

Aus der Abteilung für Molekulare Zellbiologie
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. Ulrike Beisiegel

**Assoziationen des Prolin 12 Alanin-Polymorphismus
im Gen des Peroxisomenproliferator-
Aktivierten Rezeptor gamma 2 (PPAR γ 2)
mit Hyperlipoproteinämie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Vasilios Papadopoulos
aus Berlin
Hamburg, 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1-22
1.1 Lipoproteine.....	1
1.1.1 Chylomikronen.....	2
1.1.2 VLDL.....	2
1.1.3 LDL.....	3
1.1.4 HDL.....	4
1.2 Stoffwechsel der Lipoproteine.....	4
1.2.1 Der exogene Weg.....	5
1.2.2 Der endogene Weg.....	5
1.2.3 Reverser Cholesterintransport.....	6
1.3 Apolipoproteine.....	7
1.4 Lipoproteinlipase.....	8
1.5 PPARs.....	9
1.5.1 Funktion und Bedeutung.....	9
1.5.2 Vorkommen.....	11
1.5.3 PPAR γ	11
1.5.4 PPAR α	13
1.5.5 PPARs: Zielgene und ihre Rolle im Lipid- sowie Glucosestoff- wechsel.....	14
1.5.6 PPARs und Entzündung.....	15
1.5.7 PPARs und Atherosklerose.....	16
1.5.8 PPARs und Kanzerogenese.....	16
1.5.9 Polymorphismen im PPAR γ -Gen.....	17
1.6 Hyperlipoproteinämien.....	18
1.7 Metabolisches Syndrom.....	19
1.8 Diabetes mellitus.....	19
1.9 Adipositas.....	21
1.10 Arbeitshypothese.....	22

2. Material und Methoden.....	23-46
2.1 Einführung.....	23
2.2 Patientengut.....	24
2.2.1 Gesamt-Hyperlipoproteinämie Kollektiv.....	25
2.2.2 Hyperlipoproteinämie-Untergruppen.....	26
2.2.3 Non-HLP-Kollektiv.....	27
2.2.4 Adipositas Kollektiv.....	28
2.2.5 Diabetes Kollektiv.....	29
2.2.6 Vergleich der Kollektive.....	29
2.3 Materialien.....	30
2.4 Bearbeitung des „buffy-coats“ beziehungsweise Bestimmung des PPARγ2-Genotypen.....	32
2.4.1 DNA-Extraktion.....	33
2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	34
2.4.2.1 Amplifizierung des Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens..	36
2.4.2.2 Probleme bei der Durchführung der PCR	38
2.4.3 Restriktionsenzymverdau.....	38
2.4.4 Gel-Elektrophorese.....	40
2.4.4.1 Gelherstellung.....	40
2.4.4.2 Elektrophorese.....	41
2.4.4.3 Gelfärbemethoden.....	41
2.4.4.4 Ethidiumbromidfärbung.....	42
2.4.4.5 Silberfärbung.....	42
2.5 Statistische Berechnungen.....	44
2.5.1 Bestimmung der Allelfrequenzen.....	44
2.5.2 Hardy-Weinberg-Gesetz.....	44
2.5.3 Chi-Quadrat-Test.....	45
2.5.4 Mann-Whitney-U-Test.....	45
3. Ergebnisse.....	46-76
3.1 Einführung.....	46
3.2 Verteilung des PPARγ2-Genotypen im Gesamtkollektiv.....	46
3.2.1 PPAR γ 2-Genotypverteilung bei Männern und Frauen.....	47

3.2.2	Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz.....	48
3.2.3	Assoziationen des PPAR γ 2-Genotypen mit klinischen Daten.....	48
3.2.4	Zusammenfassung der PPAR γ 2-Verteilung im Gesamtkollektiv.....	50
3.3	Analyse der Patientenkollektive.....	50
3.3.1	Vergleich der Allelfrequenzen in den sieben Kollektiven.....	52
3.3.2	Zusammenfassung der Analyse der Patientenkollektive.....	55
3.4	PPARγ2-Genotyp und Stoffwechselkrankheiten.....	55
3.4.1	PPAR γ 2-Genotyp und Lipidstoffwechsel.....	55
3.4.1.1	Parameter im Hyperlipoproteinämie-Gesamtkollektiv.....	57
3.4.1.2	Unterteilung des Hyperlipoproteinämie-Gesamtkollektivs und Analyse der klinischen Werte.....	58
3.4.1.2.1	Parameter im Hypercholesterinämie-Kollektiv.....	58
3.4.1.2.2	Parameter im Hypertriglyzeridämie-Kollektiv.....	59
3.4.1.2.3	Parameter im Kollektiv mit gemischter Hyperlipoproteinämie.....	60
3.4.2	PPAR γ 2-Genotyp und Diabetes mellitus Typ2.....	61
3.4.3	Zusammenfassung der Untersuchung zu den Stoffwechselkrank- heiten.....	62
3.5	PPARγ2-Genotyp und BMI.....	62
3.5.1	Allelfrequenzen nach BMI-Kategorien.....	63
3.5.2	Parameter von Adipösen, Übergewichtigen, Normalgewichtigen und Patienten ohne Hyperlipoproteinämie.....	65
3.5.2.1	Patienten mit Adipositas.....	65
3.5.2.2	Patienten mit Übergewicht.....	66
3.5.2.3	Normalgewichtige Patienten.....	67
3.5.2.4	Non-HLP-Kollektiv.....	68
3.5.3	Zusammenhang zwischen BMI und Alter beim PPAR γ 2-Genotypen.....	69
3.5.3.1	Allelfrequenzen nach Einteilung in BMI-Kategorien bei Patienten unter 45 Jahren.....	70
3.5.3.2	Parameter der Patienten unter 45 Jahre.....	71
3.5.3.3	Allelfrequenzen nach Einteilung in BMI-Kategorien bei Patienten über 45 Jahre.....	72
3.5.3.4	Parameter der Patienten ab 45 Jahre.....	74
3.5.4	Zusammenfassung der Untersuchung zum BMI.....	74

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
4. Diskussion.....	77-89
4.1 Einführung.....	77
4.2 Allelfrequenzen.....	77
4.3 Assoziationen mit Stoffwechselkrankheiten.....	81
4.3.1 PPAR γ 2 und Lipidwerte.....	81
4.3.2 PPAR γ 2 und Diabetes mellitus Typ2.....	84
4.4 Assoziationen mit dem BMI.....	86
4.5 Perspektiven.....	89
5. Zusammenfassung.....	90
6. Literaturverzeichnis.....	91-111
7. Abkürzungsverzeichnis.....	112-116
8. Danksagung.....	117
9. Lebenslauf.....	118
10. Erklärung.....	119

1. Einleitung

1.1 Lipoproteine

Lipoproteine sind kugelförmige Gebilde, die kleiner als rote Blutzellen sind und insofern nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sichtbar werden. Sie bestehen aus Lipiden, deren wichtigste Vertreter Triglyzeride, Cholesterin und Phospholipide sind und einem Proteinanteil, den sogenannten Apolipoproteinen (siehe 1.3).

Durch Assoziation an Proteine werden Lipide löslich und dienen als Bausteine in der Zielzelle oder werden durch spezifische Enzyme hydrolisiert und so als Energie zur Verfügung gestellt (*Beisiegel u. Patsch 1995, Kostner u. März 2001*).





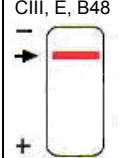



Dichteklasse	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL	
S_r	0,9 g/ml 10^5	400	1,006 g/ml 20	1,063 g/ml 0	1,21g/ml
Form und Durchmesser	 100-1000 nm	 30-70 nm	 15-25 nm	 7,5x10 nm	
Lipid/Proteinverhältnis	99/1	90/10	78/22	50/50	
Apolipoprotein	A1, AIV, CI-CIII, E, B48	CI, CII, CIII, E, B100	B100 (C, E)	A1, AII, AIV CI-CIII, E	
Elektrophorese					
	Chylomikronen	Prä-β-Lipoproteine	β-Lipoproteine	α-Lipoproteine	

Abb.1 Einteilung und Eigenschaften der Serumlipoproteine; aus *Löffler u. Petrides 1997*.

Die im Plasma vorkommenden Lipoproteine werden nach einer Reihe unterschiedlicher Kriterien wie z.B. Dichte, Partikelgröße, Lipid- und Proteinverhältnis sowie Ladung eingeteilt (Abb. 1). Aufgrund ihrer Dichte können sie mittels Ultrazentrifuge in „very low density lipoproteins“ (VLDL), „low density lipoproteins“ (LDL), „high density lipoproteins“ (HDL) und Chylomikronen eingeteilt werden (*Gofman et al.* 1954)

1.1.1 Chylomikronen

Chylomikronen haben eine Dichte von 0,93 g/ml, einen Durchmesser von 100-1000nm und einen Triacylglycerinanteil von 86 %. Damit stellen sie die größten und auch triacylglycerinreichsten aller im Plasma vorkommenden Lipoproteine dar.

Sie entstehen in den Mukosazellen des Dünndarms. Die im Darmlumen aus den Triglyceriden entstandenen Mono- und Diglyceride sowie freies Glycerin werden in den Mukosazellen wieder mit Fettsäuren verestert und die gebildeten Triglyceride zusammen mit Cholesterin und Phospholipiden sowie den in der Darmmukosa synthetisierten Apolipoproteinen B-48, A-I, A-II und A-IV zu Chylomikronen zusammengesetzt. Diese werden in sogenannten Sekretgranula gespeichert und durch Exocytose in den extrazellulären Raum gegeben. Hier sammeln sie sich in den intestinalen Lymphgängen und gelangen über den Ductus thoracicus zum Kreislauf.

Ihre Hauptaufgabe besteht in dem Transport von mit der Nahrung aufgenommenen Triacylglycerinen und anderen Lipiden sowie fettlöslichen Vitaminen (siehe 1.2.1) (*Beisiegel u. Patsch* 1995, *Beisiegel et al.* 1989, 1994, 1995).

Der Abbau der Chylomikronen erfolgt zunächst in den Kapillaren, wo sie durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) (siehe 1.4) zu CR gespalten werden. Dieses „Überbleibsel“ gelangt zur Leber, wo über spezifische Rezeptoren eine Internalisierung und damit schließlich ein Abbau dieses Restpartikels erfolgt (siehe auch 1.2.1).

1.1.2 VLDL

Die VLDL werden entsprechend ihrer Mobilität in der Elektrophorese als Präbeta-lipoproteine bezeichnet. Ihre Dichte beträgt 0,93-1,006 g/ml bei einem Durchmesser von 30-80 nm.

Sie entstehen in der Leber durch Komplexion von Apo B-100 mit Lipiden, vor allem Triglyzeriden und Cholesterinestern (*Dargel 1991, Niemeier et al. 1996*). Die endgültige Reifung der VLDL erfolgt dann im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat von wo sie auch sezerniert werden.

Ihre Aufgabe besteht in dem Transport von endogen in der Leber gebildeten Triglyzeriden in die Peripherie (siehe 1.2.2).

Der Abbau erfolgt äquivalent zu dem der Chylomikronen. Nach der Sekretion kommt es zu Veränderungen ihrer Oberflächenstruktur und letztlich durch Wechselwirkung mit HDL-Partikeln zu einer Anreicherung mit den Apolipoproteinen E und C, besonders C-II, als Aktivator der LPL. Diese baut die VLDL-Partikel am Kapillarendothel ab, wobei Partikel intermediärer Dichte, die IDL (siehe auch 1.2.2), entstehen und daraus in der Leber die LDL-Partikel gebildet werden.

1.1.3 LDL

Die cholesterinreichen LDL-Partikel sind mehrschichtig aufgebaut und haben einen Durchmesser von 22 nm und eine Masse von ca. 3000 kDa.

