrum an Lipidwerten. Die Glukosewerte der Spender sind nicht bekannt. Die Allelfrequenz gemäß Hardy-Weinberg-Gesetz ist gerundet 0,85 zu 0,15. In der Kontrollgruppe zeigt sich für die Probanden mit CT-Genotyp ein nicht signifikant erhöhter durchschnittlicher TG-Wert von 156 +/- 60 mg/dl gegenüber den CC-Genotypen mit 131 +/- 40 mg/dl ($p=0,2$ im Mann-Whitney U-Test).

Tab. 5. Charakterisierung der Kontrollgruppe gesamt ($n=71$) und nach C1431T Genotyp (CC $n=51$, CT $n=19$, TT $n=1$). Alle Werte außer Geschlecht mit Standardabweichung. BMI in kg/m^2 , andere mg/dl. Die CT-Genotypen haben nicht signifikant erhöhte TG, $p=0,2$ im Mann-Whitney U-Test.

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	26 / 45	19 / 32	7 / 12	0 / 1
Alter	67 / 9	68 / 10	65 / 6	70
TC	195 / 45	197 / 46	202 / 43	193
TG	137 / 47	131 / 40	156 / 60	110
HDL	44 / 16	43 / 15	46 / 18	37
LDL	128 / 37	129 / 38	124 / 35	134
BMI	24 / 4	24 / 4	25 / 4	32

Die Diabetikergruppe mit 85 Personen enthält einen Patienten mit einem SSCP im Exon 6 von PPAR γ . Dieser Patient leidet an MODY, alle anderen an NIDDM. Die Probanden zeigen ein für Diabetiker typisches Glukose- und Lipid-Profil. Die Hardy-Weinberg-Frequenz ist 0,86 zu 0,14 (ohne den SSCP-Probanden). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe haben die CT-Genotypen Diabetiker mit 181 +/- 90 mg/dl verminderte TG gegenüber den CC-Genotypen mit 208 +/- 105 mg/dl (nicht signifikant, $p=0,42$ im Mann-Whitney U-Test).

3. Ergebnisse

Tab. 6. Charakterisierung der Diabetikergruppe gesamt (n=85) und nach C1431T Genotyp (CC n=61, CT n=22, TT n=1, SSCP=1). Alle Werte außer Geschlecht mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl.

	Alle	CC	CT	TT	SSCP
Geschlecht w / m	29 / 56	20 / 41	8 / 14	1 / 0	0 / 1
Alter	63 / 13	63 / 13	64 / 12	62	30
TC	193 / 51	194 / 51	181 / 47	311	229
TG	205 / 105	208 / 105	181 / 90	489	197
HDL	39 / 13	38 / 13	40 / 16	39	37
LDL	114 / 42	116 / 45	105 / 36	129	153
Glukose	174 / 68	174 / 68	170 / 61	349	145
BMI	29 / 7	29 / 8	27 / 5	28	24
Gewicht kg	86 / 23	89 / 25	78 / 15	78	85

Die TG-Gruppe umfaßt 84 Personen aus der Lipidambulanz des UKE mit einer Hardy-Weinberg-Frequenz von 0,87 zu 0,13. Die TG liegen oberhalb von 180 mg/dl und 26 % der Patienten haben auch NIDDM. Die CT-Genotypen haben mit 897 +/- 1209 mg/dl erhöhte TG Werte (p=0,09 im Mann-Whitney U-Test) und einen erhöhten Anteil an NIDDM (CC 20 % NIDDM, CT 47 % NIDDM, p=0,038 im χ^2).

Tab. 7. Charakterisierung der TG-Gruppe gesamt (n=84) und nach C1431T Genotyp (CC n=64, CT n=18, TT n=2). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl. Die CT-Genotypen haben erhöhte TG (p=0,09 im Mann-Whitney U-Test) und einen signifikant erhöhten Anteil (*) an NIDDM (p=0,038 χ^2 , p=0,06 Fisher).

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	15 / 69	14 / 50	1 / 17	0 / 2
Alter	48 / 11	48 / 11	48 / 11	44
NIDDM j / n	22 / 62	13 / 51	8 / 10 *	1 / 1
TC	287 / 110	289 / 110	280 / 117	305 / 84
TG	548 / 620	456 / 261	897 / 1209	409 / 54
HDL	32 / 10	33 / 10	30 / 10	29 / 2
BMI	28 / 4	28 / 4	29 / 3	28 / 5

Die TC-Gruppe umfaßt 89 Personen aus der Lipidambulanz des UKE mit einer Hardy-Weinberg-Frequenz von 0,89 zu 0,11. Die T-Allelfrequenz liegt 0,04 unter der Kontrollgruppe (p=0,49 im χ^2). Die TC liegen über 200 mg/dl und 2 % sind Typ II Diabetiker. Die HDL-Werte der CT-Genotypen sind mit 51 +/- 21 mg/dl nicht signifikant gegenüber den CC-Genotypen vermindert (p=0,4 im Mann-Whitney U-Test).

3. Ergebnisse

Tab. 8. Charakterisierung der TC-Gruppe gesamt n=89 und nach C1431T Genotyp (CC n=70, CT n=18, TT n=1). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl. HDL ist bei den CT Genotypen nicht signifikant erhöht (p=0,4).

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	40 / 49	29 / 41	10 / 8	1 / 0
Alter	46 / 13	46 / 16	47 / 13	36
NIDDM j / n	2 / 87	2 / 68	0 / 18	0 / 1
TC	307 / 86	306 / 85	314 / 94	263
TG	150 / 84	152 / 80	148 / 101	141
HDL	47 / 15	46 / 13	51 / 21	31
LDL	229 / 87	228 / 86	234 / 92	178
BMI	25 / 4	26 / 5	24 / 3	24
Gewicht	170 / 10	170 / 10	171 / 10	163

Die Adipositasgruppe (APM-Gruppe) umfaßt 224 Personen aus dem Evangelischen Krankenhaus Dinslaken. Diese Patienten leiden an Adipositas per magna und haben allesamt einen BMI > 40 kg/m². 16 % leiden an NIDDM. Die Hardy-Weinberg-Frequenz liegt in diesem Kollektiv bei 0,87 zu 0,13. Die T-Allelfrequenz ist somit 0.02 niedriger als in der Kontrollgruppe. Die TG der CT-Genotypen sind ebenfalls gegenüber den CC-Genotypen nicht signifikant vermindert (p=0,051 im Mann-Whitney U-Test). Der BMI der-CT Genotypen ist mit 53 +/- 8 kg/m² erhöht (p=0,28 Mann-Whitney U-Test).

Tab. 9. Charakterisierung der Adipositasgruppe gesamt (n=224) und nach C1431T Genotyp (CC n=168, CT n=52, TT n=4). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl. Die TG der CT-Genotypen sind vermindert (p=0,051 Mann-Whitney U-Test).

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	188 / 36	141 / 27	43 / 9	4 / 0
Alter	38 / 9	38 / 9	39 / 9	32 / 6
NIDDM j / n	36 / 188	29 / 139	7 / 45	0 / 4
TC	205 / 36	205 / 33	207 / 46	174 / 20
TG	167 / 71	170 / 73	157 / 66	114 / 22
HDL	42 / 11	42 / 11	42 / 12	38 / 7
LDL	129 / 31	126 / 30	131 / 36	116 / 19
BMI	52 / 8	51 / 8	53 / 8	45 / 3
Gewicht kg	168 / 9	169 / 9	167 / 9	170 / 1

Abschließend ergibt sich für das Gesamtkollektiv, also alle Probanden außer denen der Kontrollgruppe, eine Allelfrequenz von 0,86 zu 0,14 für die 402 Probanden aus der DIA-, TG-, TC- und APM-Gruppe (nach Ausschluß von "missing data", leider entfallen Probanden aus der TG-Gruppe wegen fehlender LDL-Werte). Auch im Gesamtkollektiv sind die TG-Werte der CT-Genotypen mit 162 +/- 70 mg/dl nicht signifikant vermindert (p=0,16 im Mann-Whitney U-Test).

3. Ergebnisse

Tab. 10. Charakterisierung des Gesamtkollektivs (DIA, TG, TC und APM) gesamt (n=402) und nach C1431T Genotyp (CC n=295, CT n=100, TT n=6). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl.

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	253 / 149	188 / 107	60 / 40	5 / 1
Alter	50 / 17	50 / 17	51 / 16	44 / 18
NIDDM j / n	143 / 259	105 / 190	36 / 64	1 / 5
TC	200 / 42	200 / 40	199 / 46	200 / 57
TG	170 / 78	171 / 79	162 / 70	176 / 154
HDL	41 / 13	41 / 12	42 / 14	38 / 5
LDL	125 / 36	126 / 35	123 / 37	119 / 17
BMI	41 / 14	41 / 14	40 / 15	40 / 8

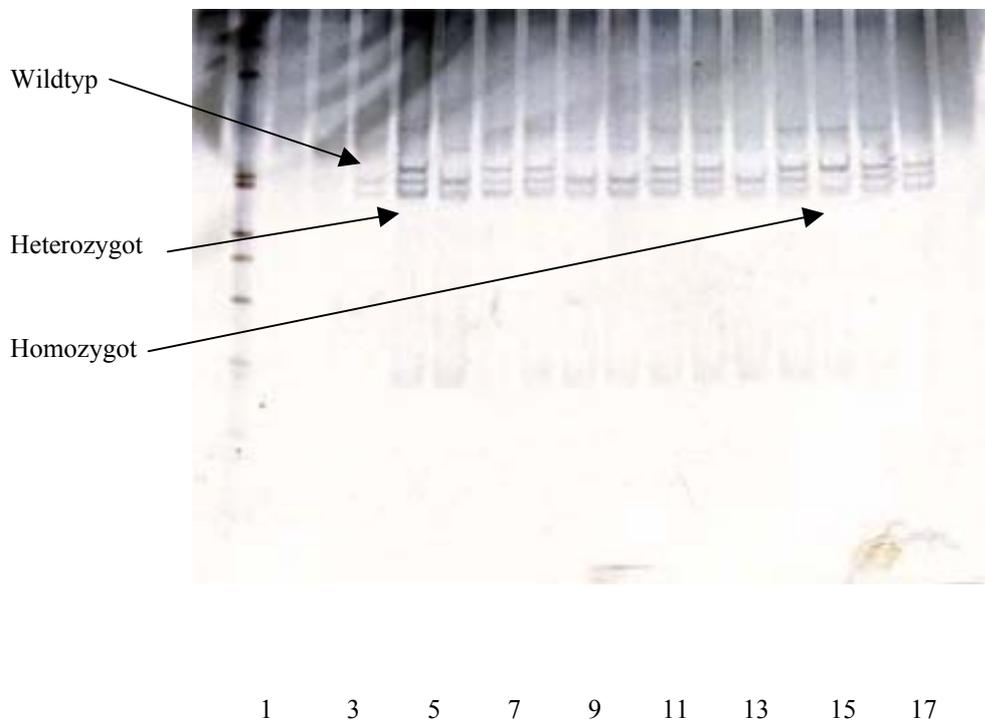


Abb. 9. Polyacrylamid / Glycerolgel zur Identifikation des C1431T Polymorphismus. Bahn 1: 1 kb-ladder. Bahn 2: Leerkontrolle. Bahn 15: Homozygot. Bahnen 4,6,9,10,13: Wildtyp. Bahnen 3,18: nicht identifizierbar. Alle anderen Probanden entsprechen dem heterozygoten Genotyp.

