

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Hamburg

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Die Prävalenz des Met³²⁶Ile Polymorphismus in der
regulatorischen Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase
bei
Typ-2-Diabetes mellitus Patienten**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Simone Brecht
aus
Ettlingen

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

1	EINLEITUNG	3
1.1	<i>Diabetes mellitus</i>	3
1.1.1	Definition	3
1.1.2	Diagnostische Kriterien der American Diabetes Association	4
1.1.3	Pathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus	5
1.1.4	Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus	6
1.1.5	Seltene spezifische Formen des Diabetes mellitus	7
1.1.6	Folgen des Diabetes mellitus	9
1.2	<i>Insulinrezeptor</i>	10
1.2.1	Funktion und Lokalisation	10
1.2.2	Aufbau	11
1.3	<i>Insulin-Rezeptor-Substrate</i>	12
1.4	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>	12
1.4.1	Vorkommen und Funktion	12
1.4.2	Aufbau	13
1.4.3	Isoformen des Adapterproteins p85 α	14
1.4.4	Isoformen der katalytischen Untereinheit	16
1.5	<i>Polymorphismus</i>	16
1.5.1	Definition	16
1.5.2	Polymorphismen in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase	17
1.6	<i>Ziel der Arbeit</i>	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	<i>Material</i>	19
2.1.1	PCR	19
2.1.2	Ethanol f ällung	19
2.1.3	Restriktionsverdau	19
2.1.4	Agarosegelelektrophorese	19
2.1.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	20
2.1.6	Ethidiumbromid f ärbung	20
2.1.7	Technische Geräte	20
2.2	<i>Methoden</i>	21
2.2.1	Polymerasekettenreaktion	21
2.2.2	Agarosegel	24
2.2.3	Verdau des PCR-Produktes mit Restriktionsenzymen	25
2.2.5	An f ärbung von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid	28
2.2.6	Ethanol f ällung	28

3	ERGEBNISSE	30
3.1	<i>Darstellung der Restriktionsbefunde</i>	30
3.2	<i>Patientenkollektiv</i>	33
3.3.1	<i>Allelausprägung des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Diabetes mellitus Typ 2 Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe</i>	34
3.4	<i>Vergleich des Nüchtern-Blutzuckerwertes und des HbA1c-Wertes bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten</i>	35
3.5	<i>Geschlechterverteilung unter den verschiedenen Genotypen</i>	37
3.6	<i>Berechnung der Altersmittelwerte der verschiedenen Genotypen</i>	38
3.7	<i>Berechnung des Body Mass Index</i>	39
3.8	<i>Vergleich der Serumlipide bei den verschiedenen Genotypen</i>	41
4	DISKUSSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	LITERATURVERZEICHNIS	50
6.1	<i>Beitragswerke</i>	50
6.2	<i>Zeitschriften</i>	50
7	ABKÜRZUNGEN	63
8	DANKSAGUNG	65
9	LEBENS LAUF	66
10	ERKLÄRUNG	67

1 Einleitung

1.1 *Diabetes mellitus*

1.1.1 Definition

Unter dem Begriff Diabetes mellitus werden Stoffwechselerkrankungen unterschiedlicher Genese zusammengefasst, die auf einen relativen oder absoluten Insulinmangel zurückzuführen sind. Charakteristisch für die Erkrankung sind dauerhaft erhöhte Glucosekonzentrationen im Plasma (klinisch manifester Diabetes mellitus) oder eine inadäquate Verwertung der zugeführten Glucose (gestörte Glucosetoleranz) (Parhofer et al., 2004).

Nach klinischen Gesichtspunkten wird zwischen Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 unterschieden. Während die Entwicklung zum manifesten Typ-1-Diabetes mellitus bei Kindern und Jugendlichen innerhalb von mehreren Tagen bis Wochen erfolgt, ist der erst im Erwachsenenalter auftretende Typ-2-Diabetes mellitus durch einen schleichenden, oft über Jahre hinweg symptomlosen Verlauf gekennzeichnet, sodass in vielen Fällen erst bei einer Routineuntersuchung erkannte erhöhte Glucosewerte in Blut und Urin zur Diagnose führen. Meist besteht bei seiner Diagnosestellung noch kein allgemeiner Katabolismus des Proteinstoffwechsels oder eine durch den Insulinmangel bedingte Lipidmobilisation. Erst wenn die Erkrankung über einen längeren Zeitraum unerkannt besteht, kommt es mit zunehmendem Ausmaß des Insulinmangels zur klinischen Manifestation der Erkrankung mit schwerwiegenden Schäden an Blutgefäß- und Nervensystem.

Mehr als 95% der in Deutschland lebenden Diabetiker können dem Typ 2 zugeordnet werden. Während die Inzidenzraten bei den an Typ-1-Diabetes Erkrankten weitgehend stabil geblieben sind, nahm die Anzahl der Neuerkrankungen unter den Typ-2-Diabetikern in den letzten Jahren erheblich zu (Berger et al., 2000).

1.1.2 Diagnostische Kriterien der American Diabetes Association

Im Jahr 2006 veröffentlichte die Expertenkommission der American Diabetes Association überarbeitete Kriterien zur Diagnose und Klassifikation des Diabetes mellitus. Diese Kriterien basieren auf epidemiologischen Daten, die einen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und den möglichen Komplikationen des Diabetes mellitus herstellen (American Diabetes Association Expert Committee, 1997; American Diabetes Association, 2006).

Die revidierten Kriterien ermöglichen die Diagnose des Diabetes mellitus auf drei verschiedene Arten:

1. Bestimmung des Nüchtern-Plasma-Glucose-Wertes

Die Bestimmung des Nüchternblutzuckers ist der entscheidende Test zur Diagnose eines Diabetes mellitus. Um dieses diagnostische Kriterium verwenden zu können, muss der Patient nüchtern sein. Nüchternheit bedeutet in diesem Fall, dass er mindestens acht Stunden vor Durchführung der Blutentnahme keine Nahrung bzw. kalorienhaltige Getränke zu sich genommen haben darf.

Die folgende Tabelle zeigt die diagnostischen Richtwerte zur Feststellung eines Diabetes mellitus.

Tab. 1: Laborchemische Kriterien zur Diagnose eines Diabetes mellitus nach Bestimmung des Nüchternblutzuckers

Status	Nüchtern-Plasma-Glucose
Normal	≤ 100 mg/dl
Gestörte Glucose-Homöostase	≥ 100 mg/dl ≤ 126 mg/dl
Diabetes mellitus	≥ 126 mg/dl

2. Oraler Glucosetoleranztest

Nach Messung des Nüchtern-Plasma-Glucose-Wertes nehmen die Patienten eine Testlösung zu sich, die 75 g Glucose enthält. Zwei Stunden nach der Glucoseaufnahme erfolgt die erneute Bestimmung des Blutzuckerspiegels. Drei Tage vor Durchführung des Tests sollten die

Versuchspersonen eine normale Diät mit einem Kohlehydratanteil von mindestens 150 g Kohlehydraten/Tag zu sich nehmen, um Hungerzustände zu vermeiden (Fujita et al., 1975). Mittels nachfolgender Tabelle werden Laborbefunde zur Diagnose eines Diabetes mellitus nach der Durchführung eines oralen Glucosetoleranztests dargestellt.

Tab. 2: Laborchemische Kriterien zur Diagnose eines Diabetes mellitus nach Durchführung eines oralen Glucosetoleranztests

Status	Oraler Glucosetoleranztest
Normal	<140 mg/dl nach 2 Stunden
Gestörte Glucose-Homöostase	≥140 mg/dl < 200 mg/dl nach 2 Stunden
Diabetes mellitus	≥200 mg/dl nach 2 Stunden

- Gelegentlich auftretende Hyperglykämien, die mit klassischen Symptomen assoziiert sind, gelten ebenfalls als diagnostisches Kriterium zur Feststellung eines Diabetes mellitus.

Leiden die Patienten an klassischen Symptomen des Diabetes mellitus wie Polyurie, Polydipsie und/oder einem nicht intendierten Gewichtverlust und werden zusätzlich Gelegenheitsblutzucker von über 200 mg/dl gemessen, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit ein Diabetes mellitus vor.

Unabhängig davon, welches der drei Kriterien zur Diagnose des Diabetes mellitus verwendet wird, muss die Diagnose durch eine wiederholte Bestimmung des Blutzuckers an einem zweiten Tag gesichert werden.

1.1.3 Pathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus

Der Typ-1-Diabetes mellitus manifestiert sich vorwiegend im Kindes- und Jugendalter. Klinisch imponiert die Erkrankung durch das plötzliche Auftreten von Symptomen (Gewichtverlust, Durst, Polydipsie, Polyurie), den Insulinmangel und die Ketoseneigung. Dies führt zu einer lebenslangen Abhängigkeit von täglichen Insulininjektionen.

Charakteristisch für den Typ-1-Diabetes ist eine selektive und irreversible Zerstörung der Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas, die in der Regel zum absoluten Insulinmangel führt (Kolb, 1997). Die Glucagon produzierende α -Zellen und Somatostatin sezernierenden δ -Zellen bleiben jedoch intakt.

Die Ursachen des Typ-1-Diabetes sind bisher weitgehend unbekannt, die weltweit steigende Inzidenz lässt allerdings vermuten, dass Umwelteinflüsse an der Pathogenese beteiligt sind (EURODIAB ACE Study Group 2000). Als auslösende Faktoren werden Infektionen mit pankreotropen Viren (Yoon et al., 1979; Yoon, 1991; Dahlquist et al., 1995) und allergische Reaktionen auf Nahrungsbestandteile (Dahlquist et al., 1991; Karjalainen et al., 1992) diskutiert.

Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas und der Nachweis von Autoantikörpern gegen Inselzellen (ICA), Insulin (IAA), Glutamat-Decarboxylase (GADA) oder Tyrosinphosphatase (IA-2A, IA-2 β A) bei der Mehrzahl der Betroffenen deutet auf das Vorliegen einer autoimmunvermittelten Erkrankung hin (Seissler et al., 1998; Maclaren et al., 1999).

Außerdem wird angenommen, dass eine genetische Disposition bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle spielt. Ungefähr 20% der Typ-1-Diabetiker haben eine positive Familienanamnese und mehr als 90% der Patienten weisen die HLA-Merkmale DR 3 und/oder DR 4 auf (Atkinson et al., 1994). Studien beschreiben, dass der ein- bzw. zweieiige Zwilling eines an Typ-1-Diabetes Erkrankten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als andere Verwandte ersten Grades ebenfalls an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankt (Kyvik et al., 1995; Petersen et al., 1997; Redondo et al., 1999). Auch unterliegen die Nachkommen eines an Typ-1-Diabetes erkrankten Elternteils einem erhöhten Risiko, die Krankheit im Laufe ihres Lebens auszuprägen (Bingley, 1996).

1.1.4 Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

Der Typ-2-Diabetes mellitus ist eine heterogene und komplexe Erkrankung, im Jahr 2002 waren ungefähr 8,7% der Bevölkerung der westlichen Welt von der Krankheit betroffen (American Diabetes Association, 2004). Die Prävalenz bei

Erwachsenen über 60 Jahren liegt zwischen 10 und 20%, andere ethnische Populationen wie die Pima-Indianer und die Nauruans erreichen Werte von nahezu 40% (Harries et al., 1987).

Der Typ-2-Diabetes manifestiert sich mit zunehmendem Alter als Folge einer abnehmenden Zahl von β -Zellen im Pankreas und/oder der Entwicklung einer Insulinresistenz in den Zielorganen Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe. Der früheste feststellbare Defekt und ein Risikofaktor in der Entwicklung des Typ-2-Diabetes mellitus ist die Insulinresistenz, die häufig bereits 15 bis 25 Jahre vor der klinischen Manifestation der Erkrankung auftritt (Reaven, 1988; Lillioja et al., 1993; Kahn 1994). Zunächst wird die Insulinresistenz durch eine gesteigerte Insulinsekretion kompensiert, nach einiger Zeit jedoch kann die Hyperinsulinämie aufgrund der begrenzten Synthese- und Sekretionskapazität pankreatischer β -Zellen nicht mehr aufrechterhalten werden. Zusätzlich bewirkt die Hyperinsulinämie die Verstärkung der Insulinresistenz durch eine Downregulation der Insulinrezeptoren. Die Folge ist ein Anstieg des Blutglucosespiegels und letztendlich der Ausbruch des Diabetes mellitus (Polonsky et al., 1996.).

Es wird vermutet, dass neben Alter, Übergewicht und mangelnder körperlicher Aktivität (Colditz et al., 1995; Haffner, 1998; Choi et al., 2001; American Diabetes Association, 2004) eine genetische Prädisposition bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes eine bedeutende Rolle spielt. Darauf weisen die gehäufte Verbreitung bei Nachkommen der Erkrankten (Rich, 1990; Grannar, 1992; Shaw et al., 1999) und eine erhöhte Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen (Newman et al., 1987; Poulsen et al., 1999; Medici et al., 1999) hin. Zwar wurden Mutationen im Insulinrezeptor-Gen (Permutt et al., 1991; Kishimoto et al., 1992) in seltenen schweren Fällen einer Insulinresistenz identifiziert, jedoch sind trotz intensiver Forschung die für die Entwicklung des häufig auftretenden Typ-2-Diabetes mellitus verantwortlichen Gene bislang unbekannt.

1.1.5 Seltene spezifische Formen des Diabetes mellitus

Obgleich die Insulinresistenz ein wichtiges Merkmal in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes ist, sind Mutationen im Insulinrezeptor-Gen extrem selten und in der

Regel mit Syndromen schwerster Insulinresistenz assoziiert (Taylor, 1991). Es wird vermutet, dass etwa 0,1 bis 1% der Bevölkerung heterozygote Träger einer Mutation im Insulinrezeptor-Gen sind (Taylor, 1992). Zwei typische klinische Befunde bei allen Syndromen, die mit schwerster Insulinresistenz einhergehen, sind die Akanthosis nigricans und der Hyperandrogenismus bei weiblichen Patienten. Neben der Typ-A-Insulinresistenz, die durch die Trias Insulinresistenz, Akanthosis nigricans und Hyperandrogenismus definiert wird (Kahn, 1976), werden das Rabson-Mendenhall Syndrom, eine Variante des Typ-A-Syndroms, der Leprechaunismus und die unterschiedlichen Arten der Lipodystrophie zu diesen genetischen Defekten gezählt.

Ebenfalls eine seltene Variante ist der Maturity onset diabetes of the young (MODY), von dem bisher sechs verschiedene Unterformen identifiziert wurden. Die Krankheit tritt weltweit auf, die Prävalenz unter den Typ-2-Diabetikern wird auf 2 bis 5% geschätzt (Froguel, 1993; Ledermann, 1995). Primär liegen der Erkrankung genetisch heterogene Defekte der β -Zellfunktion zugrunde, die letztendlich zu einer Störung der Insulinsekretion mit konsekutivem Insulinmangel führen. Alle bisher beschriebenen Varianten werden autosomal dominant vererbt, charakteristisch ist die klinische Manifestation vor dem 25. Lebensjahr (Fajans, 1989). Bis dato wurden diverse Mutationen, die für das Auftreten des MODY verantwortlich sind, gefunden. So liegt bei MODY 1 eine Nonsensemutation des HNF 4 α (hepatic nuclear factor 4 α) auf Chromosom 20 mit inkompletter Penetranz vor (Bell et al., 1991; Yamagata et al., 1996). MODY 2 ist auf eine Nonsensemutation des Glukokinase-Gens auf Chromosom 7 zurückzuführen (Froguel, 1993; Vionnet, 1992). Weitere Mutationen wurden für MODY 3 (HNF 1 α , Chromosom 12) (Vaxillaire, 1995; Yamagata, 1996), MODY 4 (Insulin promotor factor-1, Chromosom 13) (Stoffers, 1997), MODY 5 (HNF 1 β , Chromosom 17) (Horikawa et al., 1997) und MODY 6 (NEUROD1) (Malecki, 1999) beschrieben.

1.1.6 Folgen des Diabetes mellitus

Der Verlauf des Diabetes mellitus wird entscheidend durch die Spätkomplikationen bestimmt, die sich bevorzugt an den großen Blutgefäßen, Nieren, Augen und Nerven manifestieren.