LDL entstehen im zirkulierenden Blut durch Abbau der VLDL (siehe 1.1.2) (*Hevonoja et al. 2000*).

Sie versorgen extrahepatisches Gewebe mit Cholesterin und regulieren die Cholesterinhomöostase in den peripheren Geweben. Die Aufnahme von LDL und damit auch die von Cholesterin in die Zellen wird durch Rezeptoren gesteuert, den sogenannten LDL-Rezeptoren, deren Ligand Apo B-100 ist. Liegt ein Defekt dieser Rezeptoren vor, muss das nur unzureichend aufgenommene Cholesterin durch Makrophagen (oder anderen Zellen des RES) abgebaut werden, welche wiederum in den Gefäßwänden zu Schaumzellen entarten können. Die LDL nehmen folglich eine Schlüsselrolle in der Atherogenese ein (*Brown u. Goldstein 1977, 1983, 1996*).

Der Abbau der LDL erfolgt rezeptorvermittelt und zwar nach Bildung eines LDL-Rezeptorkomplexes, welcher über den Vorgang der Endocytose in die Zelle eingeschleust wird. Die den LDL-Rezeptor enthaltenden Endosomen vereinigen sich mit den Lysosomen, in denen die Apoproteine abgebaut und die Cholesterinester gespalten werden. Der Rezeptor kehrt in die Membran zurück, das in das Cytosol freigesetzte Cholesterin wird danach in die zellulären Membranen eingebaut oder für

enzymatische Umwandlungen benutzt. Um eine Überspeicherung von Cholesterin in der Zelle zu verhindern, wirkt ein hoher Spiegel von Cholesterin hemmend auf die Synthese des LDL-Rezeptors (*Kostner u. März 2001*).

1.1.4 HDL

Die HDL, in Leber und Darm gebildet und im Plasma modifiziert, werden ihrer Mobilität in der Elektrophorese entsprechend als Alpha-Lipoproteine bezeichnet. Es können je nach Gehalt an Apolipoproteinen sowie Lipiden zwei HDL-Fractionen unterschieden werden, die als HDL₂ und HDL₃ bezeichnet werden (*Assmann 1982, Dargel et al. 1991*).

Ihre Hauptaufgabe besteht in der Rückführung des Cholesterins (1.2.3) aus dem peripheren Gewebe zur Leber, wo es dann zusammen mit Gallensäuren ausgeschieden wird. Sie stellen einen Gegenspieler der LDL dar, indem sie den Zellen bzw. atherosklerosegefährdeten Gefäßwänden Cholesterin entziehen und so eine antiatherogene Wirkung besitzen (*Kostner u. März 2001*). Entsprechend bedeutet hohes HDL-Cholesterin ein vermindertes und niedriges HDL ein erhöhtes Atheroskleroserisiko.

Die Endstrecke der HDL zeichnet sich in der Leber ab, wo sie zunächst an einem Rezeptor der Parenchyzellen gebunden, danach durch Endocytose internalisiert und schließlich abgebaut werden.

1.2 Stoffwechsel der Lipoproteine

Wie bereits unter Punkt 1.1 beschrieben, bilden Cholesterin, Triglyzeride, Phosphatide und Apolipoproteine wichtige Bausteine der Lipoproteine. Dabei nehmen die Triglyzeride unter den Lipidbestandteilen der Nahrung den größten Teil ein. Weiterhin kommen Phospholipide, Sphingolipide, freies und verestertes Cholesterin, Terpen-derivate, freie Fettsäuren und lipidlösliche Vitamine vor (*Julius U 1995*).

Innerhalb des Lipoproteinstoffwechsels können drei zentrale Wege beschrieben werden, der exogene, endogene (*Brown u. Goldstein 1986*) und reverse Cholesterintransport (*Miller et al. 1985*).

1.2.1 Der exogene Weg

Der exogene Weg ist durch die Aufnahme, Verdauung und Resorption von Nahrungsfetten und lipidlöslichen Vitaminen gekennzeichnet. Nach dem Verdau der Fettbestandteile werden diese im Duodenum (proximale Teil des Dünndarms) resorbiert. Es entstehen zunächst erneut Triglyzeride in den Enterozyten, die durch Assoziation von Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen die Chylomikronen bilden, welche über den Ductus thoracicus (Lymphbahn) in die Blutbahn transportiert werden. In den Kapillaren werden die Chylomikronen durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) zu CR gespalten, die dabei frei werdenden Fettsäuren werden je nach Energiebedarf entweder im Fettgewebe gespeichert oder im Muskel oxidiert und direkt zur Energiegewinnung genutzt. Die Chylomikronen nehmen im Laufe der Lipolyse Cholesterinester, Apo C-I, -II, -III und Apo E auf und geben Triglyzeride sowie Phospholipide, Apo A-I, -II und -IV als sogenannte „surface remnants“ (Oberflächen-Überbleibsel) an die HDL ab (siehe Abb. 2) (Havel *et al.* 1978). Die dabei entstehenden CR verfügen über wichtige Proteinbausteine, zum einen über das Apo B-48, das als Strukturprotein fungiert, zum anderen über das Apo E, welche Liganden des LDL-Rezeptor (LDL-R) und des LDL-Rezeptor-Related Protein (LRP) sind (Beisiegel *et al.* 1995). Zusätzlich hat die LPL einen additiven Effekt auf die Rezeptorbindung des Apo E, indem sie die Aufnahme der CR in die Leberzellen stimuliert (Mann *et al.* 1995). Zu einem gewissen Teil wird das verbleibende Cholesterin in Gallensäuren umgewandelt und wie die Phospholipide über die Galle in den Dünndarm ausgeschieden. Der größte Teil der Gallensäuren allerdings wird über den enterohepatischen Kreislauf unter Bildung von Chylomikronen wieder aufgenommen.

1.2.2 Der endogene Weg

Das endogen gebildete Fett stammt aus der Leber, die aus überschüssigen Nahrungskalorien (vorwiegend Kohlenhydrate) VLDL synthetisiert und in den Kreislauf sezerniert. Der Triglyzeridanteil der VLDL wird wie bei den Chylomikronen durch die endothelständige, Apo C-II-aktivierte Lipoproteinlipase freigesetzt und den verschiedenen Geweben zugeführt. Die verbleibenden cholesterinreichen Bestandteile

der VLDL, die Lipoproteine mittlerer Dichte (intermediate density lipoproteins = IDL) werden zur Hälfte wieder zur Leber transportiert, der andere Teil wird intravasal in LDL umgewandelt (siehe Abb. 2) (Brown u. Goldstein 1983, 1986).

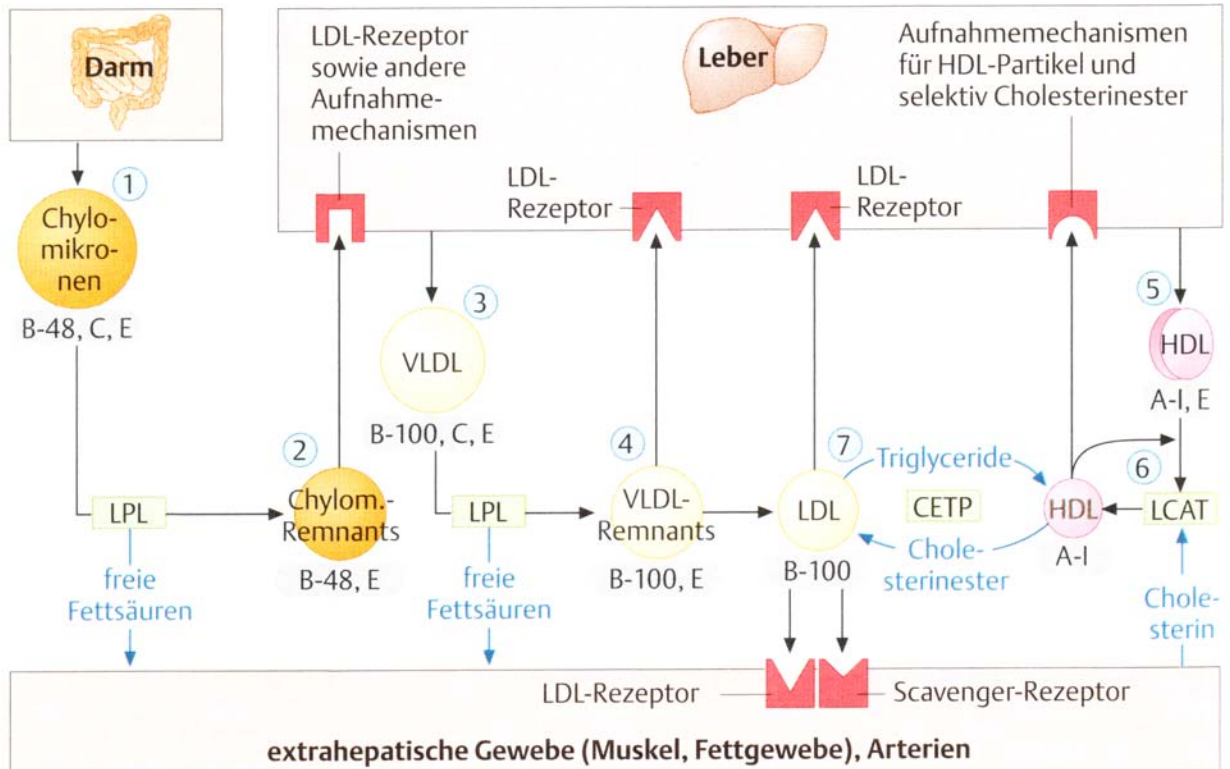


Abb. 2 Wesentliche Stoffwechselwege der Lipoproteine im Plasma. CETP = Cholesterinester-Transferprotein; LCAT = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase; LPL = Lipoproteinlipase.

1.2.3 Reverser Cholesterintransport

Die Rückführung des Cholesterins (Reverser Cholesterintransport) aus dem peripheren Gewebe zur Leber wird durch die HDL übernommen (siehe 1.1.4). Die HDL₃-Fraktion nimmt überschüssiges Cholesterin auf, wobei HDL₂ entsteht. Dieses Cholesterin wird durch die sogenannte Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert, so dass die Chylomikronen in der Lage sind, Cholesterinester aufzunehmen. Diese Acyltransferase gewährleistet einerseits die Übertragung von Fettsäuren der Phospholipide auf Cholesterin, andererseits wird die Phospholipaseaktivität katalysiert, wobei ein Acylrest freigesetzt wird.

Die Resynthese von HDL₃ aus HDL₂ wird durch das Enzym hepatische Lipase gesteuert, so dass diese erneut Cholesterin aus dem peripheren Gewebe aufnehmen können (*Miller et al.* 1985).

1.3 Apolipoproteine

Nach der Definition von Alaupovic sind Apolipoproteine Proteine oder Polypeptide, die mit Lipiden beladen den Ort ihrer Synthese verlassen, wobei ihre Hauptaufgaben in der Stabilisierung von Lipidemulsionen und dem Transport von Lipiden liegen. Nach seiner Nomenklatur (*Alaupovic et al.* 1972) werden diese als Apo A (Polypeptide A-I, A-II, A-IV), Apo B (B-48 und B-100), Apo C (Polypeptide C-I, C-II, C-III) und Apo E bezeichnet (*Hellige et al.* 1995, *Luley u. Wieland* 1995). Sie nehmen nicht nur als Strukturproteine sondern auch als Aktivatoren und Inhibitoren für bestimmte Enzyme und Liganden für Lipoproteinrezeptoren ihre Stellung in der Regulation der Lipidhomöostase ein (*Windler et al.* 1996).

Apo A-I übernimmt wichtige Funktionen im Bereich des reversen Cholesterintransports, wie z.B. die Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren, Mobilisierung des intrazellulären Cholesterins und die Aktivierung der LCAT. Daneben ist es wie Apo A-II ein Strukturprotein der HDL. Desweiteren steuert ApoA-II die Aktivität der hepatischen Lipase und der LCAT.