3.2. Assoziation des C1431T Polymorphismus mit NIDDM und Glukose

Hinsichtlich des Glukosestoffwechsels werden alle Probanden, deren Glukose-Werte vorhanden sind, in eine Gruppe von 267 Patienten zusammengefaßt. Die Allelfrequenz beträgt hier 0,87 zu 0,13. 49 % sind NIDDM, dies ist jedoch dadurch bedingt, daß bei vielen Probanden (v.a. den Nicht-NIDDM) der Glukose-Wert nicht erhoben wurde. Bei den CT-Genotypen liegt der Anteil an NIDDM bei 54 % ($p=0,38$ im χ^2), daher ist auch der Glukose-Wert bei den CT-Genotypen gegenüber den CC-Genotypen mit 144 ± 70 mg/dl erhöht ($p=0,08$ Mann-Whitney U-Test).

Auch in dieser Gruppe sind die TG-Werte der CT-Genotypen nicht signifikant gegenüber den CC-Genotypen vermindert ($p=0,2$ Mann-Whitney U-Test).

Tab. 11. Charakterisierung der "Glukoseprobanden" gesamt ($n=267$) und nach C1431T Genotyp (CC $n=201$, CT $n=61$, TT $n=4$). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m^2 , andere mg/dl.

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	148 / 119	107 / 94	38 / 23	3 / 1
Alter	48 / 16	48 / 16	50 / 16	41 / 16
NIDDM n / j	136 / 131	105 / 96	28 / 33	3 / 1
TC	216 / 15	217 / 66	210 / 61	257 / 97
TG	256 / 214	259 / 221	244 / 196	295 / 200
HDL	39 / 12	39 / 12	39 / 14	37 / 7
Glukose	135 / 60	129 / 55	144 / 70	152 / 132
BMI	40 / 14	40 / 14	40 / 14	35 / 10

Die 131 NIDDM Patienten dieser Gruppe weisen wie die DIA-Gruppe eine Allelfrequenz von 0,86 zu 0,14 auf. Die Glukose- und TG-Werte sind erwartungsgemäß erhöht und HDL leicht vermindert. Auch hier sind die TG mit 267 ± 213 mg/dl bei den CT-Genotypen nicht signifikant vermindert ($p=0,66$ Mann-Whitney U-Test). Bei den NIDDM Patienten mit CT-Genotyp ist der BMI mit 31 ± 9 kg/m^2 gegenüber 34 ± 11 kg/m^2 bei den CC-Genotypen nicht signifikant vermindert ($p=0,25$ Mann-Whitney). Dagegen ist der Glukose-Spiegel bei den CT-Genotypen mit 179 ± 78 mg/dl erhöht ($p=0,25$ Mann-Whitney U-Test).

Tab. 12. Charakterisierung der NIDDM gesamt ($n=130$) und nach C1431T Genotyp (CC $n=96$, CT $n=33$, TT $n=1$). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m^2 , andere mg/dl.

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	59 / 72	42 / 54	16 / 17	1 / 0
TC	208 / 58	207 / 56	209 / 63	311
TG	283 / 244	288 / 256	267 / 213	489
HDL	38 / 13	38 / 12	38 / 14	39
BMI	33 / 11	34 / 11	31 / 9	28
Glukose	169 / 67	164 / 61	179 / 78	349

3. Ergebnisse

Die Allelfrequenz der 136 Nicht-NIDDM liegt bei 0,87 zu 0,13. Wiederum ist TG bei den CT-Genotypen mit 212 +/- 60 mg/dl nicht signifikant vermindert ($p=0,18$ Mann-Whitney U-Test). TC ist ebenfalls vermindert ($p=0,39$ Mann-Whitney), Glukose mit 103 +/- 22 mg/dl gegenüber 98 +/- 15 mg/dl leicht erhöht ($p=0,08$ Mann-Whitney). Interessanterweise ist in dieser Gruppe im Gegensatz zu den NIDDM der BMI der CT Genotypen mit 50 +/- 12 kg/m² gegenüber 46 +/- 13 bei den CC-Genotypen nicht signifikant erhöht ($p=0,48$ Mann-Whitney). Hierbei handelt es sich um den Einfluß von Probanden aus der APM-Gruppe, bei denen der selbe Effekt beobachtet wurde.

Tab. 13. Charakterisierung der Nicht-NIDDM gesamt ($n=136$) und nach C1431T Genotyp (CC $n=105$, CT $n=28$, TT $n=3$). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl.

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	89 / 47	65 / 40	22 / 6	2 / 1
TC	223 / 71	225 / 73	212 / 60	239 / 110
TG	229 / 179	233 / 131	216 / 174	231 / 187
HDL	40 / 12	40 / 12	41 / 14	36 / 8
Glukose	98 / 17	98 / 15	103 / 22	87 / 15
BMI	47 / 13	46 / 13	50 / 12	37 / 11

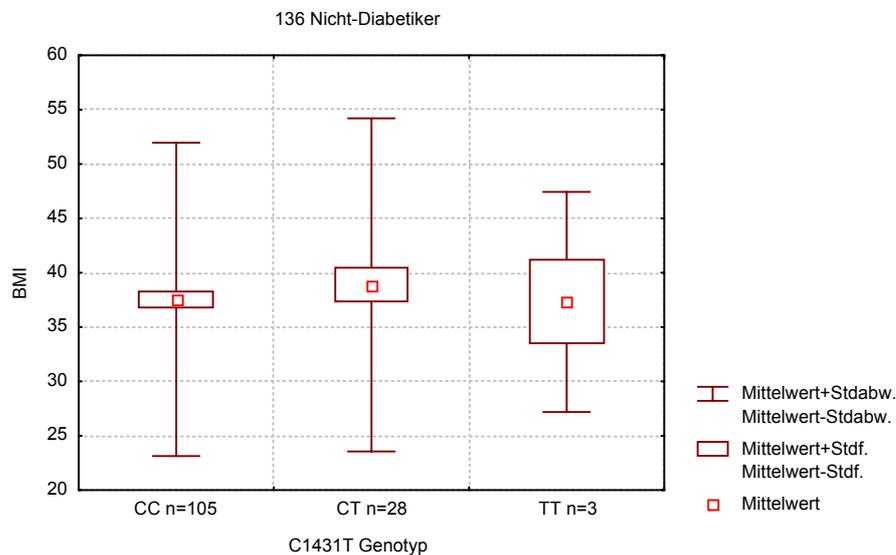


Abb. 10. Box Plot der BMI-Verteilung der Nicht-Diabetiker der Glukosegruppe nach C1431T Genotyp. Die CT-Genotypen haben durchschnittlich einen 4 kg/m² höheren BMI als die CC-Genotypen, $p=0,48$ Mann-Whitney.

3. Ergebnisse

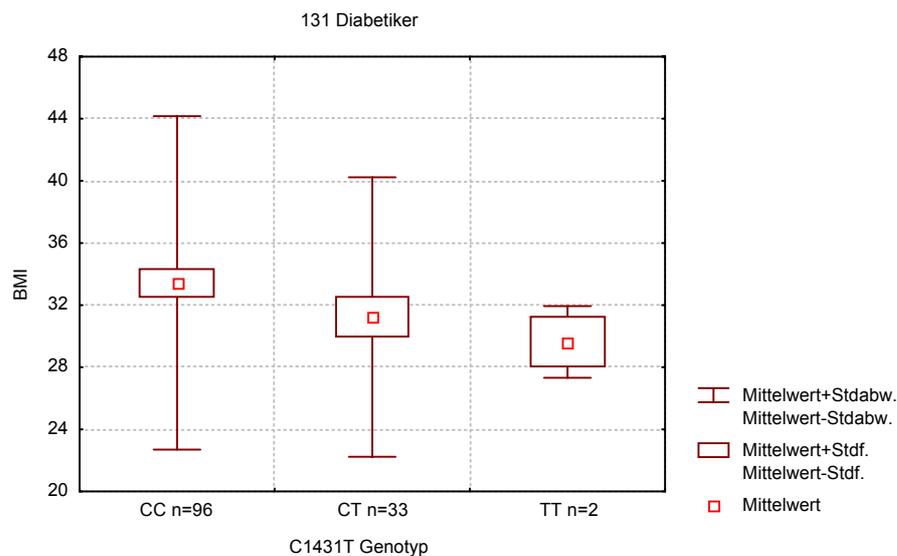


Abb. 11. Box Plot der BMI-Verteilung der Diabetiker der Glukosegruppe nach C1431T Genotyp. Die CT-Genotypen haben durchschnittlich einen 3 kg/m² niedrigeren BMI als die CC-Genotypen, p=0,25 Mann-Whitney.

3.3. Assoziation des C1431T Polymorphismus mit Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie

TG > 180 mg/dl rechtfertigen die Diagnose Hypertriglyceridämie. 188 Probanden des Gesamtkollektivs leiden an Hypertriglyceridämie. Die Allelfrequenz aller Probanden mit Hypertriglyceridämie liegt bei 0,89 zu 0,11. Der Anteil an NIDDM (n=72) beträgt 38 %, p=0,0001 χ^2 zur Kontrollgruppe. Randle PJ *et al* haben bereits 1961 nachgewiesen, daß Hypertriglyceridämie die Insulinsensitivität stört, was den erhöhten NIDDM Anteil bedingt [101].

340 Probanden mit TG < 180 mg/dl weisen dagegen wie die Kontrollgruppe eine Allelfrequenz von 0,85 respektive 0,15 auf, p=0,34 χ^2 im Verhältnis zu den TG > 180 mg/dl. Der Anteil an NIDDM beträgt 24 % (p=0,015 χ^2 zur Kontrollgruppe).