Makroangiopathien mit Früharteriosklerose gelten als führende Ursache von Sterblichkeit und Morbidität unter den Diabetes mellitus Patienten (Laakso, 1999; Morrish et al., 2001). Diverse Studien weisen darauf hin, dass das Risiko für Patienten mit Diabetes mellitus, eine koronare Herzkrankheit, eine periphere arterielle Verschlusskrankheit oder einen ischämischen Hirninfarkt zu erleiden, im Vergleich zu Nichterkrankten signifikant erhöht ist (Laakso et al., 1997; Haffner et al., 1998). Gleichzeitig vorhandene Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Zigarettenrauchen steigern die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen zusätzlich (Eastman et al., 1997, Fuller et al., 2001).

Ebenfalls prognostisch ungünstig wirkt sich die diabetesspezifische Mikroangiopathie aus. Sie ist mit einer Verdickung kapillarer Basalmembranen assoziiert und befällt die kleinen Blutgefäße des gesamten Körpers. Vorrangig betroffen sind Retina, renale Glomeruli und Nervenscheiden. Eine durch die Blutzuckererhöhung bedingte nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen der Basalmembranen spielt vermutlich eine Rolle bei der Entstehung. Lösliche Faktoren wie AGEs (advanced glycation end products) (Rumple et al., 1997), Angiotensin II (Allen et al., 1997), Endotheline und Wachstumsfaktoren (Gilbert et al., 1998) sind an der Pathogenese beteiligt.

Der Diabetes mellitus ist die häufigste Ursache von Erblindungen in der Altersgruppe der 30- bis 60-jährigen in den westlichen Industrieländern (Aiello et al., 1998). In der Mehrzahl der Fälle basiert der Verlust des Sehvermögens auf einer diabetischen Retinopathie oder einer Makulopathie. Die proliferative diabetische Retinopathie tritt bei 25% der Typ-2-Diabetiker nach einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von 15 Jahren auf, ihr Vorkommen korreliert mit Ausmaß und Dauer der Hyperglykämie (Klein et al., 1989). Etwa 15% Prozent aller Diabetes-Patienten entwickeln nach 15 bis 20 Erkrankungsjahren ein klinisch signifikantes Makulaödem (Ferris et al., 1999).

Als Hauptursache des terminalen Nierenversagens in der westlichen Welt gilt heute die diabetische Nephropathie (Cooper, 1998). Initiale Funktionsstörung der diabetischen Niere ist eine renale Hypertrophie, die mit einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate und Hyperperfusion einhergeht. Im weiteren Verlauf kommt es zu morphologischen Veränderungen wie Zunahme der extrazellulären Matrix, Hypertrophie der glomerulären Basalmembran und Proliferation des Mesangiums.

Eine diabetische Neuropathie tritt als Spätkomplikation bei etwa 50% der Typ-1- und Typ-2-Diabetiker auf. Das Spektrum der neuropathischen Schädigung umfasst nahezu alle Abschnitte des peripheren und autonomen Nervensystems. Manifestationsformen sind, neben der distal symmetrischen Polyneuropathie, die Mononeuropathie und/oder die autonome Neuropathie. Das Auftreten der diabetischen Neuropathie korreliert mit der Erkrankungsdauer und der Güte der Stoffwechseleinstellung (Powers 2003)

Wie auch bei der diabetischen Makroangiopathie zählen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, erhöhter arterieller Blutdruck und Zigarettenrauchen zu den signifikanten Prediktoren einer diabetischen Retinopathie, Nephropathie und/oder Neuropathie (Lee et al., 2001; Eliasson, 2003).

1.2 *Insulinrezeptor*

1.2.1 Funktion und Lokalisation

Insulin bindet an spezifische Rezeptoren auf der Membranoberfläche seiner Zielzellen. In Leber, Fettgewebe und Muskel bewirkt die Insulinbindung an den Rezeptor eine biologische Antwort, die einen erhöhten Glucosetransport in die Zielzellen und eine vermehrte Glykogen- und Lipidsynthese zur Folge hat. Als Wachstumsfaktor beeinflusst das Insulin Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Taub et al., 1987).

Insulinrezeptoren sind nahezu in allen Geweben der Wirbeltiere vorhanden, ihre Anzahl in den verschiedenen Geweben variiert stark. Es befinden sich etwa

40 Rezeptoren auf einem zirkulierenden Erythrozyten und über 200 auf der Oberfläche eines Adipozyten oder Hepatozyten.

Das Gen für den Insulinrezeptor ist beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 lokalisiert, es verfügt über eine Länge von etwa 150 Kilobasen (kb) und enthält 22 Exons, die für eine 4,2 kb schwere c-DNA codieren (Seino et al., 1990).

1.2.2 Aufbau

Der Insulinrezeptor ist ein tetramerisches Glykoprotein, das aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten besteht. Er verfügt wie die Rezeptoren des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und des Thrombozytenwachstumsfaktors (PDGF) über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität (Kahn et al., 1988; Olefsky et al., 1990; de Fronzo et al., 1992).

Die α -Untereinheiten sind direkt an der Insulinbindung beteiligt, sie dehnen sich extrazellulär aus und verfügen über ein Molekulargewicht von 135 Kilodalton (kDa). Mittels Disulfidbrücken sind sie mit den β -Untereinheiten des Rezeptors verbunden (Häring, 1991).

Die 95 kDa schweren β -Untereinheiten, transmembranöse Proteine, enthalten eine Tyrosinkinase, die durch die Insulinbindung an den α -Untereinheiten intakter Zellen an Tyrosin-, Serin- und Threoninresten autophosphoryliert und somit aktiviert wird (Kasuga et al., 1982; Häring et al., 1990). Unterbleibt die Insulinbindung an die α -Untereinheiten, wird die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheiten gehemmt und der Insulinrezeptor verliert seine Fähigkeit, Stoffwechsel- und Wachstumseffekte zu vermitteln (Wilden et al., 1992; Wilden et al., 1992a; White et al., 1994). Die Autophosphorylierung ermöglicht die Interaktion des Insulinrezeptors mit verschiedenen intrazellulären Substraten, wie zum Beispiel den Insulin-Rezeptor-Substraten, die nach der Insulinstimulation des Rezeptors an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden und als Ankopplungsproteine für verschiedene Effektorproteine dienen.

1.3 Insulin-Rezeptor-Substrate

Bislang wurden sechs verschiedene Insulin-Rezeptor-Substrate identifiziert: IRS-1 (Sun et al., 1991), IRS-2 (Sun et al., 1995), IRS-3 (Lavan et al., 1997), IRS-4 (Lavan et al., 1997), IRS-5 und IRS-6 (Cai et al., 2003).

Das IRS-1 ist ein in vielen Geweben vorkommendes zytoplasmatisches Protein mit einem Molekulargewicht 131 kDa (Kahn, 1994). Es enthält über 22 mögliche Tyrosinphosphorylierungsstellen (Sun et al., 1991; White et al., 1994), neun davon verfügen über eine von zwei sich wiederholenden Aminosäure-Sequenzen, entweder Tyrosin-X-X-Methionin (YXXM) oder Tyrosin-Methionin-X-Methionin (YMXM) (Sun 1991; Shoelson et al., 1992). Die Insulinstimulation des Insulinrezeptors bewirkt die Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste des IRS-1. Durch die Phosphorylierung wird eine Konformationsänderung des IRS-1 induziert, wodurch spezifische intrazelluläre Proteine über nichtkovalente Wechselwirkungen gebunden werden können. Die Bindung erfolgt zwischen den phosphorylierten Sequenzen des IRS-1 und den *src* homology 2 (SH2)-Domänen von multiplen Signalproteinen (White et al., 1994). Bis dato wurden über 20 verschiedene Arten von SH2-Domänen enthaltenden Proteinen gefunden. Die Aktivierung dieser Proteine und die anschließende Mobilisierung weiterer Moleküle intrazellulärer Signalkaskaden führt zu den unterschiedlichen Insulineffekten.

1.4 Phosphatidylinositol 3-Kinase

1.4.1 Vorkommen und Funktion

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) übernimmt als Signalmolekül eine Schlüsselrolle im Insulin vermittelten Glucostransport (Okada et al., 1994; Yeh et al., 1995 ; Shepherd et al., 1997).

PI 3-Kinase-Aktivität konnte bisher in Immunprecipitaten des Oncoproteins pp60^{v-src} und pp68^{v-ros} (Sugimoto et al., 1984; Macara et al., 1984), in Immunprecipitaten des Polyomavirus middle-T Antigen/pp60 Komplexes (Whitman et al., 1985; Whitman et al., 1987) und in etlichen Rezeptoren mit

Tyrosinkinaseaktivität, einschließlich den Rezeptoren für den Thrombozytenwachstumsfaktor (Kaplan et al., 1987) und des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) (Bjorge et al., 1990), und in den Insulinrezeptoren (Endemann et al., 1990) nachgewiesen werden.

In der Insulinsignalkaskade erfolgt die Aktivierung der PI 3-Kinase hauptsächlich über eine Bindung an das insulinstimulierte IRS-1 (Ruderman et al., 1990; Folli et al., 1992; Shepherd et al., 1998) in geringem Maße bewirkt auch eine direkte Interaktion mit dem tyrosinphosphorylierten Insulinrezeptor eine Erhöhung der Enzymaktivität (Van Horn et al., 1994).

Das Enzym phosphoryliert zelluläre Phosphoinositide an der D-3 Position des Inositolrings und führt so zur Erzeugung der phosphorylierten Lipidprodukte Phosphatidylinositol-3-Monophosphat, Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat, die als 2nd messenger dienen (Vanhaesbroeck et al., 1997; Whitman et al., 1988). Zusätzlich ist die PI 3-Kinase an der Regulation multipler Zellfunktionen beteiligt. Hierzu gehören neben dem Recycling basaler Glucosetransporter und der Antilipolyse (Okada et al., 1994), die Glykogen-, Lipid-, und Proteinsynthese (Shepard et al., 1996; Holman et al., 1997), die Mitogenese und die Aktivierung der Insulin abhängigen p70 S6-Kinase (Cheatham et al., 1994).

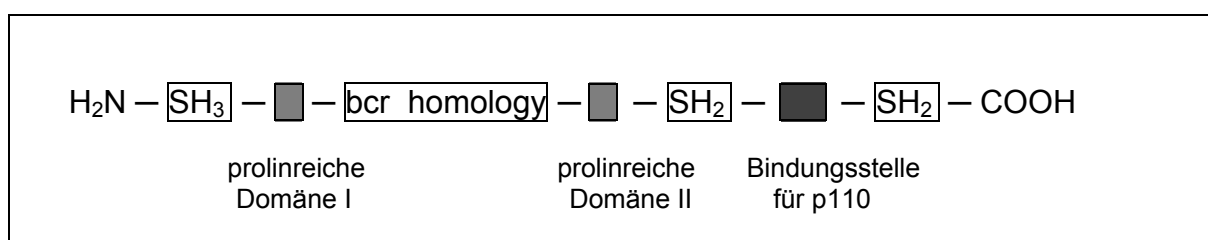
Von großer Bedeutung für die optimale Signalübermittlung der PI 3-Kinase ist ein molekulares Gleichgewicht ihrer beiden Untereinheiten. Ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischer und katalytischer Untereinheit kann entscheidende Auswirkungen auf die Signalübermittlung in der Insulinkaskade haben und das Überleben und den Metabolismus von Zellen bedeutend beeinflussen (Ueki et al., 2002).

1.4.2 Aufbau

Die PI 3-Kinase ist ein Heterodimer (Carpenter et al., 1990), das aus einem 85 kDa schweren Adapterprotein (p85) und einer 110 kDa schweren katalytischen (p110) Untereinheit besteht (Escobedo et al., 1991; Otsu et al., 1991; Gout et al., 1992).

Das Adapterprotein p85 α enthält zwei src homology 2 (SH2)-Domänen und eine src homology 3 (SH3)-Domäne, die ihre Regulation und Aktivität bestimmen (Skolnik et al., 1991; Otsu et al., 1991; Carpenter et al., 1993). Die SH2-Domänen befinden sich im Zentrum und am c-terminalen Ende des Moleküls. Sie ermöglichen die Interaktion der PI 3-Kinase mit spezifischen tyrosin-phosphorylierten YXXM- bzw. YMXM-Motiven des durch Insulin stimulierten IRS-Moleküls sowie mit diversen Wachstumsfaktoren, was letztendlich zu einer Aktivierung der PI 3-Kinase führt (Escobedo et al., 1991; Fry et al., 1992; White et al., 1994). Am n-terminalen Ende des Moleküls ist eine SH3-Domäne lokalisiert, deren genaue Funktion noch unbekannt ist. Bisher konnten Wechselwirkungen der SH3-Domäne mit spezifischen prolinreichen Sequenzen von p85 α nachgewiesen werden, die an der Regulation der intrinsischen Aktivität von p110 beteiligt sein könnten (Cohen et al., 1995). Der zwischen den beiden SH2-Domänen gelegene Bereich des Enzyms enthält die Bindungsstelle für die katalytische Untereinheit (p110) (Skolnik et al., 1991; Hiles et al., 1992), die Region zwischen der SH3-Domäne und der weiter n-terminal gelegenen SH2-Domäne bildet die breakpoint cluster gene (BCR) homology Region. Sie wird von zwei prolinreichen Domänen umgeben.

Abb.1: Aufbau der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase (p85 α)



(Modifizierte Abbildung nach: Shepard et al., 1998; Algenstedt et al., 2004)

1.4.3 Isoformen des Adapterproteins p85 α

Gegenwärtig werden fünf Isoformen der regulatorischen Untereinheit von p85 α unterschieden: das 85 kDa Protein p85 β , die beiden 55 kDa Proteine p55 α (p85/AS53) und p55 γ /p55^{PIK} und das 46 kDa Protein p50 α . Alle bisher bekannten

Isoformen werden in verschiedenen Geweben exprimiert und reagieren auf die Insulinstimulation mit unterschiedlich stark ausgeprägter Aktivität ihrer assoziierten PI 3-Kinase.

Die Variante p85 β weist bezüglich ihrer Sequenz und Struktur große Übereinstimmung mit p85 α auf, wird aber durch ein anderes Gen codiert. Wie das Adapterprotein p85 α enthält sie neben den src-homology Regionen SH2 und SH3 zwei prolinreiche Sequenzen und eine bcr homology Domäne (Otsu et al., 1991; Gout et al., 1992).

Die alternativen Genprodukte p55 α (p85/AS53) und p55 γ /p55^{PIK} besitzen wie p85 α zwei SH2-Domänen und eine inter-SH2-Domäne. Den Varianten fehlt jedoch die SH3-Domäne und die BCR homology Region. Während bei p55 α diese Abschnitte durch eine 34 Aminosäuren lange Sequenz am n-terminalen Ende der Untereinheit ersetzt werden, verfügt p55 γ /p55^{PIK} am NH₂-Terminus über einen aus 30 Aminosäuren bestehenden Rest, dem eine prolinreiche Sequenz und die zwei SH2-Domänen folgen. Außerdem sind 16 von 34 Aminosäuren der beiden Peptide identisch. Während p55 α (p85/AS53) in Skelettmuskel, Herzmuskel und Gehirn vorkommt (Antonetti et al., 1996; Inukai et al., 1996), wird p55 γ /p55^{PIK} überwiegend in Gehirn und Testis exprimiert (Pons et al., 1995).

Bei der Spleißvarianten p50 α sind weder die SH3-Domäne noch die BCR homology Region vorhanden. Das n-terminale Ende des Peptids wird durch eine aus sechs Aminosäuren bestehenden Sequenz gebildet. Diese Isoform lässt sich in Gehirn, Leber, Muskel und Niere nachweisen (Fruman et al., 1996; Inukai et al., 1997).

Bislang ist noch nicht geklärt, inwieweit die verschiedenen Isoformen des Adapterproteins eine voneinander unabhängige oder überlappende Funktion bei der intrazellulären Signalkaskade übernehmen. Vermutlich wird die Spezifität des PI 3-Kinase Systems durch die als Reaktion auf die Aktivierung der verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen folgende Rekrutierung der jeweiligen Adapter-Untereinheiten bestimmt.

1.4.4 Isoformen der katalytischen Untereinheit

Die katalytischen Untereinheiten der PI 3-Kinase können bezüglich ihrer Struktur, *in vitro* Lipidsubstratspezifität und Regulationsmodalitäten in drei Klassen (I_A und I_B, II und III) unterteilt werden (Vanhaesebroeck et al., 1997; Fruman et al., 1998; Wymann et al., 1998).