Das in der Leber synthetisierte Apo B-100 stellt das Strukturprotein der LDL dar. Es stabilisiert unter anderem die VLDL, IDL und LDL und kommt außerdem im Lipoprotein(a) vor [Lp(a)], welches ein aus einem LDL-Molekül und einem Apolipoprotein mit antiplasminogener Wirkung bestehendes Dimer ist und bei Konzentrationen > 30 mg/dl als selbständiger Risikofaktor für Atherosklerose angesehen wird (*Berg* 1990, *Riesen* 2000). In den Chylomikronen und CR wurde ein strukturell dem Apo B-100 ähnliches Protein gefunden, das nur 48 % des Molekulargewichts aufweist und deshalb Apo B-48 genannt wird. Es wird im Darm gebildet und stellt das Strukturprotein der Chylomikronen und der Remnants dar (*Beisiegel et al.* 1995). Seine Aufgabe besteht in der Sekretion der Triglyzeride und des Cholesterins aus der Leber und dem Dünndarm ins Plasma sowie in der Resorption von Lipiden aus der Nahrung.

Die Apolipoprotein C (Apo C)-Familie kann insbesondere in den triglyzeridreichen Lipoproteinen sowie in der Fraktion der CR der HDL vorgefunden werden (*Huff et al. 1990, Sepehrnia et al. 1989*). Während Apo C-II ein Aktivator der LPL ist, nimmt Apo C III eine inhibitorische Funktion ein und hemmt die Bindung triglyzeridreicher Lipoproteine an Rezeptoren der Leber (*Assmann 1982, Huff et al. 1990*). Apo- C-I und C-III modulieren die Interaktion von Chylomikronen- und VLDL-Remnants mit dem LDL-Rezeptor.

Humanes Apo E ist Ligand vieler Lipoproteinrezeptoren, so auch LDL-R, und wird nahezu ubiquitär synthetisiert (mit Ausnahme des Dünndarms). Außerdem beeinflusst es die Aufnahme der Remnantspartikel aus dem Plasma sowie deren Abbau (*Steinmetz u. Kaffarnik 1995*). Von Apo E sind drei Isoformen E2, E3 und E4 bekannt, welche Auswirkungen auf den Abbau der triglyzeridreichen Lipoproteine, die Konzentration der LDL und das Atheroskleroserisiko haben (*Mahley et al. 1989, de Knijff u. Havekes 1996, de Knijff et al. 1994, Davignon et al. 1988*).

1.4 Lipoproteinlipase

Die Hauptaufgabe bzw. enzymatische Funktion der LPL ist die Spaltung der Triacylglycerine in Lipoproteinen zu Fettsäuren und Glycerin. Damit nimmt sie eine Schlüsselrolle im Lipidstoffwechsel ein (*Olivecrona u. Bengsson-Olivecrona 1987*). Sowohl in Zugehörigkeit (Familie der neutralen Lipasen) wie auch in Struktur und Funktion ähnelt sie der pankreatischen Lipase (PL) und hepatischen Lipase.

Das ungefähr 30 kb lange und aus 10 Exons und 9 Introns (*Deep u. Peng 1989, Kirchgessner et al. 1989, Wion et al. 1987*) bestehende Gen befindet sich auf Chromosom 8 und kodiert für ein Glykoprotein von 60 kDa (*Iverius u. Ostlund-Linquist 1976, Wion et al. 1987, Kirchgessner et al. 1989*). Zu den funktionellen Domänen zählen ein katalytisches Zentrum (Exons 4-6), die Proteoglykan- bzw. Heparinbindungsstelle, die Bindungsstellen für Lipoproteine, LRP und Apo C-II (*Bruin et al. 1994*). An Heparinsulfat gebunden, ist sie an dem vaskulären Endothel lokalisiert. Durch intravenöse Injektion von Heparin kann sie aus dieser Bindung gelöst und ihre Aktivität und Masse im Blut gemessen werden (*Julius 1995*). Wie bereits erwähnt erfolgt durch die LPL eine Apo C-II-abhängige, hydrolytische Spaltung von Triglyzeriden aus Chylomikronen und VLDL (*Reina et al. 1992*). Außerdem spielt sie bei

der Bindung von Lipoproteinen an deren Rezeptoren eine Rolle (*Beisiegel et al.* 1989). Weiterhin steigert sie die Aufnahme der Lipoproteine in die Zelle durch partielle Bindung an die CR, wodurch schließlich eine Erhöhung der CR-Clearance erreicht wird (*Beisiegel et al.* 1989, 1994).

Bei der LPL-Defizienz handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der die LPL-Aktivität im Postheparinplasma vollständig (Homozygote) oder fast vollständig (Heterozygote) fehlt. Sie führt ebenso wie die Apo C-II-Defizienz zum klinischen Bild des Chylomikronämie-Syndroms. Im Gegensatz zu Apo C-II-defizienten Patienten haben LPL-defiziente ein intaktes Apo C-II (*Fojo u. Brewer* 1992).

1.5 Peroxisomen-Proliferator-Aktivierte Rezeptoren

1.5.1 Funktion und Bedeutung

Eine Gruppe neuer Transkriptionsfaktoren, sogenannte Peroxisomen-Proliferator-Aktivierte Rezeptoren (PPARs), hat in den letzten Jahren im Bereich der Gefäßbiologie, der Fettstoffwechsel- und Atheroskleroseforschung an Bedeutung gewonnen. Arbeiten aus jüngster Zeit legen darüber hinaus nahe, dass PPARs antiinflammatorische Effekte in vaskulären Zellen haben könnten. Der Name „PPARs“ ist irreführend, weil das Phänomen der Peroxisomenproliferation im humanen System nie gezeigt werden konnte. Zunächst als Rezeptoren für bestimmte lipidsenkende Substanzen identifiziert, die in der Leber von Nagern zur Vermehrung und Vergrößerung von Peroxisomen (Zellorganellen, die Oxidasen und Katalasen beinhalten) führten, haben neuere Studien PPARs als im Zellkern lokalisierte und durch Liganden aktivierbare Transkriptionsfaktoren beim Menschen charakterisiert. Transkriptionsfaktoren sind in der Lage durch spezifische Bindung an eine DNA-Erkennungssequenz (Promoter oder Response-Element) die Expression von Genen zu steuern und können in ihrer Aktivität durch Liganden fördernd oder hemmend beeinflusst werden (*Marx u. Hombach* 2001, *Schoonjans et al.* 1996, *Strachan u. Read* 1996). Nach Aktivierung durch ihre Liganden bilden sie Heterodimere mit einem sogenannten „Retinoid X Receptor“ (RXR) und binden an definierte Erkennungs-

sequenzen (Peroxisome proliferator response elements = PPREs) in der Promoterregion ihrer Zielgene (Abb.3).

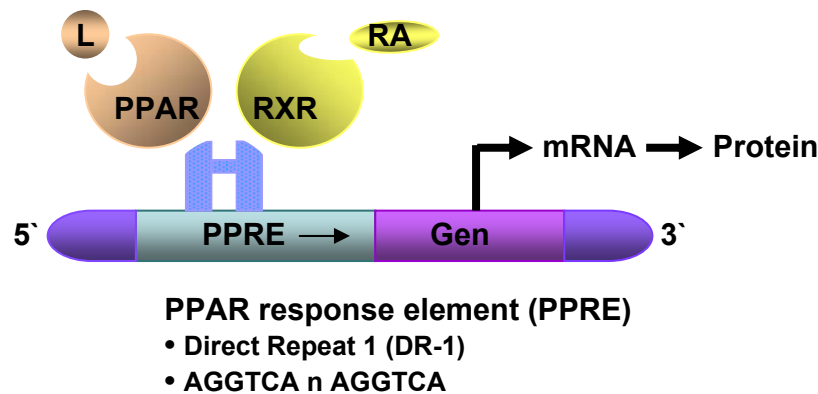


Abb.3 Schematische Darstellung der Wirkung von PPARs auf die Genexpression. Nach Aktivierung durch ihre Liganden „L“ bilden PPARs Heterodimere mit einem anderen nukleären Transkriptionsfaktor, dem „retinoid X Rezeptor“ (RXR). Diese Heterodimere binden an sog. „PPAR response elements“ (PPREs) in der Promoterregion ihrer Zielgene, deren Transkription sie regulieren. PPREs sind spezifische DNA-Sequenzen (direct repeat 1 (DR-1)-Sequenzen), die aus zwei sich wiederholenden Nukleotidsequenzen bestehen, welche durch ein einzelnes Nukleotid „n“ getrennt sind. RA: retinoid acid. Entnommen aus *Marx u. Hombach 2001*.

Diese PPREs gehören in die Kategorie der Direct-repeat 1 Sequenzen (DR-1), das heißt sie bestehen aus zwei Hexanukleotid-Sequenzen, die durch ein einzelnes Nukleotid getrennt sind (Abb.3) (*Fajas et al. 1997, Schoonjans et al. 1996*). Die übereinstimmende Sequenz der PPREs ist 5'-AACT AGGNCA A AGGTCA-3'. Nach der Bindung des dimerischen Rezeptorkomplexes an PPRE wird die Transkription der entsprechenden Zielgene regulierend beeinflusst (*DiRenzo et al. 1997, Dowell et al. 1999, Ijpenberg et al. 1997, Vamecq u. Latruffe 1999, Zamir et al. 1997*), welche mit verschiedenen Aspekten des Lipidmetabolismus und Glukosestoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden, wie der Fettsäureaufnahme bzw. peroxisomalen und mitochondrialen Fettsäureoxidation sowie Insulinresistenz.

1.5.2 Vorkommen

Neben PPAR γ , welches in drei Isoformen 1, 2 und 3 vorgefunden werden kann, existieren verwandte Rezeptoren wie PPAR α und PPAR β bzw. PPAR δ (Auwerx 1999, Marx u. Hombach 2001, Michalik u. Wahli 1999, Schoonjans et al. 1996) (Abb.3). Während PPAR α in Herz, Leber, Niere, Intestinalmukosa und braunem Fettgewebe exprimiert wird, ist PPAR γ 2 hauptsächlich in braunem und weißem Fettgewebe lokalisiert. PPAR γ 1 und PPAR δ kommen dagegen ubiquitär vor und zeigen somit keine Gewebespezifität (Michalik u. Wahli 1999), wohingegen sich die Expression von PPAR γ 3 auf Makrophagen, Dickdarm und Fettgewebe beschränkt. Die PPAR γ -Expression wird neben der gewebeabhängigen Komponente auch durch Ernährung und Fettgewebsmasse beeinflusst. So finden sich erhöhte PPAR γ -Level im Fettgewebe adipöser Menschen und verminderte in dem normalgewichtiger. Zudem führt auch eine hypokalorische Ernährung zu verminderter Expression (Vidal-Puig et al. 1997).

Nachdem wenig über Aktivatoren und Zielgene von PPAR δ bekannt ist, wurde in vorliegendem Abschnitt vornehmlich PPAR γ und PPAR α fokussiert.