Im Gegensatz zu dem hohen NIDDM Anteil bei Hypertriglyceridämie haben alle 266 Probanden, die mit TC > 200 mg/dl und LDL > 130 mg/dl an Hypercholesterinämie leiden, lediglich einen signifikant verminderten Anteil von 20 % NIDDM (p=0,0005 χ^2). Bei Patienten mit dem Syndrom X sind die TC-Werte häufig im Normbereich, während TG erhöht und HDL vermindert ist [46 54 115]. Die Allelfrequenz bei Probanden mit Hypercholesterinämie beträgt 0,88 zu 0,12.

Auch bei dieser Hypercholesteringruppe ist TG bei den CT-Genotypen mit 167 +/- 77 mg/dl nicht signifikant vermindert (p=0,14 Mann-Whitney U-Test). Das HDL ist bei den CT-Genotypen mit 46 +/- 16 mg/dl dagegen erhöht (p=0,42 Mann-Whitney), ebenso der BMI mit 37 +/- 16 kg/m² (p=0,33 Mann-Whitney).

3. Ergebnisse

Tab. 14. Charakterisierung der Probanden mit Hypercholesterinämie (TC > 200 mg/dl und LDL > 130 mg/dl) gesamt (n=266) und nach C1431T Genotyp (CC n=206, CT n=58, TT n=2). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl. Keine Signifikanz.

	Alle	CC	CT	TT
Geschlecht w / m	138 / 128	102 / 104	35 / 23	1 / 1
Alter	49 / 16	49 / 15	50 / 14	40 / 6
NIDDM n / j	213 / 53	166 / 40	46 / 12	1 / 1
TC	267 / 66	267 / 67	269 / 66	254 / 13
TG	185 / 121	189 / 130	167 / 77	256 / 162
HDL	43 / 13	43 / 12	46 / 16	31 / 1
LDL	188 / 64	188 / 65	188 / 63	160 / 26
BMI	35 / 14	43 / 13	37 / 16	28 / 5
TC / HDL ratio	7 / 2	7 / 2	6 / 2	8

3.4. Assoziation des C1431T Polymorphismus mit dem Syndrom X

Das Syndrom X ist eigentlich eine klinische Diagnose, die lediglich labordiagnostisch unterstützt werden sollte. Dabei sind anerkannte Parameter TG >180 mg/dl, HDL < 40 mg/dl, BMI > 30 kg/m², Insulin > 13 mU/l sowie eine TC/HDL Ratio > 5. Bei 53 Personen aus dem Kollektiv sind alle diese Kriterien erfüllt. 20 von diesen Patienten haben NIDDM (38 %). Die Allelfrequenz liegt nach Hardy-Weinberg bei 0,92 zu 0,08 (45 CC, 8 CT, 0 TT). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit einer Allelfrequenz von 0,85 zu 0,15 (n=71) ein erheblicher, aber nicht signifikanter Unterschied (p=0,11 χ^2). Das T-Allel ist bei Patienten mit Syndrom X seltener.

Auffällig sind wieder die niedrigeren TG-Werte der CT-Genotypen gegenüber den CC-Genotypen (p=0,34 Mann-Whitney). Der BMI der CT-Genotypen ist erhöht, weil hier überproportional viele Probanden der APM-Gruppe vertreten sind (p=0,4 Mann-Whitney). Auch sind die Insulin-Werte der CT-Genotypen niedriger (p=0,11 Mann-Whitney).

Tab. 15. Charakterisierung der Probanden mit Syndrom X gesamt (n=53) und nach C1431T Genotyp (45 CC, 8 CT, 0 TT). Alle Werte außer Geschlecht und NIDDM (j=ja, n=nein) mit Standardabweichung. BMI in kg/m², andere mg/dl. Keine Signifikanz.

	Alle	CC	CT
Geschlecht w / m	29 / 24	23 / 22	6 / 2
NIDDM n / j	33 / 20	27 / 18	6 / 2
TC	224 / 37	226 / 38	215 / 38
TG	358 / 195	356 / 204	311 / 140
HDL	30 / 5	30 / 5	30 / 6
BMI	48 / 11	47 / 10	52 / 13
Insulin mU/l	32 / 22	34 / 23	23 / 8
TC/HDL Ratio	8 / 2	8 / 2	7 / 1

3.5. Kopplung des C431T und Pro12Ala Polymorphismus

Der C1431T Polymorphismus ist eine Punktmutation ohne Aminosäureaustausch, bei der funktionelle Einschränkungen des Genproduktes nicht vorhanden sein müssen. Aus den bisherigen Ergebnissen ist bereits ersichtlich, daß der Effekt dieses Polymorphismus nicht als sehr folgenschwer anzusehen ist.

Da noch andere Polymorphismen in PPAR γ bekannt sind, soll untersucht werden, ob eventuell ein summativer Effekt von mehreren Polymorphismen im PPAR γ Gen zu beobachten ist oder eine Kopplung dieser Polymorphismen vorliegt. Als Kandidat wird der Pro12Ala Polymorphismus ausgewählt, über den sehr unterschiedlich Ergebnisse publiziert sind [29 34 38 39 40 68 78 82 87 88 105 126 144]. Es wäre schließlich denkbar, daß z.B. die Homozygotie in beiden Polymorphismen oder eine besondere Haplotypen Konstellation zu einem ausgeprägtem NIDDM führt.

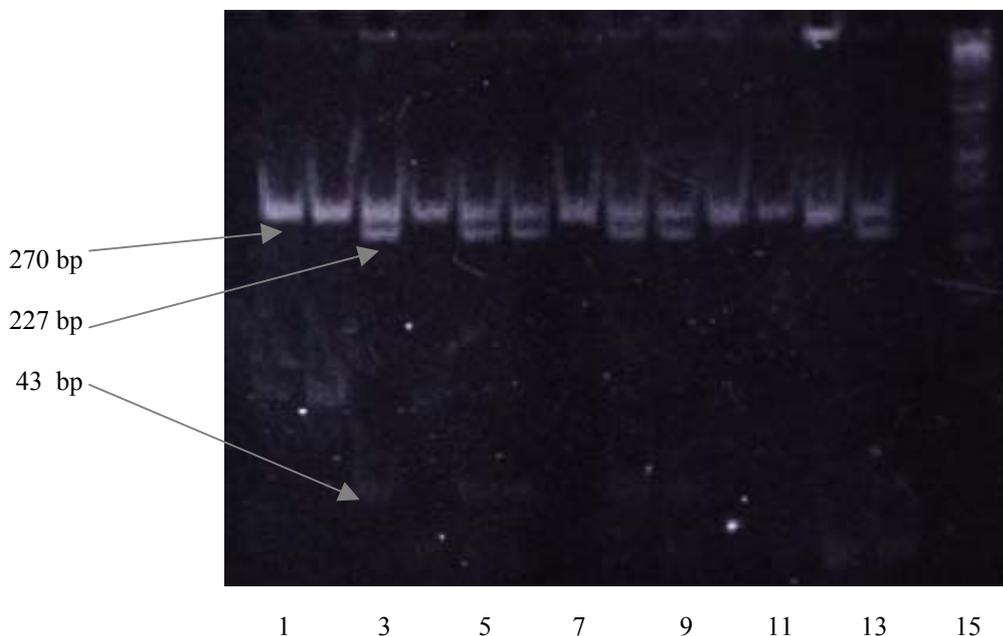


Abb. 12. Polyacrylamid-Gel zur Identifikation des Pro12Ala Polymorphismus nach PCR-RFLP. Bahn 15: 1 kb-ladder. Bahn 14: Leerkontrolle. Bahnen 3,5,6,8,9,13: Heterozygote Pro12Ala Träger (270, 227 und 43 bp). Alle anderen sind Wildtyp (270 bp).

71 Probanden wurden deswegen auf den C1431T und Pro12Ala Polymorphismus untersucht. Von dieser 71 Personen waren 36 NIDDM und 35 Nicht-NIDDM. Die Allelfrequenzen liegen für den C1431T Polymorphismus bei 0,86 / 0,14, für den Pro12Ala Polymorphismus bei 0,92 / 0,08. Diese Frequenzen unterliegen dem Hardy-Weinberg Gesetz und stimmen mit berichteten Frequenzen anderer Publikationen überein [85 136 144].

Ein homozygoter Proband für das Ala-Allel des Pro12Ala Polymorphismus kam in diesem Kollektiv nicht vor, ein homozygoter T-Allelträger lediglich zweimal. Nur 12 Individuen tragen ein Ala-Allel (davon 7 NIDDM), 18 Probanden ein T-Allel (davon 8 NIDDM).

Der Genotyp Pro12Pro/C1431C ist gemäß der Allelfrequenzen am häufigsten (n=45, 20 NIDDM), den Genotyp Pro12Ala/C1431T weisen 7 Probanden auf (davon 3 NIDDM).

3. Ergebnisse

Pro12Ala/T1431T kommt lediglich einmal vor und ist NIDDM. 14 Probanden zeigen einen "gemischten" Genotyp (4 Pro12Ala/C1431C und 10 Pro12Pro/C1431T, davon 7 NIDDM).