Die Klasse I PI 3-Kinasen phosphorylieren Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol-4-Phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in die entsprechenden 3' phosphorylierten Derivate.

Klasse I_A Enzyme bestehen aus einer 110 bis 120 kDa schweren Untereinheit, die mit einem zwei SH2-Domänen enthaltenden Adapterprotein assoziiert ist (p85 α , p85 β und p55 γ) (Vanhaesebroeck et al., 1999). Vertreter dieser Gruppe sind p110 α , p110 β und p110 δ (Hiles et al., 1992; Hu et al., 1993; Vanhaesebroeck et al., 1997), wovon aber nur die Untereinheiten p110 α und p110 β in insulinempfindlichen Geweben vorhanden sind (Sheperd et al., 1997). Insulin stimuliert über das Adaptermolekül p85 ausschließlich Klasse I_A-Kinasen (Melendez et al., 1998). Zur Klasse der I_B-Kinasen gehört p110 γ , eine G-Protein aktivierte Form der PI 3-Kinase, die nicht von einer 85 kDa Untereinheit abhängig ist (Vanhaesebroeck et al., 1997).

Die Klasse II PI 3-Kinasen phosphorylieren Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositolphosphate, aber kein Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (Virbasius et al., 1996; Molz et al., 1996), Klasse III Enzyme verfügen dagegen nur über eine auf Phosphatidylinositol begrenzte Substratspezifität.

1.5 Polymorphismus

1.5.1 Definition

Genetische Polymorphismen sind durch Mutationen entstandene Unterschiede in der Nukleotidsequenz homologer DNA-Bereiche. Dabei kommen zeitgleich mindestens zwei Phänotypen bezüglich des Merkmals vor, die auf mindestens zwei Genotypen zurückzuführen sind. Das Allel eines Gens bzw. der Genlokus tritt

in diesem Fall mit einer Häufigkeit von mehr als 1% in der Population auf (Hildebrandt et al., 2002), bei einer geringeren Prävalenz spricht man von einer seltenen genetischen Variante. Die Neumutation kann sowohl somatische Zellen als auch die Zellen der Keimbahn betreffen. Nur wenn die Fortpflanzungsfähigkeit des Individuums durch die Mutation nicht in Mitleidenschaft gezogen wurde, folgt die Verbreitung des Polymorphismus in der Population.

1.5.2 Polymorphismen in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase

Es wird vermutet, dass neben Alter, Adipositas und mangelnder körperlicher Aktivität eine genetische Prädisposition bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes eine bedeutende Rolle spielt. Trotz intensiver Forschung sind die für die Manifestation des Typ-2-Diabetes verantwortlichen Gene bislang unbekannt. Nur in ganz seltenen Fällen liegen Mutationen im Insulinrezeptor-Gen der Entwicklung der Insulinresistenz zugrunde (Tayler et al., 1992).

Auch deuten einige Forschungsergebnisse darauf hin, dass die beeinträchtigte Aktivität der PI 3-Kinase Aktivität in kultivierten dermalen Fibroblasten von Patienten mit schwerster Insulinresistenz auf einen Defekt des PI 3-Kinase Gens zurückzuführen sein könnte (Flier et al., 1980; Dib et al., 1998; Kausch et al., 1999).

Bis dato werden folgende Polymorphismen im Gen für p85 α in der Literatur beschrieben: In einer dänischen Studie konnte eine seltene Variante (Guanin \rightarrow Adenin) an Nukleotid 1020 der Desoxyribonukleinsäure (DNA) identifiziert werden. Die Missensemutation hat den Austausch von Methionin gegen Isoleucin an Codon 326 der regulatorischen Untereinheit von p85 α zufolge. Vermutet wird, dass die Met³²⁶Ile Variante zu einer Abnahme der Bindungskapazität zwischen der regulatorischen Untereinheit und Insulinrezeptor-Substraten führt, die letztendlich mit einer verminderten Glucosetoleranz und somit mit der Entstehung eines Typ-2-Diabetes mellitus in Zusammenhang zu bringen sein könnte (Hansen et al., 1997).

Identifiziert wurde ebenfalls eine seltene heterozygote Missensmutation (Arg⁴⁰⁹Gln) bei einer 23-jährigen britischen Kaukasierin mit Merkmalen einer Typ A Insulinresistenz, die bereits als Teenager Hirsutismus, Oligomenorrhö und eine

beeinträchtigte Glucosetoleranz entwickelte. Diese Variante geht mit einer eingeschränkten Insulin stimulierten PI 3-Kinase-Aktivität einher und könnte die mögliche Ursache eines Falles von Insulinresistenz in einer britischen Familie sein (Baynes et al., 2000).

1.6 Ziel der Arbeit

Angesichts dieses Wissenstandes ergibt sich die Frage, ob sich die Häufigkeit des Auftretens des Met³²⁶Ile Polymorphismus in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase bei Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus im Vergleich zu Nichterkrankten signifikant unterscheidet und ob der genetische Defekt mit einer Insulinresistenz bzw. der Entstehung des Typ-2-Diabetes mellitus assoziiert ist.

Zur Beantwortung der Frage wird nun eine Assoziationsstudie durchgeführt. Diese soll die Prävalenz des Met³²⁶Ile Varianten an Codon 326 der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase bei Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und einer Kontrollgruppe ermitteln und aufzeigen, ob es tatsächlich einen Zusammenhang zwischen dem Met³²⁶Ile Polymorphismus und dem vermehrten Vorkommen des Typ-2-Diabetes mellitus gibt bzw. ob sich die Häufigkeit des Auftretens der Variante bei Erkrankten und Nichterkrankten bedeutend unterscheidet. Des Weiteren wird der Einfluss der Varianten auf den Body Mass Index und die Serumlipide der untersuchten Probanden ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Materialien wurden in per analysis Qualität verwendet.

2.1.1 PCR

- Vorwärts-Primer (5'- GTAGCCAACAACGGTATGAATAACCATAT)
- Rückwärts-Primer (5'-AATGGAACTTAGCAAGCTGGTGCT)
- Taq-DNA-Polymerase (1 Unit/µl) (Boeringer, Mannheim)
- 10 x Reaktionspuffer (1,0 ml Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl, pH 8,3) (Boeringer, Mannheim) 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu gleichen Anteilen) (Pharmazia, Freiburg)
- 10% DMSO
- Mineralöl (Sigma)
- Reaktionsgefäße 0,5 µl safe ware (Eppendorf)

2.1.2 Ethanolfällung

- Ethanol (absolut) (Merck, Darmstadt)
- 3 M Natrium- Acetat (Merck, Darmstadt)

2.1.3 Restriktionsverdau

- Restriktionsendonuklease Nde I (20 000 Units/ml) (New England BioLabs, Inc.)
- 10 x NEB Puffer 4 (New England BioLabs, Inc.)

2.1.4 Agarosegelelektrophorese

- Agarose (Sigma)
- Gelkammer (Biometra)
- Elektrophoresekammer (Biometra)

2.1.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

- 40% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1) (Appligene)
- 1% Ammoniumpersulfat (Serva)
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
- 1 x TBE
- Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
- Glycerol (Merck, Darmstadt)
- 1 kb DNA-Leiter (1 µl/ng) (Boeringer, Mannheim)
- Glasplatten (Desaga)
- Elektrophoresekammer (Biometra)

2.1.6 Ethidiumbromidfärbung

- 10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)

2.1.7 Technische Geräte

- Trio-Thermoblock (Biometra)
- Netzgerät (Biometra)
- Ika-Vibrax-VXR (Elektronika)
- Inkubator (Heraeus)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)
- UV-Transluminator (Biometra)

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Prinzip:

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Sequenzen eines Ausgangsmaterials in vitro millionenfach vervielfältigt werden. Für die PCR wird nur eine sehr geringe DNA-Menge benötigt. In der Regel genügt weniger als 1 µg der gesamten genomischen DNA als Ausgangsmaterial. Die Amplifikation der DNA mittels PCR verläuft ähnlich wie die natürliche Replikation.

Der erste Schritt der Reaktionskette ist die thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNA-Doppelhelix bei 95°C. Durch die Absenkung der Temperatur, zum Beispiel auf 57°C (Annealing-Temperatur), erfolgt die Hybridisierung der sequenzspezifischen Primer (synthetische Oligonukleotide aus etwa 15 bis 30 Nukleotiden) an die komplementären Basensequenzen der einzelsträngigen DNA (Annealing). Die folgende Temperaturerhöhung auf 72°C ermöglicht der Taq-Polymerase die DNA-Synthese durch Anheftung von Desoxynuklotiden an die 3'-OH-Gruppen der Primer. Das hitzestabile Enzym polymerisiert DNA-Stränge in 5' – 3' Richtung komplementär zu der jeweiligen DNA-Matrize (Elongation). Das anschließende Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 95°C bewirkt die Trennung der neu synthetisierten DNA-Doppelstränge.

Jeder Reaktionszyklus, bestehend aus Trennung der Doppelhelix, Primerhybridisierung und DNA-Synthese mittels Taq-Polymerase, wiederholt sich im Verlauf der PCR 30-40 mal. Temperatur, Anzahl und Dauer der verschiedenen Zyklen können in einem elektronischen PCR-Gerät (Thermocycler) programmiert werden.

Durchführung:

Um eine Kontamination des PCR-Ansatzes mit fremder DNA zu vermeiden, erfolgte die Herstellung des Master Mixes für 20 Reaktionsansätze in einem

eigens dafür bestimmten Raum unter einer sterilen Werkbank. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus

- 282 µl H₂O
- 40 µl 10 x Reaktionspuffer
- 10 µl dNTP
- 20 µl Vorwärtsprimer
- 20 µl Rückwärtsprimer
- 8 µl Taq-Polymerase

zusammen. Anschließend wurden in 19 Reaktionsgefäße jeweils 19 µl des Premixes pipettiert.

Nach einem Wechsel des Labors erfolgte die Zugabe von jeweils 1 µl der bei 4°C gelagerten genomischen DNA bzw. Mutanten DNA in 18 Reaktionsgefäße. Von der genomischen DNA wurden zwischen 50 ng und 200 ng zur Amplifikation eingestzt. Als Negativkontrolle für Verunreinigungen wurde in das 19. Reaktionsgefäß statt 1 µl DNA 1 µl autoklaviertes H₂O gegeben. Zur Vermeidung von Kondensation und Temperaturverzügen während der Amplifikation wurden alle Proben mit 50 µl Mineralöl beschichtet.

Nach Platzierung der Reaktionsbehälter im Thermocycler wurden folgende Zyklen durchlaufen:

- 1 Zyklus Denaturierung: 5 Min. bei 95°C
 Annealing: 1 Min. bei 57°C
 Elongation: 1 Min. bei 72°C

- 34 Zyklen Denaturierung: 1 Min. bei 95°C
 Annealing: 1 Min. bei 57°C
 Elongation: 1 Min. bei 72°C

- 1 Zyklus Denaturierung: 1 Min. bei 95°C
 Annealing: 1 Min. bei 57°C
 Elongation: 10 Min. bei 72°C

Nach Beendigung der PCR wurde die amplifizierte DNA bis zur ihrer weiteren Verarbeitung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Besonderheit:

Da das PCR-Produkt der zu amplifizierenden DNA keine Schnittstelle für bisher bekannte Restriktionsenzyme aufwies, musste mittels PCR zunächst eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym eingeführt werden. Ziel war es, dass beide Allele durch die Bildung der Schnittstelle erkannt werden, ohne dass einer der beiden Primer diskriminiert.

Die Schaffung der künstlichen Restriktionsstelle erfolgte mittels Konstruktion eines Primers, der eine Fehlpaarungsstelle enthält. Diese durfte die Hybridisierung am DNA-Strang nicht behindern, so dass eine Amplifizierung der normalen als auch der mutierten DNA-Sequenz erfolgen konnte. Aus diesem Grund wurde in den Vorwärtsprimer eine Basenmutation eingefügt, die im Laufe der PCR amplifiziert wurde, und somit eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Nde I geschaffen.

Abb.2: Olinukleotidsequenzen für die DNA-Primer und Sequenz des PCR-Produktes

<p>Genomische DNA:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ GTAGCCAACAACGGTATGAATAACAATATGTCCTTACAAAATGCTGAAT
<p>Vorwärtsprimer:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 5'- GTAGCCAACAACGGTATGAATAAC<u>C</u>ATAT - 3' <p style="text-align: center;"><i>Basenmutation</i></p>
<p>Rückwärtsprimer:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 5'- AATGGAAGCTTAGCAAGCTGGTGCT - 3'
<p>PCR Produkt:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ GTAGCCAACAACGGTATGAATAAC<u>C</u>ATATGTCCTTACAAAATGCTGAAT <p style="text-align: center;"><i>Schnittstelle für Nde I</i></p>

Im ersten PCR-Zyklus enthielt jedes Template noch die ursprüngliche Basensequenz der genomischen bzw. der Mutanten DNA. Im nächsten Zyklus lagen in der bereits amplifizierten DNA zu gleichen Anteilen die ursprüngliche Basenfolge der DNA und die mutierte Basensequenz des Vorwärtsprimers vor. Im weiteren Verlauf der PCR nahm der Anteil der durch den Primer veränderten Basensequenz immer weiter zu, da keine genomische DNA bzw. Mutanten DNA mehr synthetisiert wurde.

2.2.2 Agarosegel

Prinzip:

Agarose ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid. Sie geliert nach Aufkochen in H₂O oder Pufferlösung und bildet Polysaccharid-Sol Doppelhelices aus, die sich zusammenlagern und ein Netzwerk bilden. Agarosegele eignen sich gut zur Trennung und Identifikation von DNA-Fragmenten, mit einem 2% Gel können DNA-Sequenzen mit einer Länge von 0,1 bis 2 Kilobasen (kb) getrennt werden. Wird ein elektrisches Feld an ein mit DNS-Proben beladenes Agarosegel angelegt, wandern die negativ geladene DNA-Moleküle durch die Poren des Agarosegels. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Fragmentlänge abhängig: kleinere Moleküle durchdringen das Gel schneller als Große.

Durchführung:

Um sicherzustellen, dass während der PCR eine ausreichende Menge des spezifischen Produktes synthetisiert wurde, wurde mittels Agarosegel die Amplifikation überprüft.

Zur Herstellung des Agarosegels wurden zunächst 2 g Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 98 ml H₂O gelöst. Danach wurde die Lösung in eine horizontal liegende rechteckige Kunststoffform gegossen und ein Gelkamm als Schablone für 20 Probetaschen eingesetzt. Nach Abkühlung und Gelierung der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und die Kunststoffform in eine Gelkammer überführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE in die Gelkammer gegossen.

In einem nächsten Schritt wurden für 18 Proben jeweils 4 µl eines spezifischen PCR-Produktes mit 2 µl Ladungspuffer (Ansatz aus:

- 500 µl Bromphenolblau
- 400 µl Glycerol 40%
- 100 µl 1 x TBE)

versetzt, um eine Diffusion der aufgetragenen Proben aus den Geltaschen zu vermeiden. Es folgte die Beladung des Gels mit den 18 Proben. Zusätzlich wurde die Negativkontrolle zum Ausschluss einer möglichen Kontamination der PCR-Produkte in eine Geltasche gegeben. In die äußerste Tasche wurde als DNA-Größenstandard 2 µl eines Ansatzes aus

- 25 µl KB-Leiter (1 µl/ng)
- 50 µl Ladungspuffer
- ad 175 µl H₂O)

aufgetragen, um die Zuordnung der Proben zu gewährleisten. Die Gelelektrophorese erfolgte über 50 Min. bei 50 Volt (V). Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt (siehe 2.2.5).

2.2.3 Verdau des PCR-Produktes mit Restriktionsenzymen

Prinzip:

Restriktionsenzyme sind prokaryontische Enzyme, die spezifische Sequenzen aus vier bis acht Basenpaaren auf der DNA-Doppelhelix erkennen und die Phosphodiesterbrücken der Nukleinsäuren an Stellen mit Rotationssymmetrie, den so genannten Palindromen schneiden. Im Bereich der Palindrome ist aufgrund der zweifachen Symmetrieachse der DNA die Basenfolge der Einzelstränge in 5' → 3' Richtung auf beiden Strängen identisch.