1.5.3 PPAR γ

Das menschliche PPAR γ -Gen verfügt über neun Exons, die mehr als 100 Kilobasen genomischer DNA umfassen (Fajas et al. 1997). Im Gegensatz zu Mäusen, wo bisher lediglich zwei Isoformen des PPAR γ vorgefunden wurden (Zhu et al. 1995), konnten beim Menschen drei PPAR γ -mRNA-Isoformen identifiziert werden, die alle durch dasselbe Gen kodiert, aber durch unterschiedliche Promotoren (Ausgangspunkte der Transkription) und Spleißstellen gebildet werden (Fajas et al. 1997, 1998) (Abb. 4). Das Genprodukt von PPAR γ 2 besitzt am N-terminalen Ende 28 zusätzliche Aminosäuren, die von dem einzigen PPAR γ 2-spezifischen Exon B kodiert werden. PPAR γ 1 und 3 besitzen zwar unterschiedliche Sequenzen, kodieren aber für dasselbe Protein PPAR γ 1. So wie bei allen Kernrezeptoren verfügt PPAR γ über eine Regulationseinheit, bestehend aus vier verschiedenen Domänen, einer NH₂-terminalen A/B-Domäne (Auwerx 1999, Michalik u. Wahli 1999), die eine Liganden-unabhängige aktivierende Funktion (AF-1) besitzt, einer C-Domäne, bestehend aus

zwei Zink-Fingern, welche der DNA-Bindung dient (*Krey et al. 1997, Onate et al. 1995*) sowie einer D-Gelenkregion, die eine wichtige Aufgabe im Hinblick auf das Andocken von Kofaktoren übernimmt und der EF COOH-terminalen Region, die unter anderem die Liganden-abhängige aktivierende Funktion (AF-2) übernimmt (*Scchoonjans et al. 1996, Vamecq u. Latruffe 1999*) (Abb. 5). Als funktioneller Unterschied zwischen den ersten beiden Isoformen konnte in diesem Zusammenhang die etwa 5-10fach stärkere Liganden-unabhängige Aktivierung der N-terminalen Domäne von PPAR γ 2 im Gegensatz zu PPAR γ 1, die unter dem Einfluß von Insulin noch deutlicher wird, beschrieben werden (*Werman et al. 1997*).

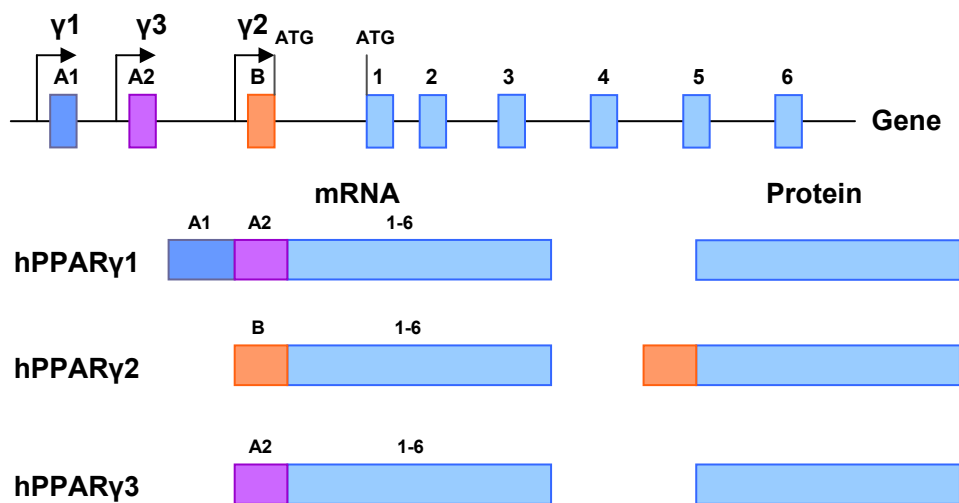


Abb.4 Struktur des humanen PPAR γ -Gens, der PPAR γ -mRNA und des Proteins. Zu erkennen sind die drei Promoter und die verschiedenen Exons. Die drei mRNA-Spezies kodieren für zwei verschiedene PPAR γ -Proteine; h=human, A1, A2 und B = Exons; $\gamma 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$ = PPAR-Rezeptoren. Entnommen aus *Auwerx 1999*.

Natürliche bzw. physiologisch vorkommende Liganden des PPAR γ sind das Prostaglandin D₂-Derivat 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (*Kliwer et al. 1995*) oder bestimmte Formen oxidierter Linolensäure (*Nagi et al. 1998, Tontonoz et al. 1998*) Pharmakologische Liganden eine Gruppe neuer Antidiabetika sogenannte Thiazolidindione, wie Troglitazon, Pioglitazon oder Rosiglitazon (*Forman et al. 1995, Kliwer et al. 1995, Nagy et al. 1998, Tontonoz et al. 1998, Lehmann et al. 1995, Schoonjans u. Auwerx 2000*). Diese neuartige Stoffklasse oraler Antidiabetika vermag einen positiven Effekt auf Insulinresistenz und Hypertriglyzeridämie in Typ2-

Diabetikern auszuüben. PPAR γ ist nicht nur einer der zentralen Mediatoren der Genregulation in der Adipogenese sondern nimmt auch eine wichtige Rolle in der Regulation der intra- und extrazellulären Lipidhomöostase sowie im Glukosestoffwechsel ein (siehe 1.5.5).

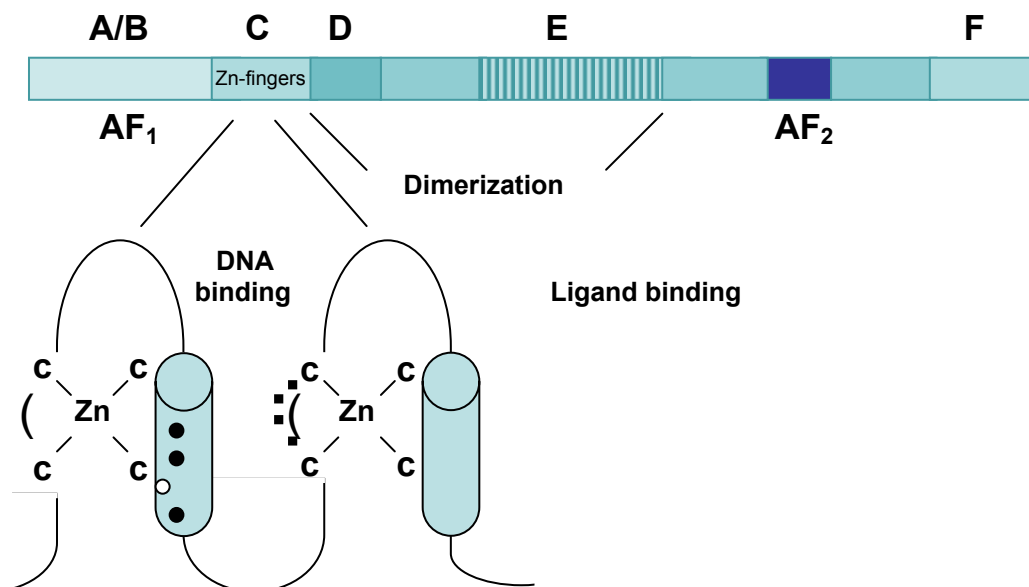


Abb.5 Funktionelle Domänen der Kernrezeptoren. A-F = Funktionelle Domänen; AF₁ und AF₂ Aktivierende Domänen; Entnommen aus Schoonjans *et al.* 1996.

1.5.4 PPAR α

Der Aufbau des PPAR α -Gens gleicht dem der γ -Variante (siehe 1.5.3). Aktivatoren für diesen Rezeptor sind vielfach ungesättigte Fettsäuren, wie Docosahexanoic acid (DHA) oder Eicosatetranoic acid (ETYA) (Kliwer *et al.* 1997) sowie lipidsenkende Fibratderivate, wie Fenofibrat oder Gemfibrozil (Forman *et al.* 1997). Je nach Expressionsgrad reguliert PPAR α unter anderem die Genexpression von Enzymen der Fettsäureoxidation und bestimmter Apolipoproteine (z.B. Apo C-III) (Auboeuf *et al.* 1997, Dowell *et al.* 1997, Kliwer *et al.* 1997) und nimmt so, neben seinem verwandten Rezeptor PPAR γ , seine Stellung im Fettstoffwechsel ein (siehe 1.5.5).

1.5.5 PPARs: Zielgene und ihre Rolle im Lipid- sowie Glukosestoffwechsel

Die PPARs spielen aufgrund ihrer Gewebeverteilung, der Identifikation ihrer Zielgene sowie oben beschriebener Liganden eine zentrale Rolle in der Lipidhomöostase. Da PPAR γ größtenteils im Fettgewebe exprimiert wird, konzentriert sich die Suche nach Zielgenen auf die Adipozyten. Ihre Aufgabe ist es, überschüssige Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern und bei Bedarf als freie Fettsäuren freizusetzen. Das Hormon Insulin übt in diesem Zusammenhang neben seiner blutzuckersenkenden auch eine lipogene Funktion aus. Bei dauerhaft positiver Energiebilanz (Energiezufuhr > Energieverbrauch) kommt es durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten zur Ausbildung von Übergewicht und Adipositas. In den Genen von aP2, einem fettsäurebindenden Protein und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), einem Enzym der Glukoneogenese (beides Marker der terminalen Adipozytendifferenzierung) konnten PPREs identifiziert werden, die wie in 1.5.1 bereits dargestellt, PPAR γ als spezifische DNA-Erkennungssequenzen zur Regulation der Transkription dienen (*Tontonoz et al.* 1995). Daraus wird die besondere Bedeutung von PPAR γ für die Adipozytendifferenzierungskaskade ersichtlich (*Schoonjans et al.* 1997, *Deeb et al.* 1998). Desweiteren übt diese Isoform durch Stimulation der Gene für die Lipoproteinlipase, das Fettsäure-Transportprotein (FATP), die Fettsäuretranslokase (FAT/CD36) sowie das fettsäurebindende Protein (FABP), Einfluss auf Fettsäureabbau, -transport und -aufnahme aus (*Motojima et al.* 1998). Ähnliche Funktionen können in anderen Geweben der PPAR α -Isoform zugeschrieben werden.

Die ersten identifizierten PPAR α -Zielgene kodieren für verschiedene Enzyme, die in der peroxisomalen β -Oxidation involviert sind, wie die Acyl-CoA-Synthetase (*Dreyer et al.* 1992), bifunktionale Enzyme (*Zhang et al.* 1992) und die Thiolase (*Lee et al.* 1995, *Schoonjans et al.* 1995). Außerdem wird der Metabolismus der triglyzeridreichen Lipoproteine (VLDL) von einer PPAR α -abhängigen Stimulation des Lipoproteinlipase-Gens, welches die Fettsäureabgabe von Lipoprotein-Partikeln fördert, sowie durch eine PPAR α -abhängige Downregulation des Apo C-III, das die Plasma-Triglyzerid-Clearance inhibiert, gesteuert (*Desvergne u. Wahli* 1999). Zudem konnten PPREs des α -Rezeptors außer in den Genen von Apo A-I -und A-II auch in der zur Cytochrom-Familie gehörenden P450 ω -Hydroxylase (einem in der Cholesterinbiosynthese beteiligten Enzymsystem) nachgewiesen werden, was einerseits über eine Über-

expression dieser Apolipoproteine zu einer Konzentrationserhöhung des Plasma-HDL-Cholesterins führt, andererseits Auswirkungen auf den mitochondrialen Fettsäuremetabolismus (*Brandt et al. 1998, Mascaro et al. 1998 Muerhoff et al. 1992, Aldridge et al. 1995*), die Ketogenese (*Rodriguez et al. 1994*) und die mikrosomale ω -Fettsäure-Hydroxylierung hat (*Schoonjans et al. 1996, 1996*).

PPARs werden aber nicht nur mit dem Lipid- und Glukosestoffwechsel in Zusammenhang gebracht, sondern scheinen auch eine Rolle in Bezug auf die Entstehung von Atherosklerose, Entzündungen und Kanzerogenese zu spielen (näheres siehe 1.5.6-1.5.8).

Die funktionelle Zuordnung von PPAR δ/β ist aufgrund seines ubiquitären Vorkommens sowie bisher nicht beschriebener Zielgene schwierig.