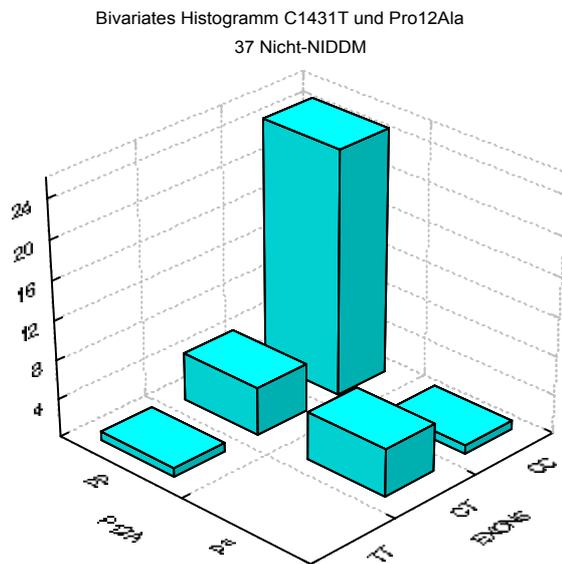
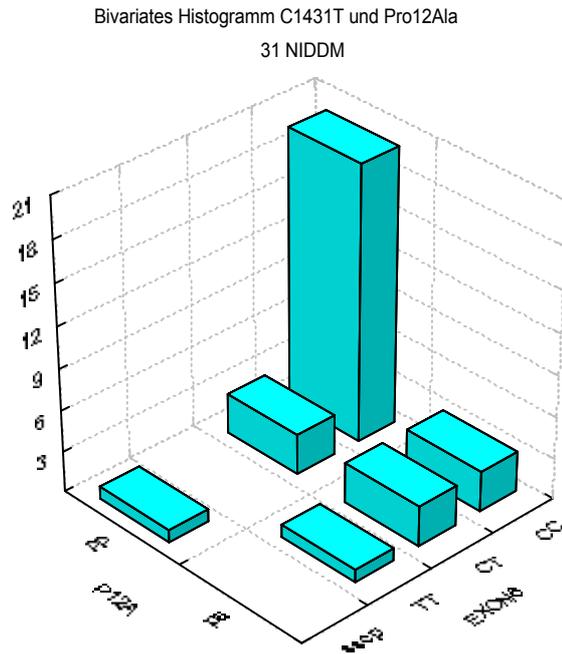


Abb. 13. und 14. Bivariate Histogramme von NIDDM und Nicht-NIDDM nach C1431T und Pro12Ala Genotyp. Auffällige Häufung des Pro12Ala/C1431C Genotyps bei Diabetikern ($p=0,34 \chi^2$). Ein Pro12Ala/T1431T Genotyp und ein SSCP in der NIDDM Gruppe.

3. Ergebnisse

Die Probanden werden nach NIDDM und Nicht-NIDDM aufgetrennt und gemäß ihrer Genotypen für beide Polymorphismen als bivariate Histogramme dargestellt. Dabei ist der Genotyp Pro12Ala/C1431C (n=4, 3 NIDDM) in der NIDDM Gruppe häufiger, jedoch nicht signifikant ($p=0,34 \chi^2$). Der Genotyp Pro12Pro/C1431T ist gleichmäßig vertreten (n=10, 4 NIDDM).

Wenn man davon ausgeht, daß der Phänotyp NIDDM in genetischer Hinsicht in den 4 Pro12Ala/C1431C Probanden nicht vom Pro12Ala Polymorphismus bedingt ist, könnte man diese Häufung von NIDDM auf den insgesamt seltenen Haplotypen Ala/C zurückführen. Leider ist die Fallzahl dieses Haplotyps sehr gering.

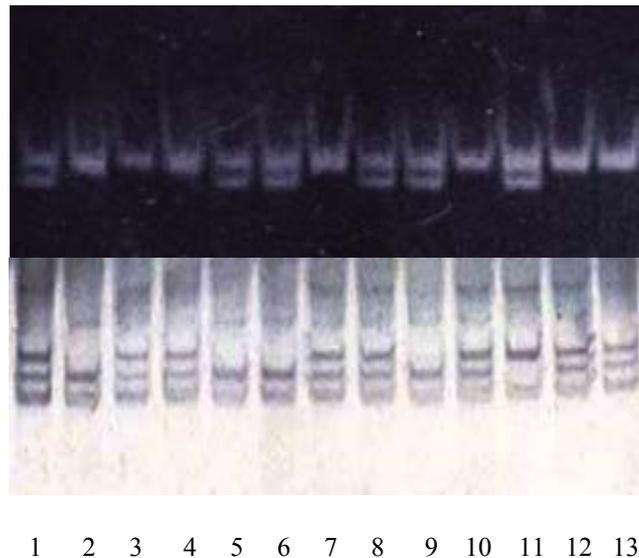


Abb. 15. Genotypisierung beider Polymorphismen von 13 Probanden im Vergleich. Offenbar sind diese Polymorphismen nicht miteinander gekoppelt. Einen Ala/C Haplotyp tragen definitiv 5,6,9. Weitere mögliche Ala/C Haplotypen wären 1,8. Den Haplotyp Ala/T zeigt definitiv nur Proband 11. Die Probanden 1,8,9,10,11 sind NIDDM. Die Probanden 6 und 12 IDDM.

Der C1431T Polymorphismus ist wahrscheinlich nicht mit Pro12Ala gekoppelt. Dazu müßte wegen der unmittelbaren Nähe und der geringen "crossing-over" Wahrscheinlichkeit der Polymorphismen ein einheitlicherer Genotyp auftreten [149].

Die Anzahl der Ala/T Haplotypen (n=1, weitere 2 möglich) in der Abbildung oben ist wesentlich geringer als die Anzahl der Pro/T Haplotypen (n=7, weitere 2 möglich). Definitiv nur ein Proband trägt den Haplotypen Ala/T, bei 2 Probanden mit Genotyp Pro12Ala/C1431T kann keine Aussage über den Haplotypen gemacht werden, da dies reine Spekulation wäre.

Der Ala/C Haplotyp scheint zusammenfassend besonders gefährdet, einen NIDDM auszuprägen. Es sind jedoch zu wenige Probanden mit diesem Haplotypen in unserem Kollektiv vorhanden, um eindeutige Aussagen fällen zu dürfen, sehr viel größere Kollektive wären dazu notwendig. Auch die von Meirhaeghe A *et al* [85] vorgestellte Hypothese eines weiteren, bisher nicht bekannten Polymorphismus in unmittelbarer Nähe von C1431T, aber nicht unbedingt innerhalb des PPAR γ Gens, bleibt zu bedenken. C1431T könnte als Sonde für diesen Polymorphismus interpretiert werden [149].

3.6. Zufallsbeobachtung: Ein SSCP im Exon 6

Wie in der Einleitung erläutert ist der NIDDM als polygenetisch und multifaktoriell determinierte Erkrankung anzusehen, wobei die genaueren Vererbungsmodi und Loci noch nicht eindeutig bekannt sind. Als Ausnahme ist der MODY bekannt, eine Sonderform des NIDDM.

Der MODY vererbt sich mit hoher Penetranz autosomal-dominant und fällt durch sehr frühe Manifestation des NIDDM im Alter vor dem 25. Lebensjahr sowie einen primären Defekt der Insulin Sekretion auf [41-49]. MODYs zeigen häufig nur eine mäßige Hyperglykämie und sind resistent gegenüber einer Ketose. Es sind keine Insellantikörper nachweisbar.

Die Genetik ist bereits relativ genau beschrieben. Für den Vererbungsmodus autosomal-dominant sprechen die häufige direkte Transmission durch drei Generationen einer Familie, das 1:1 Verhältnis diabetischer und nicht-diabetischer Kinder bei einem Elter mit MODY, ferner die hohe Penetranz der bisher bekannten Defekte (90% aller Allelträger werden phänotypisch auch Diabetiker) sowie die direkte Vererbung von Vater auf Sohn, die einen X-chromosomalen Erbgang ausschließt [46].

Die bisher publizierten Genloci, die zum Phänotyp des MODY führen, sind HNF-4 α (MODY1) auf 20q, GCK (MODY2) auf 7p, HNF-1 α (MODY3) auf 12q, IPF-1 (MODY4) auf 13q und HNF-1 β (MODY5) auf 17cen-q.

Während in diesem Kollektiv das Exon 6 auf Polymorphismen mit der SSCP Methode gescreent wurde, fiel ein SSCP auf. Dieses Individuum war ein iranischer MODY-Kandidat, der von der Erkrankung zweier weiterer Brüder sprach, seine Mutter verstarb bereits im Alter von 48 Jahren an Diabetes.

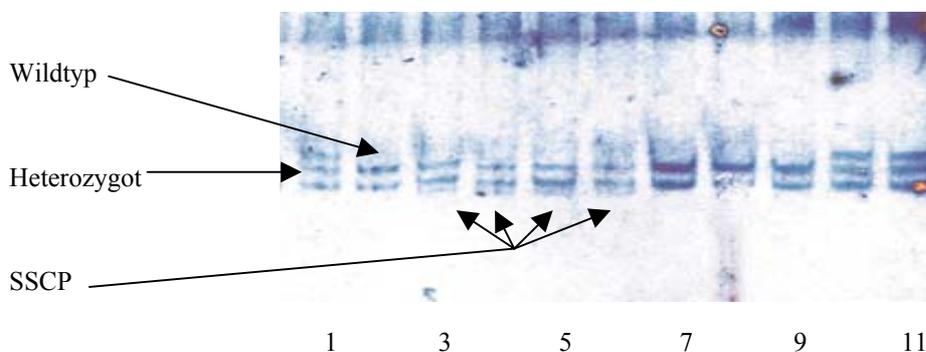


Abb. 16. Identifikation eines SSCP im Exon 6. Bahnen 2,7,8,9: normale Wildtypen. Bahnen 1,10,11: heterozygot C1431T, Lane 3,4,5,6: SSCP, in diesem Gel mit unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen.

Das Exon 6 des Probanden wurde sequenziert. Im Vergleich mit zwei Wildtyp-Probanden ergab sich eine Substitution von C / T (ACG zu ATG) am Nukleotid 1460 (C1460T). Dieser Substitution folgt gemäß der in Elbrecht A *et al* [35] veröffentlichten Sequenz von PPAR γ ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin an Position 487, Thr487Met.