Bisher sind ungefähr 100 Restriktionsenzyme, die über unterschiedliche Erkennungssequenzen verfügen, bekannt. Mittels Gelelektrophorese können die beim Restriktionsverdau entstehenden DNA-Fragmente aufgetrennt werden.

Restriktionsenzym:

Für den Verdau der PCR-Produkte wurde das Restriktionsenzym Nde I verwendet. Die Endonuklease schneidet die DNA-Doppelhelix an der Erkennungssequenz

- 5'...CA▼TATG...3'
- 3'...GTAT▲AC...5'

Das Temperatur-Optimum des Enzyms liegt bei 37°C, die Enzymaktivität beträgt 20 000 Units/ml.

Durchführung:

In einem ersten Schritt wurde ein Master Mix für einen 20fachen Restriktionsverdau pipettiert. Anschließend erfolgte die Verteilung des Ansatzes auf 20 Reaktionsgefäße. Nach Zugabe von je 4 µl des PCR-Produktes wurden die Reaktionsgefäße mit 50 µl Mineralöl beschichtet und verschlossen. Der Verdau fand im Anschluss im Inkubator bei 37°C statt und dauerte 12 Stunden.

2.2.4 Polyacrylamidgel**Prinzip:**

Polyacrylamidgele weisen gegenüber Agarosegelen ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen auf. Es bietet sich an, zur Trennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 1000 Basenpaaren Polyacrylamidgele zu verwenden, da diese chemisch inert und einfach herzustellen sind. Die Auftrennung der Nucleinsäuren erfolgt durch ein charakteristisches Verhältnis von Ladung zu Masse bzw. Molekülgröße, große Moleküle werden bei der Wanderung im elektrischen Feld stärker zurückgehalten als kleine. Das dreidimensionale Netz des Polyacrylamidgeles entsteht durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und der quervernetzenden Substanz Methylenbisacrylamid. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wird die Reaktion initiiert. Eine Veränderung

der Porengröße und somit des Siebeffektes kann durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid erreicht werden.

Durchführung:

Zuerst wurden zwei Glasplatten mit einem weichen ethanolgetränkten Tuch gereinigt, zwischen die Glasplatten wurden Abstandhalter gelegt und die Ränder der Platten über Klammern miteinander fixiert. Anschließend erfolgte das Ansetzen der Gellösung aus

- 4880 µl H₂O
- 750 µl 10xTBE-Puffer
- 1880 µl Acrylamid 40 %
- 15 µl TEMED
- 100 µl Ammoniumpersulfat 10%.

In einem nächsten Schritt wurde die Mischung in den Zwischenraum der beiden Glasplatten gegossen und eine Schablone für 20 Probetaschen eingesetzt. Kurz vor Beendigung der Gelpolymerisation wurde die Schablone aus dem Gel herausgezogen. Die Probetaschen wurden mit 1xTBE gespült, um in den Taschen verbliebene Gelreste zu beseitigen. Es folgte die Entfernung von Klammern und Abstandhaltern, das vorsichtige Einsetzen des Gels in die Gelkassette und die Auffüllung der Pufferkammer mit Laufpuffer (1xTBE). Anschließend wurden 19 Proben aus je 3 µl Restriktionsverdauprodukt in die Geltaschen eingefüllt. Jede DNA-Probe wurde zuvor mit 2 µl Ladungspuffer (Ansatz siehe Agarosegel) versetzt, um die Diffusion der aufgetragenen DNA aus den Probetaschen zu verhindern. In die äußere Tasche wurde als Größenstandard eine 1 kb DNA-Leiter (1 µl/ng) (Ansatz siehe Agarosegel) aufgetragen, um die Größenbestimmung und Zuordnung der Restriktionsfragmente zu ermöglichen. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte bei Raumtemperatur 2 Minuten lang bei 15 mA, dann weitere 40 Minuten bei 30 mA.

2.2.5 Anfärbung von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid

Prinzip:

Ethidiumbromid (3,8 Diamino-6-ethyl-5-phenanthrindiumbromid) ist eine fluoreszierende Substanz, die sequenzspezifisch DNA bindet. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nucleinsäuren und entwindet dabei die DNA-Doppelhelix. Nach Anregung mit UV-Licht erscheint der Ethidiumbromid-Nucleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich (500–900 nm) als orange-rot leuchtende Bande.

Die Nachweisgrenze von DNA in Polyacrylamidgelen beträgt 10 ng pro Bande, da das Polyacrylamid die Fluoreszenzausbeute des Ethidiumbromids stark vermindert; in Agarosegelen können bereits 5 ng DNA nachgewiesen werden.

Durchführung:

Das Polyacrylamidgel bzw. Agarosegel wurde nach Beendigung der Elektrophorese aus der Gelkammer entfernt und in einen der Gelgröße entsprechenden flachen Behälter gelegt, der eine Färbelösung aus 100 ml 1xTBE-Puffer und 5 µl der Ethidiumbromidstammlösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) enthielt. Das Polyacrylamidgel bzw. Agarosegel wurde unter permanentem Schwenken ungefähr 20 Minuten in der Lösung belassen. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation auf einen Transluminator überführt und unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254-300 nm mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

2.2.6 Ethanolfällung

Durchführung:

PCR-Produkte, die sich nach drei Versuchen immer noch nicht durch Restriktionsenzyme schneiden ließen, wurden mittels Alkoholfällung aufgereinigt.

Dazu wurden

- 10 µl Probenmaterial
- 1 µl 3M Natrium-Acetat ($\frac{1}{10}$ des Volumens)

- 25 µl absolutem Ethanol (2,5 x Volumen)

versetzt. Im Anschluss daran wurde die Lösung bei einer Temperatur von 4°C 20 Min. lang mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 13 000 rpm zentrifugiert.

Nach Beendigung der Zentrifugation erfolgte die Entfernung der Flüssigkeit mit einer Pipette. Zu der im Reaktionsgefäß verbliebenen DNA wurden

- 200 µl 70%iger Ethanol

gegeben. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 4°C mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 13 000 rpm wurde wiederholt der Überstand entfernt. Das ausgefällte DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in

- 20 µl H₂O

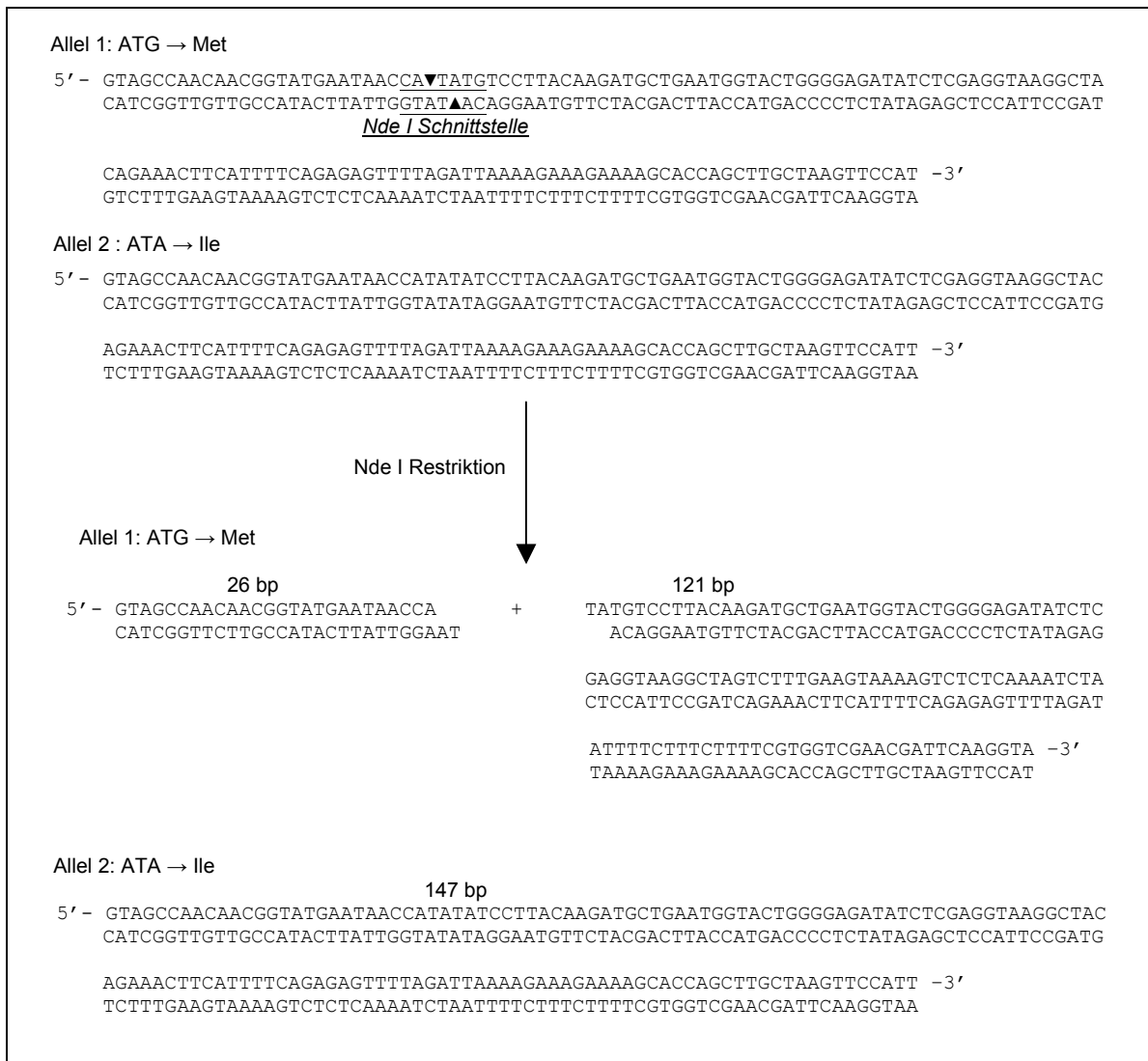
in Lösung gebracht.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der Restriktionsbefunde

Die Methode zur Amplifizierung der Met³²⁶Ile Varianten in der genomischen DNA der Probanden wurden bereits in Kapitel 2.2.1. beschrieben. In der folgenden schematischen Abbildung werden die möglichen Allele des Met³²⁶Ile Polymorphismus mit der Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Nde I sowie die entsprechende Fragmente der homologen DNA-Abschnitte nach dem Restriktionsverdau dargestellt.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Restriktionsbefunde

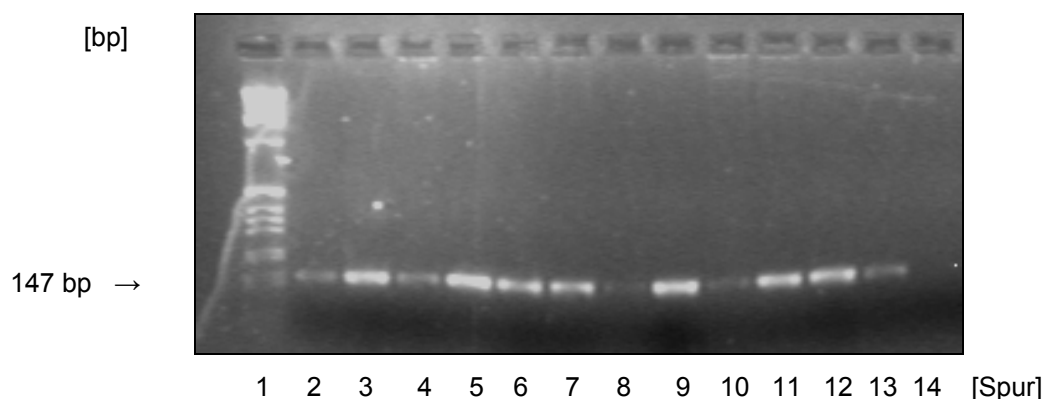


Mittels des in der unten gezeigten Abbildung dargestellten Agarosegels wurde zunächst das Ergebnis der PCR überprüft.

In die erste Spur des Gels wurde eine DNA-Leiter (1 kb) als Indikator für die Länge der synthetisierten DNA eingebracht. In der letzten Spur des Gels wurde, um eine potentielle Kontamination des PCR-Ansatzes zu erkennen, eine Negativkontrolle mitgeführt. Die amplifizierte Probanden-DNA mit einer Größe von 147 bp wurde in den Spuren 2 bis 13 aufgetragen.

Während in den meisten Spuren durch das ausgeprägte Signal der entsprechenden Bande das gute PCR-Ergebnis sichtbar wird, weist das schwache Signal der Banden in den Spuren 2, 4, 8, 10 und 13 auf ein schwaches bzw. ungenügendes Resultat der PCR hin.

Abb. 4: Darstellung des PCR-Ergebnisses mittels Agarosegel



Die Analyse der Restriktionsfragmente nach dem Verdau des PCR-Produktes mit der Restriktionsendonuklease Nde I erfolgte mittels Polyacrylamidgel. Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym wurde durch die Nukleotide 5'-CATATG-3' codiert. Anhand der durch die Mutation hervorgerufene unterschiedlichen Fragmentlängen des Verdau-Produktes war es möglich, die unterschiedlichen Genotypen der Probanden (Met/Met, Met/Ile oder Ile/Ile) zu typisieren.

In der nachfolgenden Abbildung werden alle bei der Gelelektrophorese möglichen Bandenmuster dargestellt.

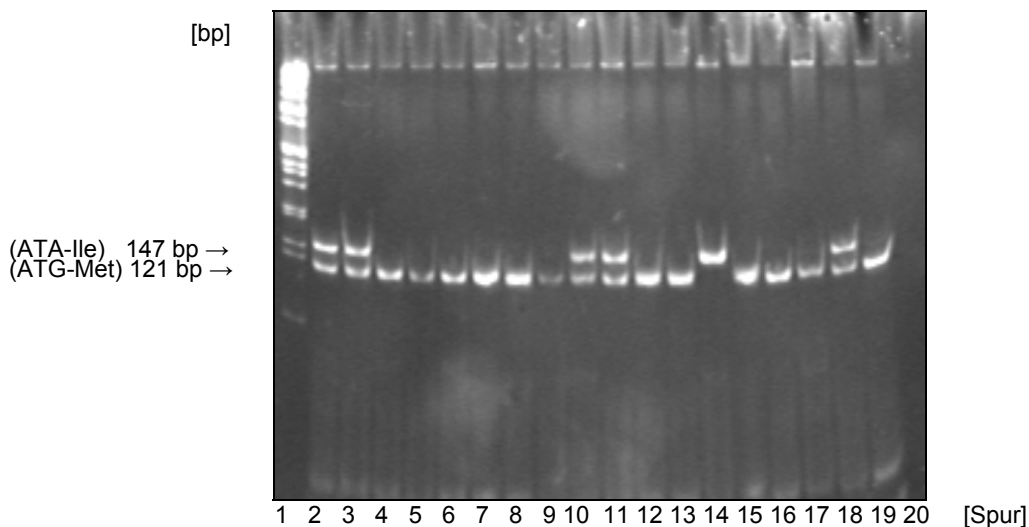
Abb. 5: Mögliche Bandenmuster auf dem Polyacrylamidgel

Basenpaare [bp]	Ungeschnittenes PCR-Produkt	Allele Met/Met	Allele Met/Ile	Allele Ile/Ile
147 bp	-----		-----	-----
121 bp		-----	-----	

Während bei den Met/Met-Trägern beide Allele durch die Restriktionsendonuklease Nde I geschnitten werden und somit alle DNA-Fragmente über die gleiche Basenpaarlänge und gleiche Lauflänge im Gel verfügen, wird bei dem Genotyp Met/Ile nur ein Allel geschnitten, wodurch verschieden große Spaltprodukte mit unterschiedlicher Lauflänge im elektrischen Feld entstehen. Das ungeschnittene PCR-Produkt entspricht in seiner Länge dem Genotyp Ile/Ile.

In der nachfolgenden Abbildung eines Polyacrylamidgels wird das Ergebnis des Restriktionsverdaus sichtbar.