1.5.6 PPARs und Entzündung

Sowohl PPAR γ als auch PPAR α nehmen regulierende Funktionen in Entzündungsprozessen im Sinne eines antiphlogistischen Effektes ein. So konnte beispielsweise herausgefunden werden, dass ein Ligand von PPAR α der Entzündungsmediator Leukotrien B₄ ist, der in der Lage zu sein scheint, seine eigenen Neutralisations- und Verminderungs-Stoffwechselwege zu aktivieren (*Devchand et al. 1996, von Schacky et al. 1993*). In Übereinstimmung mit dieser Tatsache, zeigten PPAR α -defiziente Mäuse eine verlängerte Entzündungsantwort. Weiterhin scheinen sowohl PPAR α als auch PPAR γ ihre antiphlogistische Rolle über eine Downregulation der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren, beispielsweise sogenannter „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) und eine verminderte Produktion proinflammatorischer Interleukine zu bewirken (*Poynter u. Daynes 1998, Staels et al. 1998, Ricote et al. 1998, Jiang et al. 1998*). Zum Abschluß sei erwähnt, dass die Aktivierung der PPARs durch Fenofibrate oder nichtsteroidale Antiphlogistika, beide als PPAR-Liganden identifiziert, zum antiphlogistischen Effekt dieser Substanzen beisteuert (*Staels et al. 1998*).

1.5.7 PPARs und Atherosklerose

In Arbeiten der letzten fünf Jahre konnte die Expression von PPAR α in glatten Gefäßmuskelszellen (*Marx et al.* 1998, *Staels et al.* 1998), Endothelzellen (*Inoue et al.* 1998, *Marx et al.* 1999) und Monozyten bzw. Makrophagen (*Chinetti et al.* 1998, *Marx et al.* 2001) in vivo und in vitro gezeigt werden. In diesen Zellen scheint die Aktivierung von PPAR α vor allem die Expression solcher Gene zu modulieren, die für einen inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand und damit der Atherogenese bedeutsam sind.

Bei der PPAR γ -Isoform konnte eine ähnliche Zellexpression nachgewiesen werden (*Jiang et al.* 1998, *Marx et al.* 1998, 1999, *Ricote et al.* 1998, 1998). Über den Grad der Expression von PPAR γ in Gefäßmuskelszellen gibt es kontroverse Daten. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen PPAR γ -mRNA- und Proteinexpression in isolierten humanen Zellen der Vena saphena und der Koronararterie nachweisen (*Marx et al.* 1998, *Law et al.* 2000), wohingegen andere diesen Rezeptor in der Aorta nicht detektieren konnten (*Staels et al.* 1998). Inwieweit dies durch die unterschiedlichen Gefäßbetten bedingt ist, bleibt zu klären.

Potentiell proatherogene Effekte von PPARs reichen über die Expressionsinduktion von Interleukinen (*Lee et al.* 2000, *Delerive et al.* 1999, 2000) bis hin zur Induktion von Apoptose und Schaumzellbildung (*Nagy et al.* 1998, *Tontonoz et al.* 1998). Demgegenüber stehen potentiell antiatherogene Wirkungen, wie die Hemmung des Ausprägungsgrades der Zytokine und damit auch der Interleukine, des Prostaglandins, der Cyclooxygenase-2 oder des Tumor-Nekrose-Faktors- α (*Marx u. Hombach* 2001). Ferner hemmen PPAR γ -Aktivatoren die Migration glatter Gefäßmuskelszellen und induzieren die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO).

1.5.8 PPARs und Kanzerogenese

Die Entwicklung des Kolonkarzinoms, einer der am häufigsten vorkommenden Tumoren überhaupt, wird durch Prostaglandine und Fettsäuren beeinflusst (*Lefebvre et al.* 1998). Eine verminderte Prostaglandinproduktion, die bei Mäusen mit Mutationen im Cyclooxygenase2-Gen oder bei Menschen, die mit Cyclooxygenase-Inhibitoren behandelt wurden, beobachtet werden konnte, minimierte die Inzidenz von

Kolonkarzinomen (*Kinzler u. Vogelstein 1996, Oshima et al. 1991, Jacoby et al. 1996*). Basierend auf einer engen Korrelation zwischen der Aufnahme von tierischen Fettsäuren und der Entstehung von Kolonkarzinomen (*Giovanucci u. Willet 1994, Wasan et al. 1997*), könnte PPAR γ , ein Mediator für Prostaglandine und Fettsäuren, welcher im Kolon exprimiert wird (*Fajas et al. 1997, Mansen et al. 1996*), in diesem Prozess involviert sein. In einem für intestinale Neoplasien anfälligem Tiermodell erfolgte eine PPAR γ -Aktivierung durch zwei verschiedene synthetische Agonisten, was eine Erhöhung der Frequenz und der Invasivität der Kolonkarzinome in C57BL/6J-APC^{Min}/+ Mäusen zur Folge hatte. Die Tumorfrequenz war dabei lediglich im Kolon erhöht, was auf ein im Kolon beschränktes Vorkommen von PPAR γ hindeutet (*Lefebvre et al. 1998*).

1.5.9 Polymorphismen im PPAR γ -Gen

Nachdem im Jahre 1990 die sogenannten PPARs entdeckt wurden, beschrieben 1997 *Yen et al. (1997)* neben einer sogenannten „stillen“ Mutation an Nukleotidposition 1431 des für PPAR γ 1 und PPAR γ 2 gemeinsamen Exon 6, eine „missense“-Mutation im Nukleotid 34 des PPAR γ 2-spezifischen Exon B. Dieser sogenannte Pro12Ala-Polymorphismus basiert auf einer Cytosin zu Guanin (C→G) Basensubstitution, welche zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Alanin im Codon 12 (CCA^{Pro} → GCA^{Ala}) führt. Dieser Austausch könnte Veränderungen der Proteinstruktur, insbesondere in den aktivierenden Domänen des PPAR γ 2-Gens mit sich führen. Bei der „stillen“ Mutation dagegen bleibt dieser Aminosäureaustausch aus (CAC^{His} → CAT^{His}) und ruft somit keine Veränderungen hervor.

Einen ebenfalls im Exon B des PPAR γ 2-Gens lokalisierten, seltenen Prolin zu Glutamin Polymorphismus (Pro115Gln) entdeckten *Ristow et al. (1998)* und brachten ihn mit einer verstärkten PPAR γ 2-Aktivität sowie schwerer Adipositas in Zusammenhang.

Barroso et al. (1999) wiesen in ihrer Studie zwei seltene, dominante Mutationen nach, die mit einer Funktionsverminderung von PPAR γ einhergehen und mit schwerer Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ2 und Hypertonie assoziiert sind. Die zahlreichen Untersuchungen am PPAR γ -Gen unterstreichen seine Bedeutung im Lipid- und Glukosestoffwechsel und legen darüber hinaus die Vermutung nahe, es als

Kandidatengen in Zusammenhang mit der Entstehung von Lipidstoffwechsel-assoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ2 und Adipositas zu betrachten. Die veröffentlichten Ergebnisse werden kontrovers diskutiert und weisen ein Manko bezüglich möglicher Assoziationen des Pro12Ala-Polymorphismus und einer Hyperlipoproteinämie auf, was das wissenschaftliche Interesse vorliegender Arbeit bestärkt.

1.6 Hyperlipoproteinämien

Als Hyperlipoproteinämien werden Erkrankungen bezeichnet, bei denen die Blutfette im Nüchternserum erhöht sind. Aufgrund der Bindung von Lipiden an Proteine (Apolipoproteine), kann bei Vorliegen einer Hyperlipoproteinämie auch immer gleichzeitig von einer Hyperlipidämie gesprochen werden. Man unterscheidet primäre von sekundären Hyperlipoproteinämien.

Bei den primären Formen handelt es sich um eine genetisch determinierte Störung des Fettstoffwechsels, wobei bei der Mehrzahl der Patienten von einer polygenen Ursache auszugehen ist und zusätzlich endogene und/oder exogene Einflüsse eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen.

Sekundäre Formen werden bei zahlreichen Organ-, Stoffwechsel- oder endokrinen Erkrankungen beobachtet, wie bei Diabetes mellitus, Adipositas, Nieren- und Lebererkrankungen oder auch Hypothyreose (*Greten u. Windler 2002, Löffler u. Petrides 1997*). Es treten auch Kombinationen von primärer und sekundärer HLP auf (*Dargel 1991, Wechsler 1995, Hanefeld 1995, Löffler u. Petrides 1997, Grinsberg u. Goldberg 1999*). Die HLPs fungieren nicht nur als Leitsymptom spezifischer Krankheitsbilder, sie lassen auch Rückschlüsse auf auslösende Primärerkrankungen zu und nehmen so eine wichtige Bedeutung in der Klinik ein. Diese Tatsache wird dadurch untermauert, dass Hyperlipoproteinämien als Risikofaktor der Atherosklerose angesehen werden können. Die in diesem Zusammenhang hervorzuhebende Trias eines gesteigerten Risikos besteht in einer erhöhten Konzentration des LDL-Cholesterins und triglyzerreicher Remnants sowie einer niedrigen Konzentration der HDL (*Gordon et al. 1977, Beisiegel u. Patsch 1995*).

Zu den experimentellen Strategien, die zur Lipoproteinstoffwechselstörung führende Faktoren identifizieren sollen, gehört das Studium natürlich vorkommender Mutationen der am Lipoproteinstoffwechsel beteiligten Proteine. Dies erlaubt eine differenzierte

Betrachtung des Zusammenspiels von Rezeptoren, Apolipoproteinen, Enzymen und Transfer-Faktoren und lässt Rückschlüsse bzw. Assoziationen zwischen Varianten dieser Proteine und Fettstoffwechselstörungen zu. Das Vertiefen dieser Kenntnisse soll zukünftig Ansätze für Therapiekonzepte liefern, die möglicherweise Verlauf und Prognose ausgelöster Erkrankungen auf neuen und vielleicht erfolgreicherer Wegen beeinflussen werden.

1.7 Metabolisches Syndrom

Das Metabolische Syndrom ist in den letzten Jahren zu einem der am häufigsten verwendeten Begriffe der Inneren Medizin geworden, mit dem ein Bündel von kausal verknüpften Zivilisationskrankheiten beschrieben wird (*Hanefeld u. Leonhardt 1981, Hanefeld u. Kohler 2002,*). Dazu zählen die Hyperlipoproteinämie, die Hypertonie, die Adipositas vom androgenen Typ (stammbetonte Fettverteilung) und der Diabetes mellitus vom Typ2 (*Crepaldi et al. 1993*), welche eine Konstellation bilden, die mit einem stark erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit einhergeht (*Müller-Wieland et al. 1996*). Ursächlich wird eine genetisch determinierte Insulinresistenz, die durch eine Hyperinsulinämie kompensiert wird, angenommen. Als deren Folge treten zunächst eine Hypertonie und Hypertriglyzeridämie auf. Während die weitere Entwicklung durch eine androide (stammbetonte) Fettverteilung und Adipositas begünstigt wird, manifestiert sich Jahre beziehungsweise Jahrzehnte später eine diabetische Stoffwechselstörung, oft zusammen mit dann schon bestehenden kardiovaskulären Komplikationen. Der Diabetes mellitus Typ2 ist damit, allerdings nur bei einem Teil der Patienten, der Endpunkt einer viele Jahre bestehenden Insulinresistenz (*Diehm u. Schettler 1995, Shuldiner 1997*).

1.8 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine erbliche, chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel beruht und in deren Folge zumeist erst nach längerer Krankheitsdauer, Schäden an Blutgefäßen und Nervensystem auftreten können (*Grinsberg u. Goldberg 1999*). Gemeinsames Leitsymptom bei unbehandelten

Patienten ist die chronische Hyperglykämie. In diesem Zusammenhang ist der Begriff der „gestörten Glukose-Homöostase“ (impaired fasting glucose = IFG) basierend auf der Bestimmung der Nüchtern-Plasma-Glukose neu eingeführt worden. Grundlage dafür bilden epidemiologische Studien, die erkennen lassen, dass ab einer Plasmaglukose von 110 mg/dl (6,1 mmol/l) die Retinopathieprävalenz und ab 126 mg/dl (7,0 mmol/l) das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen ansteigt (*Wahl P 1999, Hanefeld et al. 1978, 1991, Jiao et al. 1986*).