3. Ergebnisse

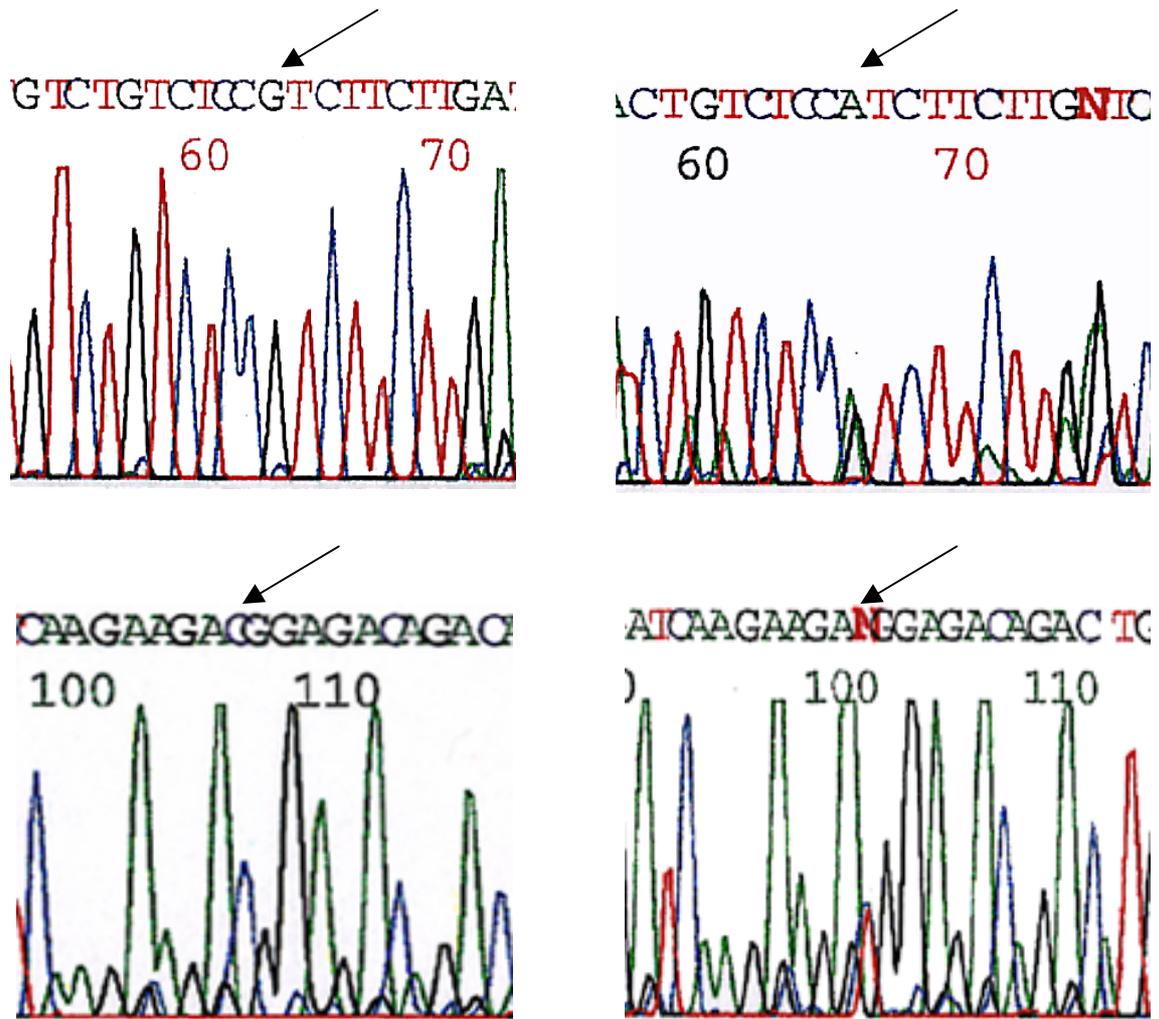


Abb. 17-21. Links 3' und 5' Sequenz des Wildtyp, rechts 3' und 5' Sequenz des heterozygoten SSCP mit einer C/T Substitution im Nukleotid 1460, Aminosäureposition 487. ACG (auf dem 5' codogenen Strang) wird zu ATG und somit Threonin zu Methionin.

Ein Aminosäureaustausch zum Methionin kann in diesem Individuum durchaus mit einer veränderten Tertiärstruktur und somit Dysfunktion des Proteins einhergehen. Methionin trägt ferner eine Methylgruppe und kann somit das für das Splicing wichtige Methylierungsmuster beeinflussen [8].

Wenn es sich bei diesem neuen Polymorphismus um ein MODY-Gen handeln sollte, müßte dieser Polymorphismus in der Familie gehäuft auftreten. Zunächst wurde der Bruder des Probanden, der ebenfalls einen MODY ausgeprägt hatte, aufgesucht und das Exon 6 von PPAR γ sequenziert. Der Bruder zeigt jedoch eindeutig den Wildtyp.

3. Ergebnisse

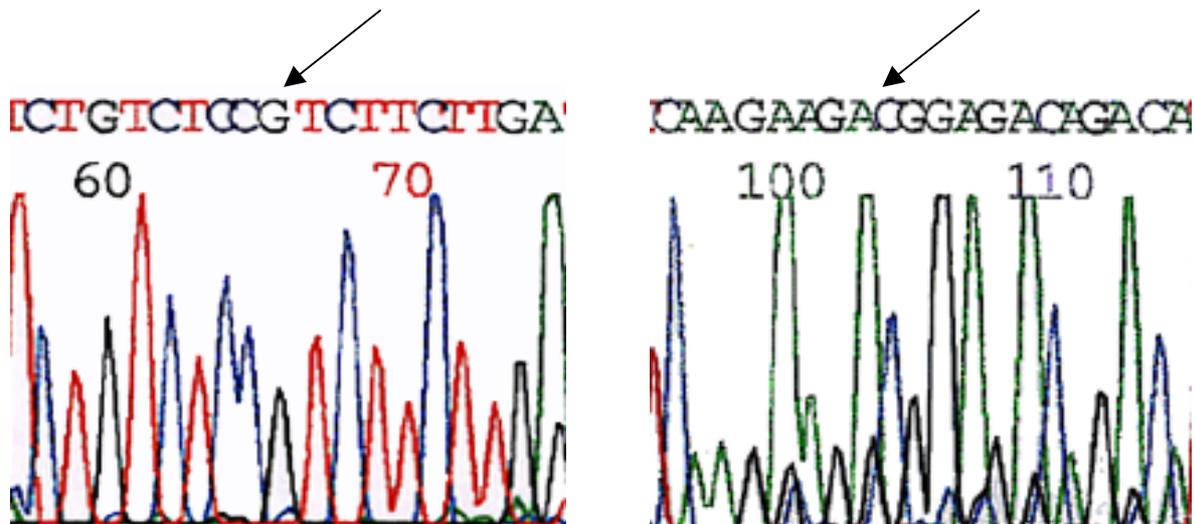


Abb. 22 und 23. Die 5' und 3' Sequenzen des Bruders des SSCP entsprechen dem ACG Wildtyp, kodierend für Threonin. Zumindest im Exon 6 liegt weder der entdeckte Polymorphismus des Bruders noch ein anderer Polymorphismus vor.

In Anbetracht des vorliegenden Wildtypus im Bruder ist es sehr unwahrscheinlich, daß es sich bei diesem Polymorphismus um ein bisher nicht beschriebenen MODY-Standort handelt. Der Rest der Familie müßte hinsichtlich dieses Polymorphismus im Exon 6 von PPAR γ untersucht werden. Möglicherweise sind in dieser Familie auch zwei MODY-Gene kombiniert, wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme einer privaten Mutation in diesem klinisch ausgeprägten MODY Individuum.

4. Diskussion

Meirhaeghe A *et al* [85], Wang XL *et al* [136], Ogawa S *et al* [93] und Evans D *et al* [38] haben bisher den C1431T Polymorphismus in unterschiedlicher Absicht gescreent. Meirhaeghe A *et al* [85] und Ogawa S *et al* [93] haben dabei Diabetiker und andere Probanden, die wegen Adipositas oder Dyslipidämie therapeutisch behandelt werden, von der Analyse ausgeschlossen, so daß alleine vom Probandenkollektiv her eine Vergleichbarkeit mit diesem Kollektiv nicht ohne Vorsicht zulässig ist. Wang XL *et al* [136] verwendeten ebenfalls ein "hospitalisiertes" Kollektiv von KHK Patienten, die auch andere Risikofaktoren wie z.B. Dyslipidämie und Hypertonus, also Bestandteile des metabolischen Syndroms, aufweisen. Die Vergleichbarkeit mit diesem Kollektiv ist am ehesten gegeben. Der Großteil der Probanden aus der Publikation von Evans D *et al* [38] entspricht dem Kollektiv dieser Arbeit.

Teils handelt es sich auch um unterschiedliche ethnische Gruppen und somit Populationen mit unterschiedlichem Gen-Pool. Wie groß die Unterschiede in der Allelfrequenz eines Polymorphismus von Volk zu Volk sein können, kann man Yen C-J *et al* [144] in Bezug auf den Pro12Ala Polymorphismus entnehmen: Die Ala-Allelfrequenzen variieren zwischen 0,12 und 0,01 unter den einzelnen Ethnien.

Alle Gruppen verwendeten Assoziationsstudien. Meirhaeghe A *et al* [85] und Ogawa S *et al* [93] faßten die CT- und TT-Genotypen zu einer Gruppe zusammen, um somit den Effekt des T-Allels zu akzentuieren und die statistische Aussagefähigkeit zu verbessern, wie von Meirhaeghe A *et al* [85] vorgeschlagen wurde. Ursächlich für diese Maßnahme wird erwähnt, daß die Anzahl homozygoter T-Allelträger in allen Kollektiven sehr klein ist. Im Falle des C1431T Polymorphismus könnte dies ein systematischer Fehler gewesen sein, weil vorausgesetzt wurde, daß sich der homozygote Genotyp phänotypisch stärker ausprägt als der heterozygote Genotyp. Daher werden in dieser Arbeit alle Genotypen einzeln berücksichtigt. Um die Effekte des seltenen T1431T Genotyps statistisch sicher zu belegen, wäre allerdings ein Kollektiv von mindestens 3000 Individuen notwendig [136]. Es läßt sich jedoch ein Haplotypenvorteil des CT-Genotyps nicht leugnen.

Ogawa S *et al* [93], Meirhaeghe A *et al* [85] und Wang XL *et al* [136] haben den RFLP zum Nachweis des C1431T Polymorphismus mit dem Restriktionsenzym *PmlI* geführt, während in dieser Arbeit das Restriktionsenzym *BstU 1* zum Einsatz kam. Die beiden Restriktionsenzyme sollen in Sensitivität und Spezifität jedoch annähernd identisch sein.

Meirhaeghe A *et al* [85] und Wang XL *et al* [136] untersuchten C1431T hinsichtlich ähnlicher Fragestellungen in Berührung mit Adipositas, Fettstoffwechsel und KHK. Ogawa S *et al* [93] screenen den C1431T Polymorphismus im Zusammenhang mit der Knochendichte bei 404 japanischen Frauen in der Postmenopause. TNF α ist als Antagonist des Insulins und inhibiert durch PPAR γ tatsächlich ein Osteoklasten aktivierender und somit in Bezug auf die Knochendichte kataboler Faktor. Tatsächlich wird eine Assoziation des C1431T Polymorphismus mit verminderter Knochendichte in diesem Kollektiv von Ogawa S *et al* [93] gefunden.