Abb. 6: Darstellung des Restriktionsverdaus mittels Polyacrylamidgel



In die erste Spur wurde eine DNA-Leiter als Indikator für die Länge der Restriktionsfragmente aufgetragen. In den Spuren 2, 3, 10, 11 und 18 kann anhand der sichtbaren Doppelbande der Genotyp Met/Ile identifiziert werden. Da jeweils nur ein Allel durch die Restriktionsendonuklease Nde I geschnitten wurde,

entstanden durch den Verdau mit dem Enzym zwei unterschiedlich große DNA-Fragmente mit einer Länge von 147 bp und 121 bp. Die einfache Bande auf Spur 14 entspricht dem Genotyp Ile/Ile mit einer Fragmentlänge von 147 bp. Die Allele Met/Met werden durch die geschnittenen PCR-Produkte auf den Spuren 4 bis 9, 12, 13, 15, 16, 17 und 19 mit einer Länge von 121 bp charakterisiert. Eine mögliche Kontamination mit fremder DNA konnte durch die auf Spur 20 mitgeführte Negativkontrolle ausgeschlossen werden.

3.2 Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden die DNA-Proben von insgesamt 474 Personen untersucht; 184 Proben stammten von Frauen und 289 von Männern. Bei einer der untersuchten DNA-Proben war keine Geschlechtsangabe vorhanden.

Unter dem Untersuchungsmaterial befand sich die DNA von 110 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, die aus der Diabetes-Ambulanz des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert worden waren.

Als nichtdiabetische Kontrollgruppe dienten 78 Medped-Patienten (Make early diagnosis prevent early death) aus der Lipidambulanz des UKE. Charakteristisch für diese Patienten ist das Vorkommen einer Hypercholesterinämie und/oder einer Hypertriglyceridämie.

Ebenfalls zur Kontrollgruppe gerechnet wurden 198 gesunde Blutspender aus dem Blutspendezentrum des UKE, bei denen aus Gründen des Datenschutzes keine Gewichtsangabe vorhanden war und 90 Patienten, die während eines definierten Zeitraumes in der Medizinischen Kernklinik des Krankenhauses stationär behandelt wurden. In dieser Gruppe hatten 19 Personen einen manifesten Typ-2-Diabetes mellitus. Alle sich in der Kontrollgruppe befindenden Personen, die einen Typ-2- Diabetes mellitus aufwiesen, wurden bei den statistischen Berechnungen in die Gruppe der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten einbezogen.

3.3.1 Allelausprägung des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Typ-2-Diabetes mellitus Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe

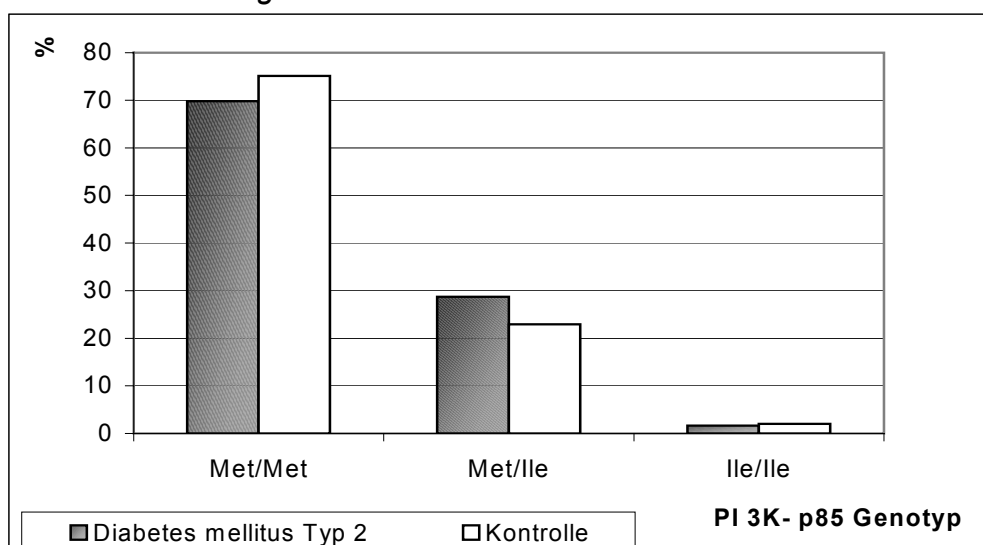
In einem ersten Schritt wurde mittels Chi-Quadrat Test die Allelfrequenz des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei allen Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und den nichterkrankten Probanden untersucht.

Wie aus der unten folgenden Tabelle ersichtlich wird zeigte das Ergebnis keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens der Met³²⁶Ile Varianten bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tab. 3: Allelverteilung des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Typ-2-Diabetes mellitus Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe

PI 3K-p85 Genotyp	Diabetes mellitus Typ 2		Kontrolle		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%
Met/Met	90	69,8	259	75,1	349	73,6
Met/Ile	37	28,7	79	22,9	116	24,5
Ile/Ile	2	1,6	7	2,0	9	1,9
Gesamt	129	100,0	345	100,0	474	100,0

Abb. 7: Allelverteilung des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Typ-2-Diabetes mellitus Patienten im Vergleich zu Nichterkrankte



Von 129 untersuchten Personen mit Typ-2-Diabetes mellitus hatten 2 (1,6%) den Genotyp Ile/Ile und 37 (28,7%) die Allelausprägung Met/Ile. Bei 90 (69,8%) der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten wurde keine Met³²⁶Ile Variante gefunden.

Im Vergleich dazu hatten unter den 345 Nichterkrankten 7 (2,0%) den Genotyp Ile/Ile und 79 (22,9%) Met/Ile, 259 (75,1%) zeigten keine Genvariante.

3.4 Vergleich des Nüchtern-Blutzuckerwertes und des HbA1c-Wertes bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten

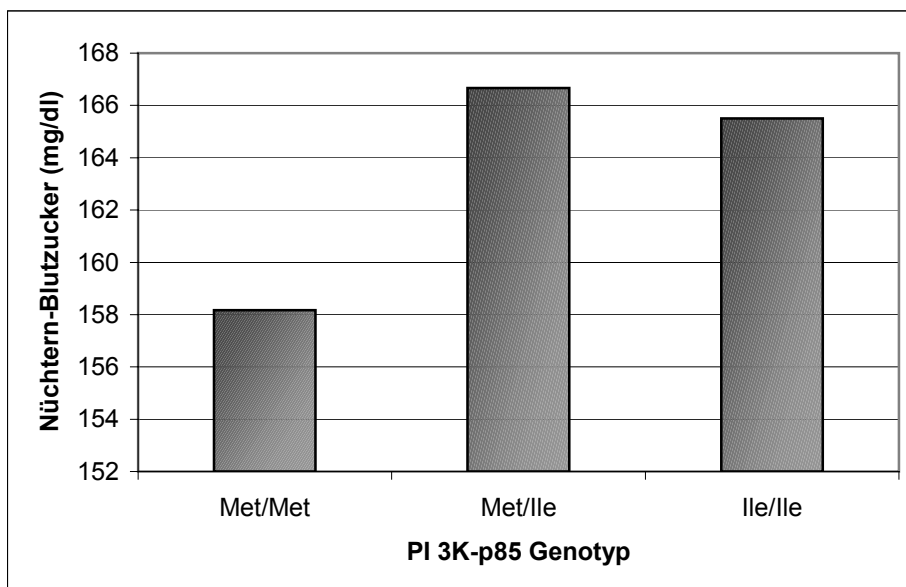
Zur weiteren Charakterisierung der unterschiedlichen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten wurden, soweit vorhanden, der Nüchtern-Blutzuckerwert sowie der HbA1c-Wert verglichen.

Zunächst wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Varianzhomogenität war gegeben) bei insgesamt 94 Probanden mit Typ-2-Diabetes mellitus der Nüchtern-Blutzuckerwert untersucht. Bei der Mittelwertberechnung ergab sich zwischen den Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile kein signifikanter Unterschied bezüglich der Nüchtern-Blutzuckerwerte (Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,81$). Da allerdings nur bei zwei der untersuchten Typ-2-Diabetiker der Genotyp Ile/Ile vorhanden war, ist der berechnete Mittelwert des Nüchtern-Blutzuckers bei diesen Probanden sehr zufallsbehaftet und somit nicht aussagefähig.

Tab.4: Vergleich des Nüchtern-Blutzuckerwertes und des HbA1c-Wertes bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten

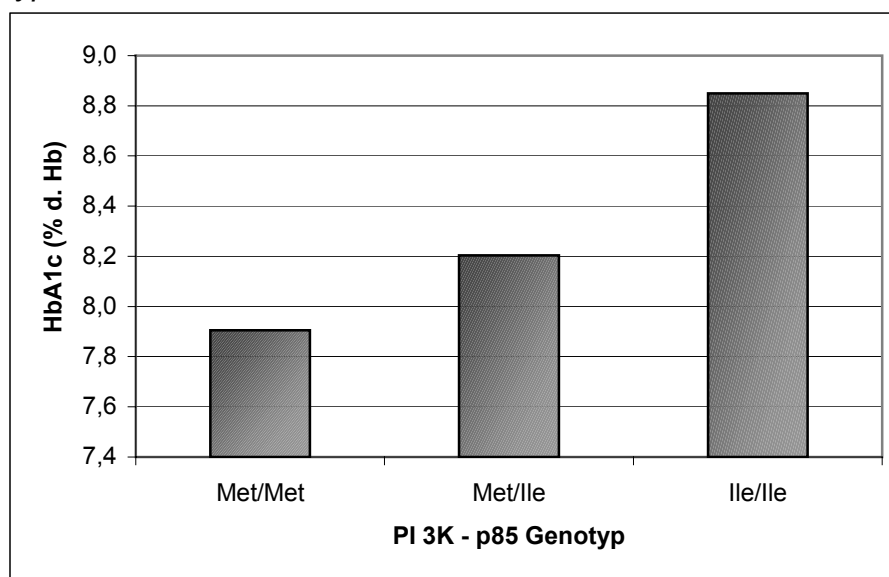
PI3K-p85 Genotyp	Nüchtern-Blutzucker (mg/dl)		HbA1c (% des Hämoglobins)	
	Mittelwert ±Standardabweichung (s)	n	Mittelwert ±Standardabweichung (s)	n
Met/Met	158±61	65	7,9±1,6	51
Met/Ile	166±51	27	8,2±1,7	25
Ile/Ile	165±33	2	8,5±0,7	2
Gesamt	160±57	94	8,0±1,6	78

Abb. 8: Vergleich des Nüchtern-Blutzuckerwertes bei den verschiedenen Allelausprägungen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten



Wie aus der vorangegangenen Tabelle ersichtlich wird, lieferte auch bei der statistischen Analyse des HbA1c-Wertes die einfaktorielle Varianzanalyse (Varianzhomogenität war gegeben) bei den 78 untersuchten Typ-2-Diabetikern kein signifikantes Ergebnis ($p=0,58$). Aufgrund von nur zwei Probanden mit dem Genotyp Ile/Ile war auch in diesem Fall eine Bewertung des gruppenspezifischen Mittelwertes bei zu geringer Aussagekraft nicht möglich.

Abb. 9: Vergleich des HbA1c-Wertes bei den unterschiedlichen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten

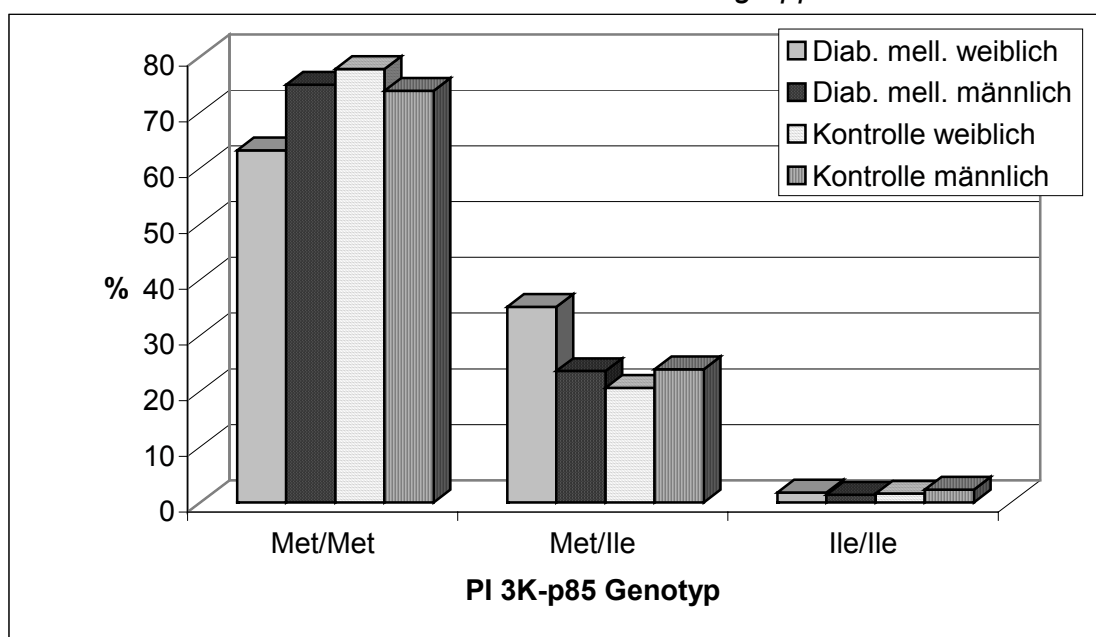


3.5 Geschlechterverteilung unter den verschiedenen Genotypen

Des Weiteren wurden Merkmale wie Geschlecht, Alter und Body Mass Index (BMI) bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe verglichen.

Bei der Untersuchung der Geschlechterverteilung auf die jeweiligen Genotypen war aufgrund von nur zwei Personen mit dem Genotyp Ile/Ile unter den Diabetikern die Berechnung des Chi-Quadrat-Testes nicht möglich. Auch bei der Kontrollgruppe waren die Voraussetzungen für die Verwendung des Chi-Quadrat-Testes nicht erfüllt, da zwei Zellen (33,3%) eine erwartete Häufigkeit von kleiner fünf hatten.

Abb. 10: Geschlechterverteilung der verschiedenen Genotypen bei den Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe



Wie aus der nachfolgenden Tabelle deutlich wird, zeigt die statistischen Analyse der Geschlechter bezüglich der unterschiedlichen Genotypen keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung von Frauen und Männern bei den Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der nichtdiabetischen Kontrollgruppe.

Tab. 5: Geschlechterverteilung der verschiedenen Genotypen bei den Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe

PI 3K-p85 Genotyp	Diabetes mellitus Typ 2						Kontrolle					
	Geschlecht				Gesamt		Geschlecht				Gesamt	
	weibl.		männl.		n	%	weibl.		männl.		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Met/Met	36	63,2	54	75,0	90	69,8	98	77,8	161	73,9	259	75,3
Met/Ile	20	35,1	17	23,6	37	28,7	26	20,6	52	23,9	78	22,7
Ile/Ile	1	1,8	1	1,4	2	1,6	2	1,6	5	2,3	7	2,0
Gesamt	57	100,0	72	100,0	129	100,0	126	100,0	218	100,0	344	100,0

3.6 Berechnung der Altersmittelwerte der verschiedenen Genotypen

In einem nächsten Schritt wurden die Altersmittelwerte der verschiedenen Genotypen bei allen Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe bestimmt. Da nur zwei Patienten mit der Allelausprägung Ile/Ile unter den Diabetikern waren, ist der berechnete Mittelwert bei diesen sehr zufallsbehaftet. Außerdem ist bei der Kontrollgruppe bei den Probanden mit dem Genotyp Ile/Ile wegen der zu geringen Allelfrequenz die Durchführung des Chi-Quadrat-Testes nicht möglich. Bei den Genotypen Met/Met und Met/Ile zeigten sich im Vergleich der Altersmittelwerte keine signifikanten Abweichungen zwischen den Erkrankten und der Kontrollgruppe.