Im Folgenden wird vornehmlich der Schwerpunkt auf den Diabetes mellitus Typ2 gerichtet werden, welcher auch als Teilaspekt in vorliegender Arbeit untersucht wurde. Während der Diabetes mellitus Typ1 durch eine Betazelldestruktion zum absoluten Insulinmangel führt, ist der Typ2-Diabetes ein heterogenes Krankheitsbild, das durch eine gestörte Insulinsekretion und Insulinresistenz gekennzeichnet ist. Zurzeit wird kontrovers diskutiert, ob die primäre genetische Störung beim Typ2-Diabetes die Betazelle oder das Insulinzielgewebe betrifft. Die Erkrankung hat sowohl umweltbedingte, erworbene wie auch genetische Komponenten (*Bouchard 1996, Hamman 1992, Kahn 1994, Yki-Järvinen 1994*), wobei die Erbllichkeit polygen bedingt ist (*Aitman u. Todd 1995, Granner u. O'Brien 1992, Turner et al. 1995*). Rückschlüsse auf eine relevante genetische Komponente der Betazellfunktion können durch das Auftreten einer eingeschränkten Insulinsekretion bei erstgradigen Verwandten von Typ2-Diabetikern gezogen werden (*Lehtovirta et al. 2000, Pimenta et al. 1995, van Haeflen et al. 1998*). Unklar bleibt einerseits welches Ausmaß der relative Einfluss von Umweltfaktoren versus genetische Faktoren auf die Betazellfunktion hat und andererseits welcher Art die genetischen Läsionen sind, die zur Betazellfunktion führen (*Winter et al. 1999*).

Zu den experimentellen Strategien, die zu Betazellfunktionsstörungen führende Faktoren identifizieren sollen, gehört der Kandidatengenansatz. Hier werden Gene, die in der Insulinwirkung oder der Insulinsekretion eine Rolle spielen, auf Polymorphismen gescreent (*Ringel et al. 1999*). Ein Beispiel hierfür ist das Gen, das für den Peroxisomenproliferator-Aktivierten Rezeptor (PPAR) kodiert und der häufige Pro12Ala-Polymorphismus der Isoform PPAR γ 2, welcher auch Gegenstand vorliegender Arbeit ist (*Auwerx 1999*).

1.9 Adipositas

Als Adipositas wird eine Erhöhung des Fettgewebsanteils des Körpers, als Übergewicht eine Zunahme der Körpermasse (Muskulatur, Fett, Wasser) bezeichnet (Wahl 1999). Die Fettmasse kann indirekt durch den Körpermassenindex (Body mass index = BMI) abgeschätzt werden: $BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Körpergröße (m)}^2$.

Zur groben Orientierung dient die Formel nach Broca, die allerdings nur für Erwachsene mit einer Körpergröße zwischen 160 und 180 cm brauchbar ist: Broca-Formel: Körpergewicht = Körpergröße in cm – 100.

Die Adipositas gehört zu den häufigsten Krankheiten der westlichen Industrieländer. In Deutschland hat jeder dritte ein über dem Normalgewicht liegendes Körpergewicht (Gibbs 1996, Hamann 1995, Hebebrand u. Remschmidt 1995).

Gewichtsklassifikation (WHO)	BMI (kg/m ²)
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	≥ 25
Präadipositas	25,0 – 29,9
Adipositas Grad 1	30,0 – 34,9
Adipositas Grad 2	35,0 – 39,9
Adipositas Grad 3	≥ 40

Tabelle 1 Gewichtsklassifikation der WHO; aus Greten et al. 2004

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einteilung in die Gewichtskategorien Normalgewicht, Übergewicht sowie Adipositas in Anlehnung an die Gewichtsklassifikation der WHO vorgenommen (siehe Tab.1).

1.10 Arbeitshypothese und Fragestellung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen mit einem großen Anteil in Deutschland und auch in den übrigen Ländern westlicher Zivilisation an der Spitze der Todesursachen. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehörend, tragen Hyperlipoproteinämien, Diabetes mellitus und Adipositas in entscheidendem Maße zu der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei. So steigt beispielsweise das relative Herzinfarktrisiko bei Männern unter 50 Jahren bei zunehmender Serumcholesterinkonzentration (*Schunack W* 2003). Bei einer geschätzten Diabeteshäufigkeit von ca. 4 % zeigen mehr als die Hälfte der Bevölkerung (in der Altersgruppe > 40 Jahre) in den westlichen Industrieländern erhöhte Serum-Cholesterin-Werte (> 200 mg/dl) (*Weitgasser R* 2002, *Meisinger C* 2002). Es offenbart sich somit ein Cluster von Krankheiten, welches eine gesundheitspolitische Dimension beschreibt, die nicht nur für das unmittelbare Gesundheitsbudget, sondern auch für weite Bereiche der Medizin von größtem Interesse ist und eine Herausforderung für die Forschung darstellt. Da die Hyperlipoproteinämie ein polygenes Merkmal ist, sollte unter Einbeziehung möglichst vieler beteiligter Gene die stärkste Aussage in Bezug auf Risikopotential, Präventionsstrategien und individuell abgestimmte Therapiemaßnahmen gelingen.

Im Jahre 1997 entdeckten *Yen et al.* den Pro12Ala-Polymorphismus im Peroxisomen Proliferator-Aktivierten Rezeptor gamma (PPAR γ)-Gen, welches für einen im Zellkern lokalisierten Rezeptor, der als Transkriptionsfaktor eine zentrale Bedeutung für den Lipidstoffwechsel, die Adipozytendifferenzierung sowie die Insulinsensitivität besitzt, kodiert (*Schoonjans et al.* 1996, *Vosper et al.* 2002, *Ristow et al.* 1998, *Kubota et al.* 1999, *Kliwer et al.* 1995, *Elbrecht et al.* 1996, *Evans et al.* 2000, 2001).

Diese Entdeckungen werfen die Frage auf, inwieweit diese Mutation mit der Entstehung von Hyperlipoproteinämien, Diabetes mellitus Typ2 und Adipositas assoziiert sein könnte bzw. welche Auswirkungen eine Veränderung des PPAR γ -Gens für seine Träger haben könnte.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden 477 Patienten aus der Medizinischen Lipidambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf, unter ihnen hyperlipidämische, adipöse und Typ2-Diabetiker, untersucht und die Lipidwerte der Träger der PPAR γ -Genvariante mit denen der Träger der Normalform verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Einführung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die 477 Patienten, unter ihnen Patienten mit Hyperlipoproteinämie, Adipositas und Diabetes mellitus Typ2, auf das Vorhandensein des Pro12Ala-Polymorphismus im PPAR γ 2-Gen untersucht und anschließend Genotyp und Phänotyp verglichen. Dieser Abschnitt beinhaltet die Beschreibung des Patientenguts und der verwendeten Methoden. Darüber hinaus die Zusammensetzung der Lösungen und Puffer und die Herstellernachweise der eingesetzten Reagenzien und Geräte. Im ersten Teil wird das Gesamtkollektiv der Untersuchung vorgestellt, es folgt die Charakterisierung der einzelnen Kollektive anhand klinischer Daten. Der zweite Teil befasst sich mit den Methoden zur Bestimmung der PPAR γ -Genotypen. Hier werden jeweils zunächst das Prinzip der Methode und nachfolgend die Durchführung des Versuchs beschrieben. Zuletzt wird auf die statistischen Methoden zur Auswertung der Daten eingegangen.

2.2 Patientengut

Um die Hypothese zu prüfen, ob der Pro12Ala-Polymorphismus mit einer Hyperlipoproteinämie bzw. mit Fettstoffwechselstörungen assoziiert ist, wurden Patienten mit entsprechendem Phänotyp in die Untersuchung aufgenommen. Diese wurden in der Lipidambulanz der Medizinischen Kern- und Poliklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) unter der Leitung von Prof. Dr. Beil betreut. Das hierbei untersuchte Patientengut war weder nach Herkunft noch nach der Pathologie ihrer Erkrankung selektioniert. Sowohl ein Einverständnis aller Patienten an einer genetischen Studie teilnehmen zu wollen, als auch die Genehmigung von Seiten der Ethikkommission lagen vor. Insgesamt wurden 477 Personen für den Pro12Ala-Polymorphismus genotypisiert, die nach objektiven Kriterien, das heißt klinischen Referenzwerten entsprechend, in Kategorien eingeteilt werden konnten. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Bezeichnung der Kollektive, Einschlusskriterien und Anzahl der Personen.

Tabelle 2 Übersicht der sieben Untersuchungskollektive der Lipidambulanz des UKE

Kollektiv	Anzahl	Einschlußkriterium
HLP _{gesamt}	438	Erhöhung einer oder mehrerer Lipoproteinfraktionen/Lipide
HTG	27	Triglyzeride > 200 mg/dl und Gesamt-Chol. < 200 mg/dl
HC	234	Gesamt-Chol. > 200 mg/dl und Triglyzeride < 200 mg/dl
GHLP	176	Gesamt-Chol. und Triglyzeride > 200 mg/dl
Non-HLP	39	Gesamt-Chol. und Triglyzeride < 200 mg/dl
AD	80	BMI \geq 30 kg/m ²
DM II	56	Diabetes mellitus Typ2

HLP = Hyperlipoproteinämie, HTG = Hypertriglyzeridämie, HC = Hypercholesterinämie, GHLP = Gemischte HLP, Non-HLP = Keine HLP, AD = Adipositas, DM II = Diabetes mellitus Typ II.

Eine derartige Einteilung der Patienten erscheint als sinnvoll. Zum einen finden sich Lipidstoffwechselstörungen oft gemeinsam mit weiteren Erkrankungen des metabolischen Syndroms wie z.B. Adipositas, gestörte Glukosetoleranz bzw. Insulinresistenz im Rahmen eines Diabetes mellitus, Hypertriglyzeridämie, Verminderung des HDL- und Erhöhung des LDL-Cholesterins, arterielle Hypertonie sowie koronare Herzkrankheit. Zum anderen ist so sowohl eine differenziertere Betrachtung jeder einzelnen Gruppe was die Assoziation mit der Hyperlipoproteinämie angeht als auch ein Vergleich untereinander und zum Gesamtkollektiv möglich. Die Summe ergibt einen größeren Wert als die Anzahl der untersuchten Patienten, da es auch zu Überschneidungen in den jeweiligen Untergruppen kommt, das heißt, es ist nicht auszuschliessen, dass ein Patient mehrere Einschlusskriterien erfüllt und somit auch mehrfach in unterschiedlichen Gruppen vertreten ist. In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Patientengruppen näher beschrieben. Bei den Patienten wurden Alter, Geschlecht, BMI und Lipidwerte ermittelt. LDL-Cholesterinwerte wurden nach der Friedewald-Formel berechnet, die nur für Triglyzerid-Werte unter 400mg/dl anzuwenden ist. Bei Patienten mit höheren Triglyzerid-Werten konnten keine LDL-Werte bestimmt werden.

Friedewald-Formel: LDL-Chol. = Gesamt-Chol. – (Triglyzeride/5 – HDL-Chol.).

2.2.1 Gesamt-Hyperlipoproteinämie-Kollektiv

Einschlusskriterien für das HLP_{ges}-Kollektiv waren die Erhöhung einer oder mehrerer Lipoproteinfraktionen (VLDL und LDL) bzw. der Lipide (Cholesterin und /oder Triglyzeride) im Nüchternblut über die jeweiligen Normgrenzen. Da neben erhöhten Triglyzeriden (> 200 mg/dl) oft auch erhöhte Werte für Gesamt- und LDL-Cholesterin festgestellt wurden, lag überwiegend eine gemischte Hyperlipoproteinämie vor (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Eigenschaften der 438 Patienten aus dem HLP- Kollektiv.