Wang XL *et al* [136] finden unter 647 kaukasischen Australiern, allesamt zur Koronarangiographie hospitalisiert, keine Assoziation von C1431T mit Diabetes, BMI oder Hypertonus. Im Gegenteil finden die Autoren bei CT- und TT-Genotypen ein niedrigeres Risiko für KHK mit einem $p=0,0015$ für CT, bei TT-Genotypen $p=0,0045$. Die Autoren schlagen einen direkten Gefäßwandeffekt des Polymorphismus vor und sprechen von einem Haplotypenvorteil. Diese heterozygoten Allelträger zeigten auch höheres HDL, wie die

Probanden der Hypercholesteringruppe dieser Arbeit. HDL ist bekannterweise koronarprotektiv [28 45 69 72 113 114].

Meirhaeghe A *et al* [85] untersuchten 1154 französische Probanden ohne Hinweis auf eine Assoziation von C1431T mit BMI, "Waist-Hip-Ratio" und Hypertonus. In adipösen Probanden findet die Autorengruppe jedoch zirkulierende Leptin-Werte bei T-Allelträgern, und schlägt eine modifizierende Rolle für den Polymorphismus hinsichtlich der Beziehung zwischen BMI und Leptin vor. Zusätzlich wird der Gedanke des "Sondenphänomens" erstmals für C1431T erwogen, also die unmittelbare Nähe von C1431T zu einem funktionell bedeutendem, aber bisher unentdeckten Polymorphismus.

Im untersuchten Gesamtkollektiv dieser Arbeit, welches wesentlich aus zu therapierenden und hospitalisierten Patienten und nicht aus der allgemeinen Population stammt, zeigt sich eine Allelfrequenz des C1431T Polymorphismus von 0,86 / 0,14. Die aus Blutspendern rekrutierte Kontrollgruppe zeigt eine Allelfrequenz von 0,85 / 0,15. Diese Ergebnisse entsprechen den angegebenen Frequenzen anderer Publikationen für diesen Polymorphismus, bei Meirhaeghe A *et al* [85] 0,86 / 0,14, bei Ogawa S *et al* [93] 0,851 / 0,149, bei Wang XL *et al* [136] 0,837 / 0,163.

Die statistische Auswertung in den einzelnen TG-, TC-, APM-, DIA- und Kontrollgruppe offenbart keine neuen signifikanten Assoziationen. Die CT-Genotypen zeigen regelmäßig verminderte TG, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, die erhöhte TG aufweisen ($p=0,2$). Besonders deutlich verringert sind die TG in der Adipositasgruppe ($p=0,051$) und Diabetikergruppe ($p=0,42$). Dies gilt im wesentlichen für die CT-Genotypen, TT-Genotypen liegen in zu kleiner Anzahl für eine relevante Aussage vor, oder es liegt ein Indiz für den Haplotypenvorteil vor. Die Häufung von NIDDM in der Hypertriglyceridämiegruppe ist signifikant ($p=0,038$), aber die Assoziation von Hypertriglyceridämie und Insulinresistenz wurde bereits von Randle PJ *et al* [101] 1961 beschrieben. Die Hypercholesterinämiegruppe zeigt erwartet keinen erhöhten Anteil an NIDDM oder Syndrom X, weil diese häufig normales Cholesterin aufweisen [30 46 54 115]. Allerdings weist diese Hypercholesteringruppe eine niedrige T-Allelfrequenz von 0,11 auf (Kontrollgruppe 0,15, $p=0,49$). Diese Subgruppe zeigt wie bei Wang XL *et al* [136] erhöhtes koronarprotektives HDL bei den CT-Genotypen ($p=0,4$).

In dem beobachteten Kollektiv ist also ebenfalls ein gewisser "Haplotypenvorteil" zu beobachten, der bei CT-Genotypen TG und HDL günstig beeinflusst.

Alle 131 NIDDM des Gesamtkollektivs zeigen im Verhältnis zu den 136 Nicht-NIDDM einen verminderten BMI bei CT gegenüber CC, wobei der Anteil an Adipösen bei den Nicht-NIDDM recht hoch ist. Es könnte sich allerdings auch hier um einen Haplotypenvorteil handeln. Bei den 188 Probanden mit Hypertriglyceridämie und den 266 Probanden mit Hypercholesterinämie ist die T-Allelfrequenz mit 0,11 respektive 0,12 gegenüber der Kontrollgruppe mit 0,15 nicht signifikant vermindert ($p=0,34$). Das T-Allel ist bei Probanden mit Dyslipidämie seltener, ebenso trifft dies für die 53 Syndrom X Probanden mit einer T-Allelfrequenz von 0,08 zu ($p=0,11$). Auch hier sind TG und HDL bei CT-Genotypen günstig beeinflusst, jedoch nicht signifikant. Wieder zeigt sich ein Indiz für den Haplotypenvorteil.

Insgesamt ist das T-Allel bei der Kontrollgruppe häufiger vertreten als bei "Kranken". Der Genotyp CT scheint ein prognostisch günstiger Faktor für Patienten mit Syndrom X, Diabetes und Dyslipidämie zu sein, da TG und HDL zum Vorteil beeinflusst sind. Dies kann positive Folgen auf die Entwicklung einer Atherogenese im Sinne eines "präventiven Faktors" haben.

Im Hinblick auf die gekoppelte Analyse des C1431T und Pro12Ala Polymorphismus fällt auf, daß ein seltener Haplotyp Ala/C, den nur 4 von 71 Probanden tragen, mit NIDDM

assoziiert ist. 3 von diesen 4 Probanden sind NIDDM ($p=0,34 \chi^2$). Für eindeutige Assoziationen sind weit größere Fallzahlen erforderlich, jedoch konnte dieses Ergebnis von Evans D *et al* mit größerer Fallzahl bestätigt werden [38].

Ein Polymorphismus in PPAR γ im Zusammenhang mit MODY ist bis heute nicht beschrieben worden, wäre aber wegen der bedeutsamen Funktion von PPAR γ durchaus vorstellbar. Screening in den 5 bekannten MODY-Genen bei 67 französischen MODY-Familien hat gezeigt, das 11 (16%) dieser Familien keine Mutationen in den bisher bekannten MODY-Genen aufwiesen [21]. Chevre JC *et al* [21] zogen daraus die Schlußfolgerung zumindest eines weiteren und bisher nicht bekannten MODY-Locus. Wahrscheinlich sind es noch sehr viel mehr. PPAR γ wäre rein funktionell gesehen ein perfektes Kandidaten Gen. Allerdings kann bei dem Bruder des Probanden, der ebenfalls MODY ist, der Polymorphismus nicht nachgewiesen werden, so daß es sich vermutlich um eine zufällige Variante handelt. Die komplette Familie müßte untersucht werden.

In der Zukunft sollten verstärkt Linkageanalysen mit anderen Polymorphismen und anderen Genen betrieben werden. Ist PPAR γ als Kandidatengen überhaupt geeignet, oder handelt es sich bei den untersuchten Polymorphismen nur um ein Sondenphänomen? Alle bisher veröffentlichten Publikationen zu dieser Thematik verwenden lediglich statistische Assoziationsstudien, mit Ausnahme von Deeb SS *et al* [29], die eine verringerte Affinität des Ala-Allels zum PPPE im LPL- und ACO-Gen zeigen konnten. Es sind ferner weit größere Fallzahlen notwendig, Assoziationen von seltenen Haplotypen wie Ala/C oder den homozygoten T1431T Genotyp mit NIDDM oder Dyslipidämie statistisch sicher zu belegen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen einer genetischen Variation in einem geeigneten Kandidatengen und pathologischen Veränderungen im Lipid- und Glukosestoffwechsel beim Menschen mit Hilfe einer Assoziationsstudie untersucht. Als Kandidatengen wurde ein Transkriptionsfaktor von zentraler regulatorischer Funktion im Lipid- und Glukosestoffwechsel ausgewählt, der humane Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor γ (PPAR γ). Als Polymorphismus wurde der bisher wenig untersuchte C1431T Polymorphismus gewählt.

Für die Assoziation des C1431T Polymorphismus im PPAR γ mit dem Lipid- und Glukosestoffwechsel wurden 366 C1431T Genotypisierungen mittels PCR und SSCP durchgeführt. 323 C1431T Genotypisierungen (Adipositas-Kollektiv und Diabetiker-Kollektiv) werden zur Analyse aus anderen Projekten hinzugezogen.

Die Ergebnisse der Genotypisierungen wurden statistisch mit den aus den Patientenakten erhobenen Daten ins Verhältnis gesetzt. 674 von 689 dieser Probanden wurden nach Ausschluß von "missing data" in die Analyse einbezogen.

157 Pro12Ala Genotypisierungen mittels PCR und RFLP wurden wesentlich für die Fortsetzung anderer Projekte durchgeführt. 68 dieser Pro12Ala genotypisierten Probanden wurden gemeinsam mit dem C1431T Polymorphismus hinsichtlich einer möglichen Kopplung analysiert.

Der Polymorphismus wird in Hinblick auf NIDDM und Glukose, Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und Syndrom X im Gesamtkollektiv und einzelnen Subgruppen untersucht. Dabei wird eine erhöhte Tendenz des Vorkommens des T-Allels bei NIDDM Probanden beschrieben, die mit einem günstigen Einfluß auf BMI, TG und HDL einhergeht und v.a. bei heterozygoten Probanden auffällt. Es könnte also einen Heterozygotenvorteil bei C1431T geben, wie Wang X et al [136] vorschlug. Aussagen über den TT-Genotyp können wegen Seltenheit der Homozygotie kaum getroffen werden.

In Bezug auf die gekoppelte Analyse der C1431T und Pro12Ala Polymorphismen wird über eine seltene Haplotypen Konstellation berichtet, die mit NIDDM assoziiert scheint.

Die im Rahmen der zur Detektion des C1431T Polymorphismus gewählte Methode SSCP diene ferner zum Screening neuer Polymorphismen im Exon 6. Ein solcher Polymorphismus wurde im Verlaufe dieser Arbeit gefunden und mit einem automatischen Sequenzierer sequenziert. Ein Zusammenhang mit dem MODY wird vorgeschlagen. Nach Untersuchung von Angehörigen handelt es sich vermutlich um eine äußerst seltene spontane Mutation in diesem Individuum, die einen Aminosäureaustausch verursacht, Thr487Met.

Letztendlich ist keine hochsignifikante Assoziation des C1431T Polymorphismus mit dem Syndrom X oder Diabetes beobachtet worden, so daß weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen notwendig sein werden, um Zusammenhänge statistisch sicher zu belegen. Abschließend wird die zukünftige Suche nach weiteren Polymorphismen in diesem Gen notwendig sein.