Tab. 6: Altersmittelwerte bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe

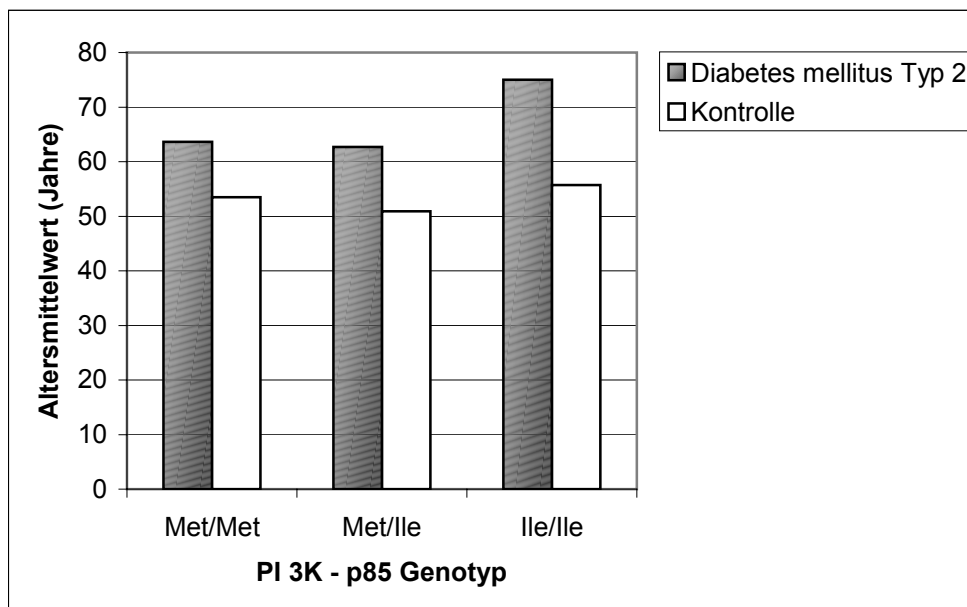
PI 3K-p85 Genotyp	Diabetes mellitus Typ 2		Kontrolle		Gesamt	
	Mittelwert (Jahre) ± s	n	Mittelwert (Jahre) ± s	n	Mittelwert (Jahre) ± s	n
Met/Met	63,6±12,0	89	53,5±12,1	255	56,1±12,8	344
Met/Ile	62,6±12,5	37	50,9±10,6	79	54,6±12,5	116
Ile/Ile	75,0±11,3	2	55,7±15,0	7	60,0±16,0	9
Gesamt	63,5±12,2	128	52,9±11,9	341	55,8±12,8	469

Bei dieser Analyse ist auch zu erkennen, dass der Altersmittelwertunterschied zwischen den Typ-2-Diabetikern (Arithmetisches Mittel (AM): 63,52) und der

Kontrollgruppe (AM: 52,96) höchst signifikant ist ($p \leq 0,001$). Dies bedeutet, dass die in die Untersuchung eingegangenen Typ-2-Diabetes mellitus Patienten im Durchschnitt wesentlich älter sind als die ebenfalls bei der statistische Berechnung berücksichtigte Kontrollgruppe.

Die Altersmittelwertunterschiede unterscheiden sich dagegen bei den drei verschiedenen Genotypen nicht signifikant. Ebenfalls zeigen sich keinerlei statistisch auffälligen Abweichungen bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Allelfrequenz und dem Vorkommen des Diabetes mellitus Typ 2.

Abb. 11: Verteilung der Altersmittelwerte bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe



3.7 Berechnung des Body Mass Index

Zusätzlich wurde das Verhalten des Body Mass Index (BMI) bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetiker und der Kontrollgruppe mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (Varianzhomogenität war gegeben) untersucht. Da bei den zur Kontrollgruppe gehörigen Blutspendern keine Gewichtsangabe vorhanden war, wurden diese bei der statistischen Berechnung nicht berücksichtigt.

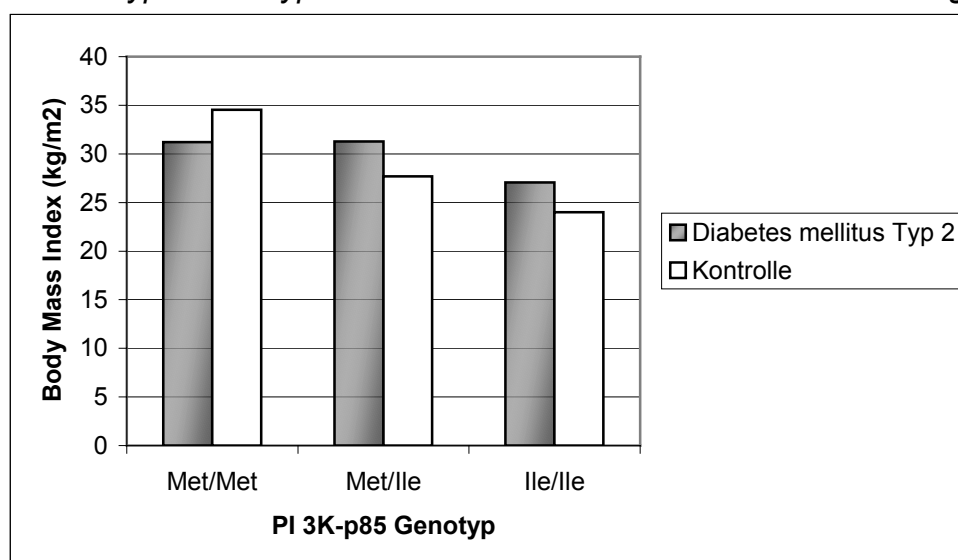
Mittels der folgenden Tabelle werden die berechneten Mittelwerte und deren Standardabweichung dargestellt:

Tab. 7: Mittelwerte des Body Mass Index bei den unterschiedlichen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten und der Kontrollgruppe

PI 3K – p85 Genotyp	Diabetes mellitus Typ 2		Kontrolle		Gesamt	
	Mittelwert (kg/m ²) ± s	n	Mittelwert (kg/m ²) ± s	n	Mittelwert (kg/m ²) ± s	n
Met/Met	31,2±12,0	83	34,5±19,3	114	33,1±16,7	197
Met/Ile	31,2±12,3	36	27,6±13,2	29	29,6±12,7	65
Ile/Ile	27,0±1,9	2	24,0±0,0	2	25,5±2,0	4
Gesamt	31,1±1,0	121	33,0±18,3	145	32,1±15,7	266

Es zeigt sich bei dieser Auswertung, dass sich die Typ-2-Diabetes mellitus Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant ($p=0,3$) in ihrem durchschnittlichen BMI unterscheiden. Ebenso verhält es sich bei den verschiedenen Genotypen des Met³²⁶Ile-Polymorphismus bei den Erkrankten. Weder bei der Allelausprägung Met/Met, noch bei den Genotypen Met/Ile und Ile/Ile wurde eine signifikante Abweichung bezüglich des berechneten Body Mass Index gefunden.

Abb. 12: Verteilung der Mittelwerte des Body Mass Index bei den verschiedenen Genotypen der Typ-2-Diabetes mellitus Patienten u. der Kontrollgruppe



3.8 Vergleich der Serumlipide bei den verschiedenen Genotypen

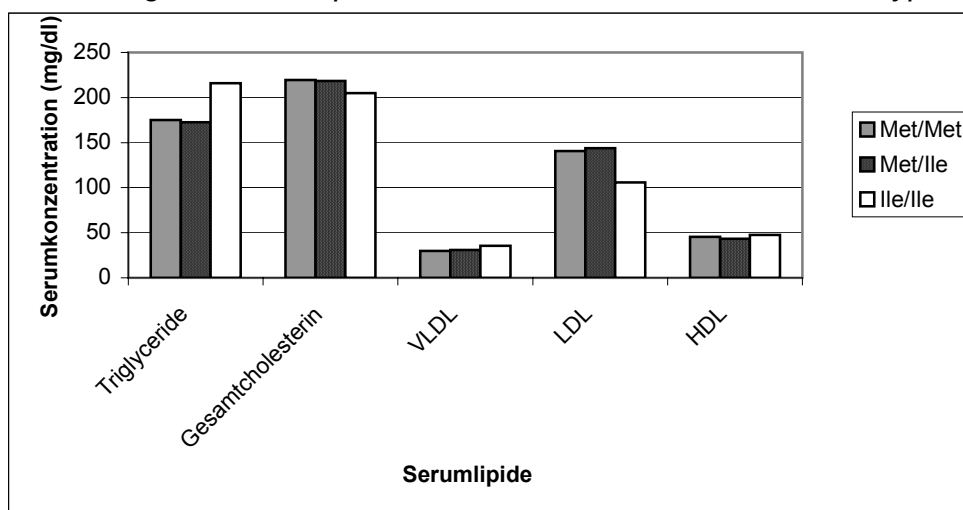
Mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Varianzhomogenität war gegeben) wurde außerdem geprüft, ob sich die von uns untersuchten Probanden in ihren unterschiedlichen Genotypen in der Serumkonzentration der Triglyceride, des Gesamtcholesterins und der Lipoproteinen (Very-low-density lipoprotein (VLDL), Low-density lipoprotein (LDL) und High-density lipoprotein (HDL)) signifikant unterscheiden.

Tab. 8: Serumkonzentration von Triglyceriden, Gesamtcholesterin und Lipoproteinen bei den verschiedenen Genotypen des Met³²⁶Ile Polymorphismus

Serumlipide	Met/Met		Met/Ile		Ile/Ile		p
	Mittelwert (mg/dl) ± s	n	Mittelwert (mg/dl) ± s	n	Mittelwert (mg/dl) ± s	n	
Triglyceride	175±155	347	172±108	116	216±139	9	0,688
Gesamtcholesterin	219±70	345	218±55	116	204±58	9	0,806
VLDL	29±16	318	30±16	106	35±16	8	0,570
LDL	140±63	330	143±55	110	106±39	8	0,243
HDL	45±15	344	43±13	116	47±13	9	0,400

Wie aus der oben stehenden Tabelle deutlich wird, ergaben sich auch bei der statistischen Analyse der Blutfettwerte keine signifikanten Abweichungen bei den Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile bezüglich der Serumkonzentration von Triglyceriden, Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL.

Abb. 13: Verteilung der Serumlipide unter den unterschiedlichen Genotypen



4 Diskussion

Eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus spielt neben der Entstehung der Insulinresistenz infolge abnehmender Insulinwirkung an den Zielzellen von Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel die nachlassende Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen. Obwohl sich die Mehrzahl der Erkrankungen auf der Basis eines metabolischen Syndroms entwickelt und Überernährung und Adipositas als entscheidende Faktoren bei der Manifestation des Typ-2-Diabetes mellitus bewertet werden, vermuten zahlreiche Forscher eine ursächlich genetische Komponente des Leidens. Bekannte Mutationen, die Auswirkungen auf die Insulinempfindlichkeit haben, fanden sich bislang im Bereich des Insulinrezeptors (Tayler et al., 1992) und des IRS-1 (Clausen et al., 1995; Whitehead et al., 1998; Shirakami et al., 2002).

Mehrere Studien haben in diesem Zusammenhang auch auf die Bedeutung der PI 3-Kinase hingewiesen, die Funktion des Proteins im Glucosemetabolismus untersucht (Okada et al., 1994; Yeh et al., 1995; Shepherd et al., 1997) und dessen Rolle bei der Genese der Insulinresistenz erforscht. Pathologische Mutationen im Bereich des 85 kDa schweren Adapterproteins (p85) bzw. der 110 kDa schweren katalytischen (p110) Untereinheit der PI 3-Kinase, die zur Expression unterschiedlicher Varianten des Heterodimers führen und dadurch dessen Aktivität beeinflussen, werden als ätiologische Faktoren der Insulinresistenz diskutiert. Außerdem wird vermutet, dass der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus eine defekte Regulation der Genexpression der PI 3-Kinase zugrunde liegt (Andreelli et al., 1999, Andreelli et al., 2000).

So führten Experimente an Mäusen, bei denen gezielt das kodierende Gen für die regulatorische Untereinheit von p85 α ausgeschaltet wurde, deren Splicevarianten aber noch exprimiert werden konnten, zu einer gesteigerten Insulinempfindlichkeit und erhöhter Hypoglykämieeigung (Terauchi et al., 1999). Auch zeigte sich in kultivierten dermalen Fibroblasten bei Patienten mit schwerster Insulinresistenz und Pseudoakromegalie eine signifikant beeinträchtigte Aktivität der Insulin stimulierten PI 3-Kinase (Dib et al., 1998; Kausch et al., 1999). Als potentielle Ursache der Beeinträchtigung des Insulin stimulierten Glucosetransports im Skelettmuskel

übergewichtiger Typ-2-Diabetes mellitus Patienten wurde in verschiedenen Studien ein Mangel an PI 3-Kinaseaktivität diskutiert (Goodyear et al., 1995; Björnholm et al., 1997; Rondinone et al., 1999). Beobachtet wurde ebenfalls die Notwendigkeit der PI 3-Kinaseaktivität für den insulinstimulierten erleichterten Glucosetransport im menschlichen Skelettmuskel und die Existenz von sieben Isoformen der Adapteruntereinheit der PI 3-Kinase im Muskelgewebe, die in unterschiedlichem Maße durch Insulin reguliert werden (Sheperd et al., 1997).

Angesichts dieses Forschungsstandes blieb die Frage, ob sich die Häufigkeit des Auftretens des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus im Vergleich zu Nichterkrankten signifikant unterscheidet und ob der genetische Defekt in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase mit einer Insulinresistenz bzw. der Entstehung des Typ-2-Diabetes mellitus assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz des Met³²⁶Ile Polymorphismus im p85 α -Gen bei insgesamt 474 Personen ermittelt. Das Probenmaterial setzte sich aus der DNA von insgesamt 129 an Typ-2-Diabetes mellitus Erkrankten zusammen. Als Kontrolle diente die DNA von 345 Personen, die in der Lipidambulanz des UKE oder während eines definierten Zeitraumes in der Medizinischen Kernklinik des Universitätsklinikums stationär behandelt wurden bzw. das Blutspendezentrum frequentierten. Die in dieser Untersuchung ausgewerteten Daten zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus gegenüber der Kontrollgruppe.

Dies steht im Widerspruch zum Ergebnis einer dänischen Forschergruppe, die bei übergewichtigen und älteren Trägern des Allels Ile/Ile eine kritisch niedrige Aktivität der PI 3-Kinase feststellte, die letztendlich in eine beeinträchtigte Glucosetoleranz oder sogar einen Typ-2-Diabetes münden könnte (Hansen et al., 1997). Die Prävalenz des Met³²⁶Ile Polymorphismus wurde bei 404 Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus und 224 gesunden Kontrollpersonen ermittelt. Bei der Auszählung der Allelfrequenz ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Diabetes mellitus Patienten (73% Met/Met, 26% Met/Ile, 2% Ile/Ile) und der Kontrollgruppe (71% Met/Met, 27% Met/Ile, 2% Ile/Ile). Diese Allelfrequenz stimmt in etwa mit der in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Verteilung der

Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile (69,8%, 28,7%, 1,6% bei den Diabetes mellitus Patienten; 75,1%, 22,9%, 2,0% bei der Kontrollgruppe) überein.

Außerdem untersuchte die oben erwähnte dänische Studie 380 gesunde Kaukasier im Alter von 18-32 Jahren. 31% der Probanden waren Träger der Met³²⁶Ile Varianten, bei etwa 2% der Untersuchten lag der Met³²⁶Ile Polymorphismus in der Allelausprägung Ile/Ile vor. Im Unterschied zur hier vorliegenden Assoziationsstudie wurden bei diesen Probanden die physiologischen Auswirkungen des Polymorphismus auf den Insulinstoffwechsel und den Glucoseumsatz untersucht. Während bei den heterozygoten Trägern der Varianten keine signifikanten Veränderungen bezüglich Insulinsensitivität und Glucoseverwertung nachweisbar waren, wurde bei zwei Trägern der Allele Ile/Ile ein reduzierter Insulinempfindlichkeitsindex gefunden, welcher mit der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus assoziiert sein könnte. Da in der vorliegenden Arbeit funktionelle Auswirkungen der Varianten auf den Glucosemetabolismus nicht untersucht wurden, ist eine Aussage über potentielle physiologische Effekte des Polymorphismus auf den Glucosestoffwechsel mit dieser Assoziationsstudie nicht möglich.