Eigenschaften		Männer	Frauen	Referenzbereich
Anzahl		250	188	
Alter	Jahre	46 ± 13	46 ± 16	
BMI	(kg/m ²)	27 ± 4	26 ± 5	18,5 – 24,9
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	280 ± 75	290 ± 72	≤ 200
Triglyzeride	(mg/dl)	413 ± 548	210 ± 266	≤ 200
LDL-Chol.	(mg/dl)	187 ± 65	198 ± 67	< 155
HDL-Chol.	(mg/dl)	43 ± 12	59 ± 19	≥ 35
VLDL-Chol.	(mg/dl)	38 ± 20	29 ± 16	< 30
Apo B	(mg/dl)	130 ± 38	136 ± 41	< 120
Apo A ₁	(mg/dl)	128 ± 23	152 ± 32	> 138/148

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen. Der Referenzwert für Apo A₁ ist für Männer niedriger als für Frauen. Referenzwerte entnommen aus *Riesen* 2000.

Bei den HLP-Patienten wurden Alter, Geschlecht, BMI und ein Lipidprofil erhoben. Bei ähnlichem Durchschnittsalter und nur gering differierendem BMI von 27 ± 4 kg/m² bei den Männern im Gegensatz zu 26 ± 5 kg/m² bei den Frauen, lagen die Triglyzeridwerte bei Männern fast doppelt so hoch wie bei den Frauen. Andererseits waren die

Gesamt-Cholesterinwerte, das LDL-Cholesterin und Apo A₁ bei den Frauen tendenziell höher und damit ungünstiger, was die ersten beiden Werte angeht und günstiger in Bezug auf das Apolipoprotein. Insgesamt zeigten die Laborwerte für HLP-Patienten typische Veränderungen mit hohen Gesamt-Cholesterin-Werten (> 200 mg/dl), Triglyzeridwerten (> 200mg/dl) sowie Erhöhungen der verschiedenen Lipoproteinfraktionen wie z.B. LDL (> 155 mg/dl) oder auch VLDL (\geq 30 mg/dl).

2.2.2 Hyperlipoproteinämie-Untergruppen

Aus der Lipidambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf wurden insgesamt 438 Patienten in die Studie aufgenommen, denen eine Hyperlipoproteinämie zugeordnet werden konnte. Anhand des führenden Befundes wurden drei Untergruppen gebildet, die im Folgenden „Hypercholesterinämie“, „Hypertriglyzeridämie“ und „gemischte Hyperlipoproteinämie“ genannt werden. Einschlusskriterium für das Hypercholesterinämie-Kollektiv waren isoliert erhöhte Gesamt-Cholesterinwerte über 200 mg/dl, wohingegen isoliert erhöhte Triglyzeridwerte > 200mg/dl beim Hypertriglyzeridämie-Kollektiv vorgefunden wurden. Eine kombinierte bzw. gemischte Hyperlipoproteinämie impliziert die Erhöhung beider Werte, also der Triglyzeride sowie des Gesamt-Cholesterins.

Im Hypercholesterinämie-Kollektiv mit 234 Patienten sind bei einem sich im oberen Grenzbereich befindlichen BMI (siehe Tab. 4) neben dem erhöhtem Gesamt-Cholesterin-Wert (> 200 mg/dl) auch ein erhöhtes LDL von 206,4 mg/dl (\geq 155 mg/dl) und mit 136,5 mg/dl auch ein erhöhtes Apo B auffällig. Die übrigen Lipidwerte liegen überwiegend innerhalb des Normbereichs.

Gemäß des Einschlusskriteriums fällt für die 27 Patienten im Hypertriglyzeridämie-Kollektiv der Mittelwert der Triglyzeride mit 360,8 mg/dl außerhalb des Referenzbereichs (> 200 mg/dl), wohingegen der Gesamt-Cholesterinwert im Normbereich liegt. Bei sonst unauffälligen Lipidwerten fielen lediglich erniedrigte mittlere Werte für Apo A₁ und ein mittlerer BMI von 27,3 kg/m² auf.

Im 176 Patienten umfassenden Kollektiv der gemischten Hyperlipoproteinämie waren im Vergleich zu den eben aufgeführten Untergruppen die höchsten Werte für BMI, Gesamt-Cholesterin und Triglyzeride mit 28,1 kg/m², 297,2 mg/dl und 606,6 mg/dl zu verzeichnen. Weiterhin befinden sich mit 183,1 mg/dl, 130,7 mg/dl und 134,9 mg/dl

die Mittelwerte für LDL-Cholesterin, Apo A₁ und Apo B außerhalb des Referenzbereichs. Entsprechende klinische Werte sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4 Eigenschaften der HLP-Untergruppen sowie des Non-HLP Kollektivs

Eigenschaften		HC	HTG	GHLP	Non-HLP
Anzahl		234	27	176	39
Alter	Jahre	45 ± 15	52 ± 13	46 ± 13	46 ± 15
BMI	(kg/m ²)	25 ± 4	27 ± 3	28 ± 4	26 ± 5
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	287 ± 61	176 ± 16	297 ± 81	174 ± 23
Triglyzeride	(mg/dl)	112 ± 41	361 ± 162	607 ± 618	106 ± 41
LDL-Chol.	(mg/dl)	206 ± 61	80 ± 17	183 ± 60	109 ± 20
HDL-Chol.	(mg/dl)	59 ± 17	37 ± 15	40 ± 10	45 ± 13
VLDL-Chol.	(mg/dl)	23 ± 9	59 ± 13	55 ± 11	21 ± 9
Apo B	(mg/dl)	145 ± 29	86 ± 17	131 ± 25	92 ± 26
Apo A ₁	(mg/dl)	137 ± 36	129 ± 48	135 ± 42	123 ± 29

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichungen. Die klinischen Werte die als Einschlusskriterium dienten, sind durch Rotdruck hervorgehoben. Chol. = Cholesterin, HC = Hypercholesterinämie, HTG = Hypertriglyzeridämie, GHLP = Gemischte Hyperlipoproteinämie, Non-HLP = Keine Hyperlipoproteinämie.

2.2.3 Non-HLP-Kollektiv

39 Patienten der Lipidambulanz des Universitätskrankenhauses Eppendorf erfüllten keine Einschlusskriterien und zeigten durchweg unauffällige Lipidwerte, so dass dieses Kollektiv als Non-HLP-Kollektiv bezeichnet wurde. Die klinischen Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

2.2.4 Adipositas-Kollektiv

Das Einschlusskriterium dieses Kollektivs war ein BMI ≥ 30 kg/m². Dieser Wert entspricht mindestens einer Adipositas vom Grad 1 und richtet sich nach in Tabelle 1 dargestellter Gewichtsklassifikation der WHO. Bei den Adipositas-Patienten wurden Alter, Geschlecht, BMI und ein Lipidprofil erhoben. Der mittlere BMI betrug bei diesem Kollektiv 34 ± 3 kg/m² und war damit grenzwertig im Durchschnitt noch der Adipositas ersten Grades zuzuordnen. Die Laborwerte zeigten die für Adipöse typischen Veränderungen mit erhöhtem Gesamt-Cholesterin (> 200 mg/dl), erhöhten Triglyzeriden (> 200 mg/dl), LDL- und VLDL-Cholesterin (≥ 155 mg/dl und ≥ 30 mg/dl) sowie eher niedrigem HDL-Cholesterin und Apo A (< 138 bzw. < 148 mg/dl für Männer bzw. Frauen). Eine Übersicht über die klinischen Werte bietet Tabelle 5.

Tabelle 5 Eigenschaften der Patienten aus den Adipositas- und Diabetes-Kollektiven

Eigenschaften		Adipositas	Diabetes
Anzahl		80	56
Alter	Jahre	49 ± 13	50 ± 12
BMI	(kg/m ²)	34 ± 3	29 ± 5
Gesamt-Cholesterin	(mg/dl)	291 ± 102	273 ± 89
Triglyzeride	(mg/dl)	514 ± 508	482 ± 490
LDL-Cholesterin	(mg/dl)	188 ± 81	161 ± 61
HDL-Cholesterin	(mg/dl)	42 ± 13	42 ± 15
VLDL-Cholesterin	(mg/dl)	37 ± 19	42 ± 21
Apo B	(mg/dl)	126 ± 46	131 ± 46
Apo A ₁	(mg/dl)	131 ± 28	132 ± 34

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

2.2.5 Diabetes-Kollektiv

56 Patienten wurden in die Studie aufgenommen, die anhand ihres führenden klinischen Befundes im Folgenden als „Diabetes-Kollektiv“ bezeichnet werden. Die klinischen Werte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Das Einschlusskriterium für die Patienten im Diabetes-Kollektiv war ein Diabetes mellitus vom Typ2, der sich zu diesem Zeitpunkt bereits in Therapie befand. Augenscheinlich waren hier ein sich im oberen Grenzwertbereich bewogender BMI von $29 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ sowie mit $273 \pm 89 \text{ mg/dl}$ und $482 \pm 490 \text{ mg/dl}$ deutlich erhöhte Gesamt-Cholesterin- bzw. Triglyzerid-Werte.

2.2.6 Vergleich der Kollektive

Neben den Besonderheiten, die sich aus den Einschlusskriterien der Kollektive ergaben, wiesen diese untereinander nur geringfügige Unterschiede auf (Tab.6).

Tabelle 6 Gegenüberstellung der Kollektive

Kollektiv	Alter (Jahre)	Frauen (%)	Männer (%)	HLP (%)
Gesamt-HLP	46 ± 14	43	57	100
HC	45 ± 15	57	43	100
HTG	52 ± 13	33	67	100
GHLP	46 ± 13	26	74	100
Non-HLP	46 ± 15	28	72	0
Adipositas	49 ± 13	38	62	93
D.m.	50 ± 12	36	64	89

HLP = Hyperlipoproteinämie, HC = Hypercholesterinämie, HTG = Hypertriglyzeridämie, GHLP = Gemischte HLP, D.m. = Diabetes mellitus.

So wurden bei den untersuchten Kollektiven, mit Ausnahme des HLP- und Hypercholesterinämie-Kollektivs, wesentlich mehr Männer als Frauen rekrutiert. Bei dem Vergleich des Alters zeigte sich, dass sich der Durchschnitt um das 50. Lebensjahr herum bewegte. Hyperlipoproteinämien fanden sich mit durchschnittlich über 90% in allen Kollektiven.

2.3 Materialien

Blutentnahme:

- S-Monovette KE (Fa. Sarstedt)
- Kanülen (Fa. Braun)

DNA-Isolierung:

- STE-Waschpuffer : 20 mM Tris-HCL, pH=7,4 (Fa. Gigco BRL; Merck);
10 mM NaCl (Fa. Merck); 1mM EDTA, pH=8,0 (Fa. Sigma)
- Lysis-Puffer : 10 mM Tris-HCl, pH=8,2; 400 mM NaCl; 2mM EDTA
- TE-Puffer : 10 mM Tris-HCl, pH=7,4; 0,2 mM EDTA

Diese Arbeitslösungen werden filtriert und autoklaviert.

- Proteinkinase K : Proteinkinase K 100 mg (Fa. Boehringer Mannheim);
10 ml 10% Natrium-Dodecylsulfat (SDS); 20 ml EDTA 0,5 M
- Zugabe von 70 ml H₂O dest.
- NaCl 6 M
- Ethanol 100%ig

Diese Arbeitslösungen sind gebrauchsfertig.