- 1 Adams M, Reginato M, Shao D, Lazar M, Chatterjee V (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272:5283-5290
- 2 Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES (2000) The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 20, 284-7
- 3 Auwerx J, Martin G, Guerre-Millo G, Staels B (1996) Transcription, adipocyte differentiation, and obesity. *J Mol Med* 74:347-352
- 4 Baroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S (1999) Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402, 880-3
- 5 Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196: 80-3
- 6 Beamer BA, Negri C, Yen C-J, Gavrilova O, Rumberger JM, Durcan MJ, Yarnall DP, Hawkins AL, Griffin CA, Burns DK, Roth J, Reitman M, Shuldiner AR (1997) Chromosomal localisation and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR γ) gene. *Bioch Biophys Res Comm* 233: 756-759
- 7 Beamer BA, Yen C-J, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J (1998) Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene with obesity in two caucasian populations. *Diabetes* 47(11), Brief genetics report
- 8 Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D (1995) Genetics, Biochemistry, and molecular bases of variant human Phenotype. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th edition
- 9 Belluzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M (1996) Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 334:1557-1560
- 10 Brown KK, Henke BR, Blanchard SG, Cobb JE, Mook R, Kaldor I, Kliewer SA, Lehmann JM, Lenhard JM, Harrington WW, Novak PJ, Faison W, Binz JG, Hashim MA, Oliver WO, Brown HR, Parks DJ, Plunket KD, Tong WQ, Menius JA, Adkinson K, Noble SA, Willson TM (1999) A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor- gamma reverses the diabetic phenotype of the Zucker fatty rat. *Diabetes* 48: 1415-24

6. Referenzen

- 11 Brown PH, Lippman SM (2000) Chemoprevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62:1-17
- 12 Brun PB, Kim JB, Hu E, Spiegelman BM (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis. *Current Opinion of Lipidology* 8:212-18
- 13 Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM (1996) Differential Activation of Adipogenesis by multiple PPAR Isoforms. *Genes Dev* 10:974-984
- 14 Buchanan T, Xiang A, Peters R, Kjos S, Tan S, Marroquin A, et al. (2002) Prevention of type 2 diabetes by treatment of insulin resistance: comparison of early vs. late intervention in the TRIPOD study (abstract). *Diabetes* 51(Supp. 2): A35
- 15 Buddecke E (1994) *Grundriss der Biochemie*. 9.Auflage. Walter deGruyter Berlin New York
- 16 Canuto RA, Ferro M, Salvo RA, Bassi AM, Trombetta A, Maggiora M, Markinasso G, Lindahl R, MuzioG (2001) Increase in class 2 aldehyde dehydrogenase expression by an arachidonic acid in rat hepatoma cells. *Biochem* 357:811-818
- 17 Caron M, Auclair M, Vigouroux C, Glorian M, Forest C, Capeau J (2001) The HIV Protease Inhibitor Indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes* 50:1378-1388
- 18 Chang AY, Wyse BM, Gilchrist BJ, Peterson T, Diani AR (1993) Ciglitazone, a new hypoglycemic agent. I. Studies in ob/ob and db/db mice, diabetic chinese hamsters, and normal streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes* 32:830-838
- 19 Chattopadhyay N, Singh DP, Heese O, Godbole MM, Sinohara T, Black PM, Brown EM (2000) Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Human Astrocytic Cells: PPAR γ Agonists as Inducers of Apoptosis. *J Neuroscience Res* 61:67-74
- 20 Chawla A, Lazar MA (1994) Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1786-90
- 21 Chevre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanche H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanne-Chantelot C, Velho G, Froguel P (1998) Mutation screening in 18 caucasian families suggests the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 41:1017-23
- 22 Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM (2002) Variabilität im menschlichen Genom. *Dtsch Arztebl* 99: A 3091-3101 [Heft 46]
- 23 Cohen B, Novick D, Rubinstein M (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274: 1185-1188

6. Referenzen

- 24 Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8:1229–31
- 25 Considine RV, Sinha MK, Heiman LM, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295
- 26 Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD (1994) Regulation of adipocyte development. *Ann Rev Nutr* 14:99-129
- 27 Dabels J, Haffarnik H (1996) Krankheiten des Stoffwechsels. In: Stobbe H, Baumann G (Hrsg.) *Innere Medizin*. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden. 7 überarb. und erw. Auflage (1996)
- 28 Dawber TR, Kannel WB (1966) The Framingham Study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 34:553-5
- 29 Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J (1998) A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Gen* 20: 284-87
- 30 DeFronzo RA, Ferrannini E (1991) Insulin resistance - a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194
- 31 Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM, Singer S (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3951-6
- 32 Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W (1993) Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 77,67-77
- 33 Eibl G, Wente MN, Reber HA, Hines OJ (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Bioch Biophys Res Comm* 287:522-529
- 34 Ek J, Urhammer SA, Sørensen TIA, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O (1999) Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 42:892-895
- 35 Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz MD, Moller DE, Berger J (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ 1 and γ 2. *Bioch Biophys Res Comm* 224:431-437

6. Referenzen

- 36 El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR (1999) Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR γ and C/EBP alpha. *J Biol Chem* 274:7946-51
- 37 Evans D, Aberle J, Wendt D, Wolf A, Beisiegel U, Mann WA (2001) A polymorphism, L162V, in the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is associated with lower body mass index in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Mol Med* 79:198-204
- 38 Evans D, de Heer J, Hagemann C, Wendt D, Wolf A, Beisiegel U, Mann WA (2001) Association between the P12A and C1431T polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) gene and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:1-4
- 39 Evans D, Mann WA, de Heer J, Michel U, Wendt D, Bortner K, Wolf A, Beisiegel U (2000) Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) does not play a major role in the development of morbid obesity. *Int J Obesity* 24, 647-51
- 40 Evans D, Wolf AM, Nellessen U, Ahle S, Kortner B, Kuhlmann HW, Beisiegel U (2001) Association between polymorphisms in candidate genes and morbid obesity. *Int J Obesity* 25(1):19-21
- 41 Fajans SS (1990) Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care* 13: 49-64
- 42 Fajas L, Auboeuff D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre A-M, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart J-C, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997) The organisation, promoter analyses, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789
- 43 Fajas L, Debril M-B, Auwerx J (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor γ : from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinology* 27, 1-9
- 44 Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J (1998) PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438(1-2):55-60
- 45 Fielding CJ, Fielding PE (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228
- 46 Foster DW (1991) Diabetes mellitus. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 12. Auflage
- 47 Freake HC (1999) A genetic mutation in PPAR gamma is associated with enhanced fat cell differentiation: implications for human obesity. *Nutr Rev* 57: 154-6
- 48 Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P (2002) Blockstruktur des menschlichen Genoms. *Dtsch Arztebl* 99: A 3190-3195 [Heft 47]

6. Referenzen

- 49 Froguel P, Vaxillaire M, Velho G (1997) Genetic and metabolic heterogeneity of maturity onset diabetes of the young. *Diabetes Rev* 5: 123-30
- 50 Giovanucci E, Willet WC (1994) Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 26:443-452
- 51 Göke R, Göke A, Göke B, Chen Y (2000) Regulation of TRAIL-induced apoptosis by transcription factors. *Cell Immun* 201;77-82
- 52 Green S (1993) Promiscuous liaisons. *Nature* 361: 590-91
- 53 Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T (2002) PPAR gamma F3887L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 51(12):3586-90
- 54 Herold G (1999) Diabetes mellitus. In: *Innere Medizin - eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Hrsg. Herold G, Köln
- 55 Hofman C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM (1994) Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptor during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134: 264-70
- 56 Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : a direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91
- 57 Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR gamma. *Science* 274: 2100-2103
- 58 Hulin B, McCarthy PA, Gibbs EM (1996) *Curr Pharm Des* 2, 85-102
- 59 Inoue K-I, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Kohno M, Yoshimura R, Yoshikawa T, Sano H (2001) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in renal cell carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Bioch Biophys Res Comm* 287:727-732
- 60 Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor subfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650
- 61 Kahle EB, Leibel RL, Domascko DW, Raney SG, Mann KT (1997) Obesity genes and insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci*:827;35-49
- 62 Kawa S, Nikaido T, Unno H, Usuda N, Nakayama K, Kiyosawa K (2002) Growth Inhibition and Differentiation of Pancreatic Cancer Cell Lines by PPAR γ Ligand Troglitazone. *Pancreas* 24:1-7
- 63 Keller CH, Wolfram G, Zöllner N (1996) Fettstoffwechsel; Lipidsenker. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum Verlag, 7. Auflage. Hrsg. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K

6. Referenzen

- 64 Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH (2000) Identification and functional characterization of the peroxisome proliferator response element in rat GLUT2 promoter. *Diabetes* 49:1517-1524
- 65 Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101:1-9
- 66 Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S, Matsuzawa Y (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 90:75-80
- 67 Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358:771-774
- 68 Koch M, Rett K, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU (1999) The PPARgamma2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 42:758-62
- 69 Komers R, Vrana A (1998) Thiazolidinediones--tools for the research of metabolic syndrom X. *Physiol Res* 47:215-225
- 70 Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP (1998) Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58:3344-52
- 71 Künzle H (1994) Aufbau und Verbindungen des Zwischenhirns. In: Benninghoff Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Urban & Schwarzenberg Verlag München Wien Baltimore, 15. Auflage 1994
- 72 Larson MG (1995) Assessment of cardiovascular risk factors in the elderly: the Framingham Heart Study. *Stat Med* 14:1745-56
- 73 Lee SST, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz PM, Fernandez PM, Westphal H, Gonzales FJ (1995) Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15:3012-3022
- 74 Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nature Med* 4:1053-7
- 75 Lefebvre AM, Peinado-Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B (1997) Regulation of lipoprotein metabolism by

6. Referenzen

- thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1756-64
- 76 Lehmann JM, Moore LB, Smith-Olliver TA, Wilkinson WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator - activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 270:12953-12956
- 77 Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, Wahli W (1994) Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J Biol Chem* 269:24527-24530
- 78 Li W-D, Lee JH, Price RA (2000) The peroxisome proliferator-activated receptor PPAR γ 2 Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose. *Mol Gen Metabolism* 70:159-161
- 79 Liebl A, Neiß A, Spannheimer A, Reitberger U, Wagner T, Görtz A (2001) Kosten des Typ -2-Diabetes in Deutschland: Ergebnisse der CODE-2-Studie. *Dtsch Med Wschr* 126: 585-589
- 80 Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J (1998) Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47: 515-22
- 81 Maegawa H, Obata T, Shibata T, Fujita T, Ugi S, Morino K, Nishio Y, Kojima H, Hidaka H, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A (1999) A new antidiabetic agent (JTT-501) rapidly stimulates glucose disposal rates by enhancing insulin signal transduction in skeletal muscle. *Diabetologia* 42:151-159
- 82 Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellese AA, Riccardi G, Colantuoni V (1999) Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 48:1466-8
- 83 Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beaot M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark E, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-9
- 84 Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, Jaiswal R, Beck S, Pittenger MF, Thiede MA, Marshak DR (2000) Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Pathway Inhibits Osteoclast Differentiation. *J Biol Chem* 275:14388-93
- 85 Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Lebel P, Dallongville J, Deeb S, Auwerx J, Amouyel P (1998) A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene influences plasma leptin levels in obese humans. *Hum Mol Gen* 7:435-40
- 86 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215