Berücksichtigt wurde in dieser Arbeit jedoch der Einfluss des Met³²⁶Ile Polymorphismus auf den Nüchtern-Blutzuckerwert bzw. den HbA1c-Wert bei den Typ-2-Diabetes mellitus Patienten. Die statistischen Berechnung des Nüchtern-Blutzucker bei 94 Typ-2-Diabetikern zeigte hinsichtlich der drei unterschiedlichen Genotypen keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Nüchtern-Plasma-Glucose (Met/Met: 158±61 mg/dl, Met/Ile: 166±51 mg/dl, Ile/Ile: 165±33 mg/dl). Auch bei der einfaktoriellen Varianzanalyse des HbA1c-Wertes ergab sich bei den 78 untersuchten Typ-2-Diabetikern bezüglich der Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile keine signifikante Abweichung (7,9±1,6, 8,2±1,7, 8,0±0,7% des Hb). Allerdings war bei nur zwei Typ-2-Diabetikern mit der Allelausprägung Ile/Ile die Schätzung des Mittelwertes bei diesen Probanden sehr zufallsbehaftet und somit nicht repräsentativ.

Im Einklang mit dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchung stehen die Beobachtungen einer nordamerikanischen Forschergruppe, die DNA-Proben von 950 Pima-Indianern hinsichtlich des Zusammenhangs von Met³²⁶Ile Polymorphismus und dem gehäuften Vorkommens eines Typ-2-Diabetes mellitus überprüfte (Baier et

al., 1998). Laut der amerikanischen Studie ist die Met³²⁶Ile Variante in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase nicht mit einem konzentrierten Auftreten der Erkrankung assoziiert.

Übereinstimmend mit dem Resultat der vorliegenden Arbeit kam auch eine japanische Studie zu dem Schluss, dass der Met³²⁶Ile Polymorphismus der regulatorischen Untereinheit von p85 α keinen Einfluss auf die Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus hat (Kawanishi et al., 1997). Hier fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Verteilungsmuster der Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile bei den beobachteten 200 Typ-2-Diabetikern (75%, 22%, 1,9%) und den 260 Kontrollpersonen (76%, 22%, 1,9%).

Bestätigt wird das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung auch durch eine englische Studie. Zwar wurde der Met³²⁶Ile Polymorphismus bei neun von 20 Versuchspersonen identifiziert, dennoch werden Mutationen in p85 α bei Patienten mit schwerer Insulinresistenz von Baynes et al. als außergewöhnlich bezeichnet. Sie scheinen keine funktionelle Auswirkung auf die Insulin stimulierte PI 3-Kinaseaktivität zu haben. Entdeckt wurde bei einer Versuchsperson allerdings eine seltene heterozygote Missensemutation Arg⁴⁰⁹Gln. Diese Variante ist der Studie zufolge mit einer eingeschränkten Insulin stimulierten PI 3-Kinase-Aktivität assoziiert und könnte die potentielle Ursache in einem Fall von Insulinresistenz in einer britischen Familie sein (Baynes et al., 2000).

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einer chinesischen Untersuchung (Chen et al., 2005). Berücksichtigt wurden bei dieser Studie 494 chinesische Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und arterieller Hypertonie sowie eine 557 gesunde Probanden umfassende Kontrollgruppe. Anhand der Studie konnte nachgewiesen werden, dass der Genotyp Ile/Ile in der chinesischen Population mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko hinsichtlich eines Typ-2-Diabetes und Bluthochdruckes assoziiert ist.

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit klinische Parameter wie Body Mass Index, Alter und Geschlechterverteilung bei den unterschiedlichen Allelausprägungen der Met³²⁶Ile Varianten der Typ-2-Diabetes Patienten und den nichterkrankten Probanden verglichen. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Body Mass Index bei den Allelausprägungen

Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile zwischen den Typ-2-Diabetes mellitus Patienten ($31,21 \pm 12,09$; $31,2 \pm 12,33$; $27,05 \pm 1,91 \text{ kg/m}^2$) und der Kontrollgruppe ($34,54 \pm 19,32$; $27,69 \pm 13,23$; $24,0 \pm 0 \text{ kg/m}^2$). Diese Feststellung deckt sich mit der Beobachtung der oben genannten asiatischen Studie (Kawanishi et al., 1997).

Auch bei den japanischen Typ-2-Diabetikern waren bezüglich des Body Mass Index keine statistisch auffälligen Abweichungen bei den Genotyp Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile erkennbar ($25,3 \pm 4,7$; $23,9 \pm 6,8$; $26,2 \pm 3,6 \text{ kg/m}^2$). Auffallend ist, dass der Body Mass Index der in der vorliegenden Studie berücksichtigten Probanden weit über dem der japanischen Patienten liegt. Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten der untersuchten Populationen zurückzuführen sein.

Hansen et al. entdeckten 1997 dagegen bei zwei übergewichtigen (Body Mass Index $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) Ile/Ile-Trägern der Met³¹²Ile Varianten eine Abnahme der Insulinempfindlichkeit und der Glucoseabbaukonstanten, die mit einer beeinträchtigten Glucosetoleranz assoziiert sein könnte.

Auch bei Betrachtung des Altersmittelwertes ergab sich in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen der Met³²⁶Ile Variante. Da bei den Typ-2-Diabetikern nur zwei Probanden die Allelausprägung Ile/Ile zeigten, ist der berechnete Altersmittelwert für diese ($75 \pm 11,31$ Jahre) sehr zufallsbehaftet. Er kann daher nicht für eine repräsentative Aussage herangezogen werden. Allerdings fiel bei der statistischen Auswertung ein signifikant hoher Altersmittelwertunterschied zwischen den Typ-2-Diabetes mellitus Patienten (AM: 63,52) und der Kontrollgruppe (AM: 52,96) auf. Dieser ist auf das wesentlich höhere Durchschnittsalter der Patienten bei dem sich in der Regel erst im höheren Lebensalter manifestierenden Typ-2-Diabetes zurückzuführen.

Im Unterschied zu dieser Arbeit ermittelte Kawanishi 1997 das Alter bei Erstmanifestation des Diabetes mellitus bei 200 japanischen Patienten. Bei der japanischen Untersuchung fand sich keine bedeutsame Abweichung im Lebensalter bei Beginn der Erkrankung zwischen den Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile ($46,1 \pm 15,0$; $47,1 \pm 11,4$; $47,5 \pm 10,8$ Jahre).

Ein im Rahmen dieser Studie durchgeführter Vergleich der Geschlechteraufteilung ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der

Verteilung von Männern und Frauen auf die verschiedenen Genotypen bei den Typ-2-Diabetikern und der Kontrollgruppe. Allerdings ist die statistische Analyse der Geschlechterverteilung bei nur zwei Probanden mit der Allelausprägung Ile/Ile unter den Erkrankten extrem zufallsbelastet.

Abweichend vom Ansatz dieser Arbeit berücksichtigte Kawanishi den Einfluss des Met³²⁶Ile Polymorphismus auf die Geschlechterverteilung der Typ-2-Diabetiker in einer japanischen Population nicht. Auch die dänische Studie beschäftigte sich nicht mit der Geschlechterverteilung bei den unterschiedlichen Genotypen der Met³²⁶Ile Varianten (Hansen et al., 1997).

Eine Studie der bereits erwähnten nordamerikanischen Forschergruppe untersuchte die DNA-Proben von Pima-Indianern. Die Probanden setzten sich aus 400 Männern und 450 Frauen zusammen. Auffallend war, dass die Variante in p85α bei den weiblichen Probanden mit dem Genotyp Ile/Ile einerseits zu einer geringeren Prävalenz des Typ-2-Diabetes mellitus, andererseits zu einer erhöhten Insulinantwort in der frühen Phase der Insulinausschüttung führte. Da diese Insulinreaktion nur beim weiblichen Geschlecht zu beobachten war, wurde angenommen, dass p85α bei den Geschlechtern unterschiedlich exprimiert werden könnte (Baier et al., 1998).

Im Unterschied zu den meisten der bislang erwähnten Studien berücksichtigte die vorliegende Arbeit auch die Auswirkung der Met³²⁶Ile Varianten auf die Serumlipide. Die statistische Analyse der Serumkonzentrationen von Triglyceriden, Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL zeigte keine signifikante Abweichung zwischen den Genotypen Met/Met, Met/Ile und Ile/Ile.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die bereits erwähnte chinesische Assoziationsstudie (Chen et al., 2005). Auch bei dieser Untersuchung fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Met³²⁶Ile Polymorphismus und der Konzentration der Blutfettwerte.

Es bleibt die Frage, inwieweit die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Bevölkerungsgruppe bzw. die genetische Heterogenität innerhalb einer Rasse die Prävalenz des Met³¹²Ile Polymorphismus beeinflusst. Da die Herkunft der von uns untersuchten Testpersonen nicht weiter definiert wurde, kann diesbezüglich keine Aussage auf der Grundlage der vorgelegten Untersuchung gemacht werden. Der Vergleich der vorliegenden Arbeit mit einer japanischen (Kawanishi et al., 1997) und

einer nordamerikanischen Population (Baier et al., 1998) führte zwar teilweise zu einander bestätigenden Ergebnissen. Um eine repräsentative Analyse über die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Bevölkerungsgruppe und die Prävalenz des Met³²⁶Ile Polymorphismus bei Typ-2-Diabetes mellitus Patienten machen zu können, müssten jedoch weitere Untersuchungen erfolgen.

Fraglich ist auch, inwieweit sich anhand der untersuchten Stichprobe eine zuverlässige Aussage über den Zusammenhang von Met³²⁶Ile Polymorphismus und der Prävalenz des Typ-2-Diabetes mellitus machen lässt. Denkbar ist, dass sich bei einer größeren Grundgesamtheit präzisere Aussagen machen lassen.

Interessant wäre auch der Frage nachzugehen, welche weiteren Effekte die oben genannte Variante auf das Stoffwechselgeschehen hat. In diesem Zusammenhang stellten Almind et al. fest, dass die Met³²⁶Ile Variante geringe Auswirkung auf die Expression und Aktivität von Proteinen, die den Insulinstoffwechsel beeinflussen, hat, weisen aber auf die Bedeutung der Mutation bei der Differenzierung von Adipozyten hin (Almind et al., 2002).

Ungeachtet der noch zu beantwortenden Fragen kommt die vorliegende Arbeit in Übereinstimmung mit zahlreichen Studien zu dem Resultat, dass der Met³²⁶Ile Polymorphismus nicht als alleiniger ursächlicher Faktor an der Pathogenese Typ-2-Diabetes mellitus beteiligt ist. Inwieweit andere Varianten in den für Signalproteine des Glucosestoffwechsels codierenden Genen in Kombination mit der Met³²⁶Ile Varianten an der Entstehung des Typ-2-Diabetes mellitus beteiligt sein könnten, bleibt zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Met³²⁶Ile Polymorphismus in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase für die Entstehung des Typ-2-Diabetes mellitus maßgeblich ist. Analysiert wurden DNA-Proben von insgesamt 474 Personen, 129 davon hatten einen manifesten Diabetes mellitus Typ 2.

Im Ergebnis zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens der Met³²⁶Ile Varianten bei den Betroffenen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Gegenüberstellung von Geschlechtszugehörigkeit, Alter und Body Mass Index bei den Erkrankten und der Kontrollgruppe ergab keine statistisch auffälligen Abweichungen bei den verschiedenen Genotypen. Letztendlich führt die vorliegende Arbeit in Übereinstimmung mit zahlreichen bereits genannten Studien zu der Schlussfolgerung, dass der Met³²⁶Ile Polymorphismus in der regulatorischen Untereinheit der PI 3-Kinase als alleiniger ursächlicher Faktor keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz hat bzw. nicht mit Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus assoziiert ist.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Beitragswerke

Berger M, Trautner C (2000) Epidemiologie des Typ 2 Diabetes mellitus. In: Berger M (Hrsg) Diabetes mellitus. Urban&Fischer. München, Jena: 15-24

Hildebrandt H, Dornblüh O, Pschyrembel W (2002) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Gruyter, Berlin: 1336

Kolb, H (1997) Diabetes. In: Gemsa D, Kalden JR, Resch K (Hrsg.) Immunologie. Grundlagen, Klinik, Praxis, Thieme, Stuttgart, New York: 540-547

Parhofer K, Landgraf R, Göke B (2004) Diabetes mellitus. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W (Hrsg) Innere Medizin. Urban&Fischer, München, Jena: 1531-1561

Powers AC (2003) Diabetes mellitus. In: Dietl M, Dullenhausen J, Suttorp N (Hrsg): Harrisons Innere Medizin II. ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin: 2307-2337

6.2 Zeitschriften

Aiello LP, Cavallerano JD, Gardner TW, Ferris FL, King GL, Klein R, Blankenship G (1998) Diabetic retinopathy. Diabetes Care 21: 143

Algenstedt P, Hennings N, Telkamp N, Schwarzloh B, Kausch C, Matthaei S, Hansen-Algenstedt N, Greten H (2004) Met³²⁶Ile Aminoacid Polymorphism in the Human p85 α Gene has no Major Impact on Early Insulin Signaling in Type 2 Diabetes. Horm Metab Res 36: 686-692

Allen TJ, Cao Z, Youssef S, Hulthen UL, Cooper ME (1997) Role of Angiotensin II and Bradykinin in Experimental Diabetic Nephropathy. Diabetes 46: 1612-1618

Almind K, Delahaye L, Hansen T, Van Obberghen E, Pedersen O, Kahn CR (2002) Characterization of the Met³²⁶Ile variant of phosphatidylinositol 3-kinase p85 α . Proc Natl Acad Sci 99: 2124-2128

American Diabetes Association (1997) Report on the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. Diabetes Care 20: 1183-1197

American Diabetes Association (2004) Screening for Type 2 Diabetes. Diabetes Care 27 (Supl.): S11-S14.

American Diabetes Association (2006) Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 29: S11-S48

Andreelli F, Laville M, Ducluzeau PH, Vega N, Vallier P, Khalfallah Y, Riou JP, Vidal H (1999) Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependant diabetes mellitus patients. *Diabetologia* 42: 358-364

Andreelli F, Laville M, Vega N, Riou JP, Vidal M (2000) Regulation of gene expression during severe caloric restriction: lack of induction of p85 alpha phosphoinositol 3-kinase mRNA in skeletal muscle of patients with type II (non-insulin-dependant) diabetes mellitus. *Diabetologia* 43(3): 356-363

Antonetti DA, Algenstedt P, Kahn R (1996) Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol* 16: 2195-2203

Atkinson MA, Maclaren NK (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med* 331: 1428-1436

Baier L, Wiedrich C, Hanson RL, Bogardus C (1998) Variant in the Regulatory Subunit of Phosphatidylinositol 3-kinase (p85 α)-preliminary evidence indicates a potential role of this variant in the acute insulin response and type 2 diabetes in Pima woman. *Diabetes* 47: 973-975

Baynes KCR, Beeton CA, Panayotou G, Stein R, Soos M, Hansen T, Simpson H, Rahilly SO, Sheperd PR, Whitehead JP (2000) Natural variants of human p85 α phosphoinositide 3-kinase in severe insulin resistance: a novel variant with impaired insulin-stimulated lipid kinase activity. *Diabetologia* 43: 321-331

Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox NJ (1991) Gene for non-insulin-dependant diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1484-1488

Bingley PJ (1996) Interactions of age, islet cell antibodies, insulin autoantibodies, and first-phase insulin response in predicting risk of progression to IDDM in ICA(+) relatives: the ICARUS data set. *Diabetes* 45: 1720-1728

Björnholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR (1997) Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 46: 524-527

Bjorge JD, Chan TO, Antczak M, Kung HJ, Fujita DJ (1990) Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 87: 3816-3820

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003) Two New Substrates in Insulin Signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278: 25323-25330

Carpenter CL, Duckworth BC, Auger KR, Cohen B, Schaffhausen BS, Cantley LC (1990) Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem* 256: 19704-19711

Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M et al. (1993) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268: 9478-9483

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14: 4902-4911

Chen S, Yan W, Huang J, Ge D, Yao Z, Gu D (2005) Association analysis of the variant in the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase (p85 α) with Type 2 diabetes mellitus and hypertension in the Chinese Han Population. *Diabetes Medicine* 22: 737-743

Choi BCK, Shi F (2001) Risk factors for diabetes mellitus by age and sex: results of the National Population Health Survey. *Diabetologia* 44: 1221-1231

Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, Hansen L, Almind K, Winther K (1995) Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346: 397-402

Cohen GB, Ren R, Baltimore D (1995) Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell* 80: 237-248

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE (1995) Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in woman. *Ann Intern Med* 122: 481-486

Cooper ME (1998) Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 352: 213-219

Dahlquist G, Blom L, Lönnberg G (1991) The Swedish Childhood Diabetes Study – a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia* 34: 757-762

Dahlquist G, Ivarsson S, Lindberg B, Forsgren M (1995) Maternal enteroviral infection during pregnancy as a risk factor for childhood. *Diabetes* 44: 408-413

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E (1992) Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368

Dib K, Whitehead JP, Humphreys PJ, Soos MA, Baynes KCR, Kumar S, Harvey T, O'Rahilly S (1998) Impaired Activation of Phosphoinositide 3-Kinase by Insulin in Fibroblasts from Patients with Severe Insulin Resistance and Pseudoacromegaly. *J Clin Invest* 101: 1111-1120

Eastman RC, Keen H (1997) The impact of cardiovascular disease in people with diabetes: the potential for prevention. *Lancet* 350 (Suppl I): 29-32

Eliasson B (2003) Cigarette Smoking and Diabetes. *Progr Cardiovasc Disease* 45: 405-413

Endemann G, Yonezawa K, Roth RA (1990) Phosphatidylinositol kinase or an associated protein is substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 265: 396-400

Escobedo JA, Navankassattusas S, Kavanaugh WM, Milfray D, Fried VA, Williams LT (1991) cDNA cloning of a novel p85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF β -receptor. *Cell* 65: 75-82

EURODIAB ACE Study Group (2000) Variations and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 355: 873-876

Fajans SS (1989) Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) *Diabetes/ Metab. Rev.* 5: 579-606

Ferris FL, Davis MD, Aiello LM (1999) Treatment of diabetic retinopathy. *New Engl J Med* 341: 667

Flier JS, Young JB, Landsberg L (1980) Familial insulin resistance with acanthosis nigricans, acral hypertrophy, and muscle cramps. *N Engl J Med* 303(7): 970-973

Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR (1992) Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 267: 22171-22177

Froguel P, Zouali V, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt A, Beckmann JS, Bell GI, Cohen D (1993) Familial Hyperglycemia Due to Mutations in Glucokinase. *N Engl J Med* 328 : 697-702

Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL (1996) Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 α gene. *Genomics* 37: 113-121

Fruman DA, Meyers RE, Cantley L (1998) Phosphoinositide Kinases. *Ann Rev Biochem* 67: 481-507

Fry MJ, Panayotou G, Dhand R et al. (1992) Purification and characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase complex from bovine brain by using phosphopeptide affinity columns. *Biochem J* 288: 383-393

Fujita Y, Chacra AR, Herron AJ, Seltzer H (1975) Influence of antecedent carbohydrate intake on the biphasic insulin response to intravenous glucose. *Diabetes* 24: 1072-1080

Fuller JH, Stevens LK, Wang SL, WHO Multinational Study Group (2001) Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: The WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia* 44 [Suppl 2]: 54-64

Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, Cooper ME (1998) Expression of Transforming Growth Faktor- β 1 and Type IV Collagen in Renal Tubulointerstitium in Experimental Diabetes. *Diabetes* 47: 414-422

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95: 2195-2204

Gout I, Dhand R, Panayotou G et al. (1992) Expression and characterization of the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase complex and a related p85-Beta protein by using the Baculovirus expression system. *Biochem J* 288: 395-405

Granner DK, O'Brien RM (1992) Molecular Physiology and Genetics of NIDDM. *Diabetes Care* 15: 369-388

Häring HU (1991) The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 34: 848-861

Häring HU, Obermaier-Kusser B (1990) The insulin receptor: its role in insulin action and the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Ann* 5: 537-567

Haffner SM (1998) Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 21 (Suppl 3): C3-6

Haffner SM, Letho S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339: 229-234

Hansen T, Andersen CB, Echwald SM, Urhammer SA, Clausen JO, Vestergaard H, Owens D, Hansen L, Pedersen O (1997) Identification of a Common Amino Acid Polymorphism in the p85 α Regulatory Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Diabetes* 46: 494-501

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH (1987) Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. populations aged 20-74 yr. *Diabetes* 36: 523-534

Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF, Hsuan JJ, Courtneidge SA, Parker PJ, Waterfield MD (1992) Phosphatidylinositol 3-Kinase: Structure and Expression of the 110kd Catalytic Subunit. *Cell* 70: 419-429

Holman GD, Kasuga M (1997) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40: 991-1003

Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn B, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell G (1997) Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Gen* 17: 384

Inukai K, Funaki M, Ogihara T et al. (1997) p85 α gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) p50 α , p55 α and p85 α , with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 272: 7873-7882

Inukai K, Anai M, Breda EV, Hosaka T, Katagiri H, Funaki M, Fukushima Y, Ogihara T, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (1996) A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternatively splicing of the p85 α gene. *J Biol Chem* 271: 5317-5320

Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gordon P, Martin MM, Roth J (1976) The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin receptor disorder in man. *N Engl J Med* 294: 739

Kahn CR (1994) Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type 2 diabetes. *Diabetes* 43: 1066-1084

Kaplan DR, Whitman M, Schaffhausen B, Pallas DC, White M, Cantley L, Roberts TM (1987) Common Elements in Growth Factor Stimulation and Oncogenic Transformation: 85 kd Phosphoprotein and Phosphatidylinositol Kinase Activity. *Cell* 50: 1021-1029

Karjalainen J, Martin MJ, Knip M, et al. (1992) A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 327: 302-307

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR (1982) Insulin Stimulates the Phosphorylation of the 95000-Dalton subunit of its Own Receptor. *Science* 215: 185-187

Kausch CH, Bergemann CH, Hamann A, Matthaei S (1999) Insulin-mediated pseudoacromegaly in a patient with severe insulin resistance: Association of defective insulin-stimulated glucose transport with impaired phosphatidylinositol 3-kinase activity in fibroblasts. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 148-154

Kawanishi M, Tamori Y, Masugi J et al. (1997) Prevalence of a polymorphism of the phosphatidylinositol 3-kinase p85 α regulatory subunit (codon 326(Met \rightarrow Ile)) in Japanese NIDDM patients. *Diabetes Care* 20: 1043

Kishimoto M, Sakura H, Hayashi K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kasuga M, Kadowaki T (1992) Detection of mutations in the human insulin gene by single strand conformation polymorphisms. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1027-1031

Klein R, Klein BEK, Moss SE (1989) The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic retinopathy: a review. *Diabetes Metab Rev* 5: 559-570

Kyvik KO, Green A, Beck-Nielsen H (1995) Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *Br Med J* 311: 913-917

Laakso M (1999) Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 937-942

Laakso M, Letho S (1997) Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev* 5: 294-315

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997) The 60-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Adipocytes Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *J Biol Chem* 272: 11439-11443

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997) A Novel 160-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Embryonic Kidney Cells Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *J Biol Chem* 272: 21403-21407

Ledermann HM (1995) Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed. *Lancet* 345: 648

Lee ET, Keen H, Bennett PH, Fuller JH, Lu M, WHO Multinational Study Group (2001) Follow-up of the WHO multinational study of vascular disease in diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia* 44 [Suppl 2]: 3-13

Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependant diabetes mellitus. *New Engl J Med* 329: 1988-1993

Macara IG, Marinatti GV, Balduzzi PC (1984) Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: possible role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(9): 2728-2732

Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, et al. (1999) Only Multiple Autoantibodies to Islet Cells (ICA), Insulin, GAD65, IA-2 and IA-2 β Predict Immune-mediated (Type 1) Diabetes in Relatives. *J Autoimmun* 12: 279

Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS (1999) Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Gen* 23: 323-328

Medici F, Hawa M, Ianari A, Pyke DA, Leslie RDG (1999) Concordance rate for NIDDM in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia* 42: 146-150

Molz L, Chen YW, Hirano M, Williams LT (1996) Cpk is a novel class of Drosophila ptdins 3-kinase containing a C2 domain. *J Biol Chem* 271: 13892-13899

Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H, WHO Multinational Study Group (2001) Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia* 44 [Suppl 2]: 14-21

Newman B, Selby JV, King MC, Fabsitz R, Friedman GD (1987) Concordance for Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30: 763-768

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 269: 3568-3573

Olafsky JM (1990) The insulin receptor: A multifunctional protein. *Diabetes* 39: 1009-1016

Otsu M, Hiles I, Gout I, Fry MJ, Ruiz-Larrea F, Panayotou G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty N, Smith AD, Morgan SJ, Courtneidge SA, Parker PJ, Waterfield MD (1991) Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosin kinases, middle-T/pp60^{C-src} complexes, and PI 3-Kinase. *Cell* 65: 91-104

Permutt MA (1991) Use of DNA polymorphism for genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 5: 495-526.

Petersen JS, Kyvik KO, Bingley PJ, Gale EA, Green A, Dyrberg T, Beck NH (1997) Population based study of prevalence of islet cell autoantibodies in monozygotic and dizygotic twin pairs with insulin dependent diabetes mellitus. *Br Med J* 314: 1575-1579

Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston (1996) Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus – a genetically programmed failure of the beta-cell to compensate for insulin resistance. *New Engl J Med* 334: 777-783

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fischer TL, Myers MG, Sun XJ, White MF (1995) The structure and function of P55^{PIK} reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 15: 4453-4465

Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H (1999) Heritability of Typ II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance – a population-based twin study. *Diabetologia* 42: 139-145

Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607

Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliot RB, Eisenbarth GS (1999) Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twins. *Br Med J* 318: 698-702

Rich SS (1990) Mapping genes in Diabetes. *Diabetes* 39: 1315-1319

Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP (1999) Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 819-825

Rudermann NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC (1990) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1411-1415.

Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE (1997) Vascular Hypertrophy in Experimental Diabetes. *J Clin Invest* 99: 1016-1027

Seino S, Seino M, Bell GI (1990) Human Insulin-receptor Gene. *Diabetes* 39: 29-133

Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG et al. (1998) Immunological heterogeneity in typ 1 diabetes: Presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* 41: 891-897

Shaw JTE, Purdie DM, Neil HAW, Levy JC, Turner RC (1999) The relative risks of hyperglycaemia, obesity and dyslipidaemia in the relatives of patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 24-27

Sheperd PR, Navé BT, Rahilly SO (1996) The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signalling. *J Mol Endocrinol* 17: 175-184

Sheperd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490

Sheperd PR, Navé BT, Rincon J, Nolte LA, Bevan AP, Siddle K, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H (1997) Differential Regulation of Phosphoinositide 3-Kinase Adapter Subunit Variants by Insulin in Human Skeletal Muscle. *J Biol. Chem.* 272: 19000-19007

Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, Shirotani T, Matsumoto K, Yoshizato K, Kawashima J, Hirashima Y, Miyamura N, Kahn CR, Araki E (2002) Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 174: 309-319

Shoelson SE, Chatterjee S, Chaudhuri M, White MF (1992) YMXM motifs of IRS-1 define the substrate specificity of insulin receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2027-2031

Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, Schlessinger J (1991), Cloning of PI3 Kinase-Associated p85 Utilizing of Novel Method for Expression/Cloning of Target Proteins for Receptor Tyrosine Kinases. *Cell Vol* 65: 83-90

Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17: 138-139

Sugimoto Y, Whitman M, Cantley L, Erikson RL (1984) Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci* 81: 2117-2121

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers Jr MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377: 173-177

Taub R, Roy A, Dieter R, Koontz J (1987) Insulin as a growth Factor in Rat Hepatoma Cells. *J Biol Chem* 262: 10893-10897

Taylor SI (1992) Lilly lecture: molecular mechanisms of insulin resistance: lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 41: 1473-1490

Taylor SI, Accili D, Cama A, Imano E, Kadowaki H, Kadowaki T (1991) Unusual Forms of Insulin Resistance. *Annu Rev Med* 42: 373-379

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* 21: 230-235

Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR (2002) Molecular Balance between the Regulatory and Catalytic Subunits of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cell Signaling and Survival. *Mol and Cell Biol* 22: 965-977

Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G, Waterfield M (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K et al. (1997) p110 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leucocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4330-4335

Vanhaesebroeck B, Higashi K, Raven C, Welham M, Anderson S, Brennan P, Ward SG, Waterfield MD (1999) Autophosphorylation of p110 δ phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *The EMBO Journal* 18: 1292-1302

Van Horn DJ, Myers MG, Backers JM (1994) Direct Activation of the Phosphatidylinositol 3'-Kinase by the Insulin Receptor. *J Biol Chem* 269: 29-32

Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P (1995) A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosom 12q. *Nat Gen* 9: 418-423

Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouaii H, Lesage S, Velho G, Iris F, Passa PH, Froguel P, Cohen D (1992) Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356: 721-722

Virbasius JV, Guilhermes A, Czech MP (1996) Mouse p170 is a novel phosphatidylinositol 3-kinase containing a C2 domain. *J Biol Chem* 271: 13304-13307

White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR (1988) A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem* 263(6): 2969-2980

White MF, Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269: 1-4

Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332: 644-646

Whitehead JP, Humphreys PJ, Soos MA, Baynes KC, Kumar S, Harvey T, O'Rahilly S (1998) Impaired activation of phosphoinositide 3-kinase by insulin in fibroblasts from patients with severe insulin resistance and pseudoacromegaly. A disorder characterized by selective postreceptor insulin resistance. *J Clin Invest* 101(5): 1111-1120

Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM (1985) Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 315: 239-242

Whitman M, Kaplan DR, Roberts TM, Cantley L (1987) Evidence of two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts. *Biochem J* 247: 165-174

Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L (1988) Type I phosphoinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphoinositol-3-phosphate. *Nature* 332: 644-646

Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR (1992) The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor mediated activities. *J Biol Chem* 267: 13719-13727

Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF (1992a) Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem* 267: 16660-16668

Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1436: 127

Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384: 458-459

Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Turner RC, Velho G, Chèvre JC, Froguel P, Bell GI (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384: 455-457

Yeh JI, Gulve EA, Rameh L, Birnbaum MJ (1995) The effects of Worthmannin on Rat Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 270: 2107-2111

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL (1979) Isolation of a Virus from the Pancreas of a Child with Diabetic Ketoacidosis. *New Engl J Med* 300: 1173-1179

Yoon JW (1991) Role of Viruses in the Pathogenesis of IDDM. *Ann Med* 23: 437-445

7 Abkürzungen

AGE	Advanced glycation end product
AM	Arithmetisches Mittel
Arg	Arginin
BMI	Body Mass Index
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
g	Gramm
GADA	Glutamat-Decarboxylase-Autoantikörper
Gln	Glutamin
HDL	High-density lipoprotein
HNF	Hepatic nuclear factor
IAA	Insulin-Autoantikörper
ICA	Inselzell-Autoantikörper
Ile	Isoleucin
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrate
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LDL	Low-density lipoprotein
M	molar
mA	Milliampere
Medped	Make early diagnosis prevent early death
Met	Methionin
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
MODY	Maturity onset diabetes of the young

µl	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor
PI 3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
Rpm	Umdrehungen pro Minuten
s	Standardabweichung
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
TBE	Trisbase mit Borsäure und Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
V	Volt
VLDL	Very low-density lipoprotein

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Beisiegel für die Überlassung des Themas sowie für die Hilfestellung bei aufgetretenen Problemen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei PD Dr. David Evans und Dr. Frank Schnieders für die wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit sowie bei allen weiteren Mitarbeitern des Labors, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Simone Brecht
Anschrift	Dorotheenstr. 118 D-22301 Hamburg
E-mail	BrechtSimone@web.de
Geburtsdatum/-ort	19.01.1965/Ettlingen

Ausbildung und Hochschulstudium

1984	Allgemeine Hochschulreife, Goethe-Gymnasium, Karlsruhe
1985	Sprachaufenthalt in den USA
1986 – 1990	Studium der Politischen Wissenschaft, Volkswirtschaft und Afrikanistik, Rheinische-Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn und Universität Hamburg
1991 – 1994	Ausbildung zur Krankenschwester im Allgemeinen Krankenhaus St. Georg, Hamburg
1995 – 2003	Studium der Humanmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
November 2003	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

1. Tertial	Innere Medizin: Hope Hospital, Manchester, England
2. Tertial	Chirurgie: King's College Hospital, London, England Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
3. Tertial	Anästhesie: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australien

Berufstätigkeit

05/04-12/06	Ärztin in der Klinik für Innere Medizin, Städtisches Klinikum, Oldenburg
Seit 01/07	Ärztin in der Klinik für Innere Medizin, Städtisches Klinikum, Lüneburg

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um die Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 21. Januar 2007

Simone Brecht