6. Referenzen

- 87 Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M (2001) The Pro12Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population. Possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:891-894
- 88 Mori Y, Kim-Motoyama H, Katakura T, Yasuda K, Kadowaki H, Beamer BA, Shuldiner AR, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1998) Effect of the Pro12Ala variant of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Bioch Biophys Res Comm* 251:195-8
- 89 Mudaliar S, Henry RR (2001) New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The Glitazones or Insulin Sensitizers. *Annu Rev Med* 52:239-257
- 90 Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPARgamma. *Mol Cell* 1:465-470
- 91 Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou X-P, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human prostate cancer. *Proc Natl Sci USA* 97:10990-10995
- 92 Nwankwo JO, Robbins MEC (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-expression in human malignant and normal brain, breast and prostate-derived cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids* 64:241-245
- 93 Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, Hoshino S, Fujita M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S (1999) Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene: PPAR γ expression in osteoblasts. *Bioch Biophys Res Comm* 260: 122-6
- 94 Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K, Takeuchi Y (1999) Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 140:5060-65
- 95 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-70
- 96 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-9
- 97 Padilla J, Kaur K, Harris SG, Phipps RP (2000) PPAR-gamma-mediated regulation of normal and malignant B lineage cells. *Ann N Y Acad Sci* 905:97-109

6. Referenzen

- 98 Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA (2001) Anticancer effects of Thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 61:6213-8
- 99 Picard F, Auwerx J (2002) PPAR γ and Glucose Homeostasis. *Annu Rev Nutr* 22:167-97
- 100 Qian H, Hausman GJ, Compton MM, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA (1998) Leptin regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, tumor necrosis factor, and uncoupling protein-2 expression in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 29; 146: 660-667
- 101 Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1961) The glucose-fatty acid cycle; its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* I:785-789
- 102 Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA (1998) Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 273:1855-1858
- 103 Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR (1998) Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14751-6
- 104 Ribon V, Printen JA, Hoffman NG, Kay BK, Saltiel AR (1998) A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 18:872-9
- 105 Ringel J, Engeli S, Distler A, Sharma AM (1999) Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor gamma and diabetes mellitus. *Bioch Biophys Res Comm* 254:450-3
- 106 Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR (1998) Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte regulation. *N Engl J Med* 339:953-959
- 107 Rosen ED, Spiegelman BM (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J Clin Invest* 106:629-631
- 108 Rosen ED, Spiegelman BM (2001) PPAR γ : A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem* 276:37731-4
- 109 Saltiel AR, Olefsky JM (1996) Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45:1661-69
- 110 Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nature Med* 4:1046-52

6. Referenzen

- 111 Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MAK, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y (2000) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR γ agonists. *Brit J Cancer* 83:1394-1400
- 112 Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Current opinion in Lipidology* 8:159-166
- 113 Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37:907-925
- 114 Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302:93-109
- 115 Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG (2001) *Handbuch der Stoffwechselstörungen*. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 2. Auflage, Stuttgart
- 116 Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaoga K, Matsuzawa Y (1996) Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Med* 2:800-803
- 117 Smith WM, Zhou X-P, Kurose K, Gao X, Latif F, Kroll T, Sugano K, Cannistra SA, Clinton SK, Maher ER, Prior TW, Eng C (2001) Opposite association of two PPARG variants with cancer: overrepresentation of H449H in endometrial carcinoma cases and underrepresentation of P12A in renal cell carcinoma cases. *Hum Genet* 109:146-151
- 118 Spiegelman BM (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Eur J Med Res* 2:257-264
- 119 Spiegelman BM, Flier JS (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87:377-389
- 120 Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J (1997) The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). *Biochimie* 79:95-99
- 121 Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold O, Gautvick KM (1994) Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state m-RNA level of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty acid-induced transcription. *Eur J Biochem* 225:967-974
- 122 Stenson WF, Cort D, Rodgers J, Burakoff R, DeSchryver-Kecsckemeti K, Gramlich TL, Beeken W (1992) Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 116:609-614

6. Referenzen

- 123Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:292-3
- 124Subramaniam S (1999) The emerging role of thiazolidinediones in the treatment of diabetes-mellitus and related disorders. *Clin Exp Hypertens* 21:121-136
- 125Suter SL, Nolan JJ, Wallace P, Gumbiner B, Olefsky JM (1992) Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 15:193-203
- 126Swarbrick MM, Chapman CML, McQuillan BM, Hung J, Thompson PL, Beilby JP (2001) A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *Eur J Endocrinology* 144:277-282
- 127Takashima T, Fujiwara Y, Higuchi K, Arawaka T, Yano Y, Hasuma T, Otani S (2001) PPAR gamma ligands inhibit growth of human esophageal adenocarcinoma cells through induction of apoptosis, cell cycle arrest and reduction of decarboxylase activity. *Int J Onc* 19:465-471
- 128Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995) PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351-357
- 129Tontonoz P, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156
- 130Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Hla T, Kondo M (2000) Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists through induction of apoptosis. *Bioch Biophys Res Comm* 270:400-405
- 131Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344: 1343-1350.
- 132Unger RH (1997) Leptin and adipogenic diabetes. *Medical Grand Rounds* February 13, 1997
- 133Vidal-Puig A et al (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99: 2416-2422
- 134Vidal-Puig A, Jimenezlinan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman BM, Flier JS, Moller DE (1996) Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97:2553-2561

6. Referenzen

- 135 Wang M, Wise SC, Leff T, Su TZ (1999) Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 48:254-60
- 136 Wang XL, Oosterhof J, Duarte N (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161→T polymorphism and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 44:588-94
- 137 Wasan HS, Novelli M, Bee J, Bodmer WF (1997) Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3308-3313
- 138 Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjørbæk C, Vidal-Puig AJ, Flier JS (1997) Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ). *J Biol Chem* 272, 32:20230-20235
- 139 Wilson TM, Cobb JE; Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM (1996) The structure activity relationship between peroxisome proliferator activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* 39:665-668
- 140 Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3:151-8
- 141 Xia X, Serrero G (1999) Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol* 178:9-16
- 142 Yamanouchi T (1999) [Article in Japanese] [insulin-sensitizing agent]. *Nippon Rinsho* 57:675-80
- 143 Yanase T, Yashiro T, Takitani K, Kato S, Taniguchi S, Takayanagi R, Nawata H (1997) Differential expression of PPAR γ 1 and γ 2 isoforms in human adipose tissue. *Bioch Biophys Res Comm* 233: 320-324
- 144 Yen C-J, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR (1997) Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic caucasians: Identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 missense mutation. *Bioch Biophys Res Comm* 241: 270-74
- 145 Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE (1996) Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor alpha. *Mol Endocrinol* 10:1457-1466
- 146 Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE (1996) Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271:31771-4

6. Referenzen

- 147Zhang B, Szalkowski D, Diaz E, Hayes N, Smith R, Berger J (1994) Potentiation of insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by thiazolidinedione-derived antidiabetic agents in chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors and L6 myotubes. J Biol Chem 269:25735-25741
- 148Zhou X-P, Smith WM, Gimm O, Mueller E, Gao X, Sarraf P, Prior TW, Plass C, von Deimling A, McL Black P, Yates AJ, Eng C (2000) Over-expression of PPAR γ sequence variants in sporadic cases of glioblastoma multiforme: preliminary evidence for common low penetrance modifiers for brain tumor risk in general population. J Med Genet 37:410-414
- 149Ziegler A (2002) Genetische Epidemiologie - Gegenwart und Zukunft. Dtsch Arztebl 99: A2342-2346 [Heft 36]

- 22.04.1975 Geburt in Hamburg
- 1981-1984 Besuch der Grundschule Streng in Hamburg
- 1985-1994 Besuch der Gelehrtenschule des Johanneums, Abitur incl. Graecum, Latinum
- 1994-1995 Zivildienst bei der Deutschen Muskelschwund Hilfe EV
- 1995 Immatrikulation im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
Krankenpflege Praktikum im Allgemeinen Krankenhaus Poppenbüttel
- 1996 Hakenhalter in der ENDO-Klinik (bis 2002)
- 1997 Physikum
Vorpräparand im makroskopischen Kursus des Anatomischen Instituts
- 1998 1. Staatsexamen
Famulatur in der Abteilung Thorax- und Gefäßchirurgie im AK Altona
- 1999 Experimenteller Teil der Dissertation
- 1999-2000 Reise durch Südost-, Süd- und Zentral-Asien, währenddessen Famulatur in Dr. Gangadhara's Shilpa Clinic, Bangalore, India
- 2000 Famulatur in der Neurochirurgischen Klinik, UKE, Hamburg
- 2001 2. Staatsexamen
PJ in der Medical Emergency and Trauma Unit, Groote-Schuur-Hospital und G.F. Jooste Hospital, Cape Town, South Africa
PJ in der Neurochirurgische Klinik, UKE, Hamburg
- 2002 PJ in der I. und II. Chirurgischen Klinik, Marienkrankenhaus, Hamburg
- 2002-2004 AiP in der Abteilung für Neurochirurgie, AK Altona, Hamburg

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Annahme als Doktorand in Ihrem Labor.

Dank an Dr. Dave Evans für die wissenschaftliche Betreuung.

Tausend Dank gilt Dorte Wendt für die zahllosen Tips und Tricks in Wort und Tat während der gesamten Zeit der Dissertation.

Dipl. stat. Volker Schoder aus dem Institut für Mathematik und Datenverarbeitung in der Medizin danke ich für die Hinweise und Korrekturen zur statistischen Auswertung.

Prof. Dr. Lehninger gilt Dank für einen sehr interessanten Vortrag über die Neuromodulation des Sättigungsverhaltens und das Vorkommen von Leptinrezeptoren im Hippocampus.

Allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden, Nico, Dennis Mewawala, Christiane Altenburg, Thomas Grewal, Mahtab Bazargan, Christina Runge und besonders Helga danke ich für die freundliche Aufnahme und die aufmunternden Gespräche.

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.