Polymerasekettenreaktion (PCR):

- Reaktionspuffer (10 x) : 1,0 ml Tris-HCL; 500 mM KCl mit Magnesiumchlorid
(15 mM), pH=8,3 (Fa. Boehringer Mannheim)
- Taq-DNA-Polymerase : 1 U/μl (Fa. Boehringer Mannheim)

-dNTP : je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fa. Boehringer Mannheim)

-Primer (Fa. New England Biolabs)

- Mineralöl (Fa. Sigma)

- Reaktionsgefäß 0,5 µl safe ware lock (Fa. Eppendorf)

Restriktionsverdau:

BstU 1 (Bacillus stearothermophilus U.):

NE Buffer 2

5 U/µl

Inkubationstemperatur: 60°C

Erkennungs-/Spaltungssequenz:

5'....CG↓ CG....3'

3'....GC↑ GC....5'

Gel-Elektrophorese:

-Laufpuffer : 1x Tris-Borate-EDTA (TBE)
0,09 TBE; 0,002 M EDTA

-Größenstandard : 1 kb DNA-Leiter, 1 µg/µl (Fa. Gibco)

-Loading buffer (6 x) : 1 x TBE; 40% Glycerol; Bromphenolblau (Fa. Merck)

-Acrylamidgel : 15% Acrylamid/Bisacrylamid, 40 %, 1:29 (Fa. Appligene);
0,15 % Ammoniumpersulfat (Fa. Serva); 0,25 % TEMED
(Fa. Serva); 1 x TBE

-Mini-Gelkammer von Biometra

Probepvorbereitung : 4 µl PCR-Produkt mit 1:5 verdünntem loading buffer (6 x)
vermengen und auf das Gel auftragen;
1 µl Größenstandard 1kb DNA-Leiter (1µg/µl) auftragen

Silberfärbung:

-10 % Essigsäure (Fa. Merck); AgNO₃ (Fa. Roth); 37 % Formaldehyd (Fa. Sigma);
Na₂CO₃ wasserfrei (Fa. Merck); Na₂CO₃ in Wasser; Glycerol (Fa. Merck); Methanol
(Fa. Merck)

Geltrocknung:

-Gel Drying Film (Fa. Promega)

Geräte:

-Netzgeräte : Biorad Power Pack 3000 (Biometra)

-Zentrifugen : Hettich; Heraeus Biofuge fresco

-Biometra Trio-Thermoblock

2.4 Bearbeitung des „buffy-coat“ bzw. Bestimmung des PPAR γ 2-Genotypen

Der Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens ist ein Restriktionsschnittstellen-Polymorphismus (RSP), da durch den Polymorphismus die Schnittstelle eines Restriktionsenzym verändert wird. Restriktionsschnittstellen-Polymorphismen (RSPs) bestehen aus polymorphen Allelen, die eine bestimmte Restriktionsschnittstelle enthalten oder nicht enthalten. Man kann solche Polymorphismen durch eine PCR bestimmen (*Strachnan* 1996). Dazu verwendet man Primer mit Sequenzen, die die polymorphe Restriktionsschnittstelle einrahmen, vermehrt diese dann aus genomischer DNA, schneidet das dabei entstandene PCR-Produkt mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und trennt die Fragmente in einer Gelelektrophorese auf. So findet man RSPs, die aus zwei Allelen bestehen, in denen eine bestimmte Restriktionsschnittstelle entweder vorhanden ist oder fehlt (*Mori et al.* 2001). Bei Vorliegen eines Basenaustausches C \rightarrow G an Position 34 des PPAR γ 2-spezifischen Exon B, entsteht im PCR-Produkt eine Schnittstelle für BstU I (*Yen et al.* 1997). Diese Eigenschaft wird zur Bestimmung der Genotypen ausgenutzt.

Hierzu wurde bei allen Personen chromosomale DNA aus Blut isoliert. Ein den Polymorphismus enthaltendes DNA-Fragment wurde mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt und mit dem Restriktionsenzym BstU I verdaut. Die durch den Verdau entstandenen Fragmente wurden mit Hilfe der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung (Ethidiumbromidfärbung) sichtbar gemacht. Ein Foto eines solchen Gels ist in Abbildung 6 zu sehen. Durch Analyse der Restriktionsfragmentlängen wurde nun der Genotyp bestimmt. Nachfolgend werden die Prinzipien der Methoden und die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben.

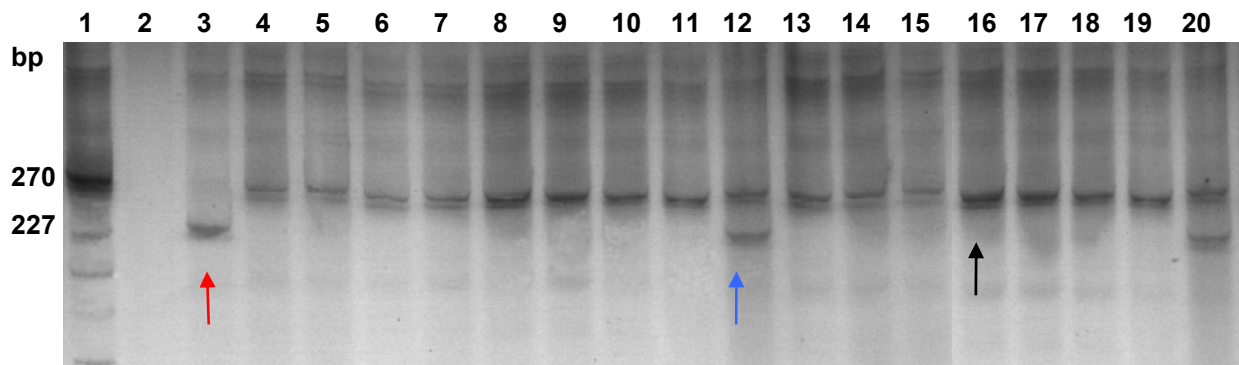


Abb. 6 Foto eines mit Silbernitrat gefärbten Polyacrylamidgels. In die Geltaschen am oberen Bildrand wurden 18 Proben (Spur 3-20), sowie der Kb-Marker (Spur 1) und eine Negativkontrolle (Spur 2) aufgetragen. Durch Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgeteilt, wobei kleinere Fragmente schneller in Richtung des unteren Bildrandes wandern. Der häufige PP-Genotyp ist an einer Bande von 270 bp Größe zu erkennen (Spur 4-11 u. 13-19, exemplarisch siehe schwarzer Pfeil in Spur 16). Der AA-Genotyp entspricht einer einzigen Bande von 227 bp Größe (die zweite Bande mit 43 kb wird nicht sichtbar), wie in Spur 3 zu sehen ist (exemplarisch siehe roter Pfeil). Der PA-Genotyp ist an zwei Banden in Höhe von 270 bp und 227 bp (43 bp-Fragment nicht sichtbar) in Spur 12 u. 19 zu erkennen (exemplarisch siehe blauer Pfeil).

2.4.1 DNA-Extraktion

Blut ist eine leicht zugängliche Quelle für chromosomale DNA und gut zur Isolierung geeignet. Die DNA-Extraktion wurde nach dem Verfahren von *Miller et al.* (1988) mit dem nachstehenden Prinzip durchgeführt. Bei gehemmter Blutgerinnung und osmotischer Lyse der Erythrozyten können die kernhaltigen Leukozyten, welche die DNA enthalten, durch mehrere Zentrifugationsschritte isoliert werden. Die Inkubation mit Lyse-Puffer, Proteinkinase K und SDS 10 % bewirkt die Lyse der Membranen, anschließend werden die Proteine mit NaCl-Lösung ausgefällt. Durch Zugabe von Ethanol 100 % kann die DNA nun gefällt und mit einer Pasteur-Pipette ausgedreht werden. Die einzelnen Schritte der DNA-Extraktion sind im Folgenden beschrieben.

Je 10 ml EDTA Blut wurde für 10 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Das Plasma wurde für die serologische Untersuchung aliquottiert. Die direkt unterhalb des Plasmas angesiedelte Zellfraktion, genannt „buffy coat“, enthält die Leukozyten. Es wurden 2 ml „buffy coat“ in Tubes pipettiert und für mindestens zwei Stunden bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der „buffy coat“ in ein 15 ml Spitzröhrchen

überführt, mit STE-Puffer aufgefüllt und nach Umschwenken für 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde mit STE-Puffer aufgefüllt, und das Sediment durch Klopfen gelöst. Es folgte ein Zentrifugierschritt bei 3000 Upm für 15 min. Wiederum wurde der Überstand verworfen. Das Pellet mit den Leukozyten wurde mit 3 ml Lyse-Puffer, 1 ml Proteinkinase K und 200 µl SDS (10 %) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Ansätze mit 3,4 ml Lyse-Puffer und 2,3 ml einer 6 molaren NaCl-Lösung versetzt und durch Umschwenken gemischt. Anschließend wurde bei 3000 Upm für 20 min zentrifugiert. Die obere DNA-haltige Phase wurde in einer 50 ml Tube mit 30 ml Ethanol 100 % überführt. Durch leichtes Schwenken wurde die DNA gefällt und war dann als Knäuel zu erkennen. Mit einer sterilen Pasteur-Pipette wurde die DNA in ein 15 ml Tube übertragen und mit 10 ml Ethanol 70 % gewaschen. Zuletzt wurde die DNA in ein autoklaviertes Eppendorf-Gefäß gegeben, mit 500 µl TE-Puffer versetzt und für 48 Stunden auf dem Rotator bei 37 °C gelöst. Die DNA Proben wurden im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase chain reaction“)

1986 veröffentlichte KB. Mullis (*Mullis et al.* 1986, 1987) eine Methode zur in vitro-Amplifizierung von Nucleinsäuren-Fragmenten, die inzwischen zu einer der am meisten benutzten Standardmethoden der Molekularbiologie geworden ist, da sie ungewöhnlich einfach durchzuführen ist und ohne die Verwendung von Zellen als Werkzeuge zur Amplifizierung von DNA auskommt (*Rolfs et al.* 1991, *Strachnan* 1996). Das Reaktionsprinzip ähnelt der Replikation der DNA in vivo. Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen DNA-Matrize (*Saiki et al.* 1985). Künstlich synthetisierte Oligonucleotide, meist mit jeweils 15-30 Nucleotiden, die mit dem Matrizenstrang hybridisieren, dienen dabei als Starter (Primer) (*Ugozoli u. Wallace* 1991). Wenn man diese Primer, die sogenannten Amplimere, zu einer denaturierten genomischen DNA gibt, binden sie spezifisch an komplementäre Sequenzen, die die gesuchte DNA-Region einrahmen. Wenn eine entsprechende hitzestabile DNA-Polymerase sowie als DNA-Vorstufen die vier Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP vorhanden sind, können Amplimere die Synthese neuer DNA-Stränge starten. Dabei sind die neuen DNA-Stränge

komplementär zu den einzelnen DNA-Strängen der gesuchten Ziel-Sequenz und überlappen einander. Die PCR beruht auf der vielfachen Wiederholung von Zyklen mit drei temperaturabhängigen Teilschritten, Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation (Newton u. Graham 1994, Shuldiner u. Tanner 1997). Zuerst wird durch Denaturierung bei etwa 93-95 °C die DNA in Einzelstränge aufgeteilt. Im zweiten Schritt, bei 50-70 °C, hybridisieren die beiden Primer mit den entsprechenden Abschnitten der Matrizen-DNA. Im dritten Schritt, der Polymerisation (70-75 °C), werden ausgehend von den Primern neue DNA-Stränge synthetisiert. Damit verdoppelt sich mit jedem Reaktionszyklus die Menge des von den Primern eingerahmten Matrizenfragments. Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle (Hayashi et al. 1993). In der Theorie ist diese Methode außerordentlich effektiv. Mit nur 20 Reaktionszyklen ergibt sich eine 2^{20} (= 10^6)-fache Amplifizierung eines Moleküls doppelsträngiger DNA. In der Praxis werden unter diesen Bedingungen nur Amplifizierungen von etwa 105fach erreicht. Für die Reaktion werden grundsätzlich eingesetzt: DNA als Matrize, ein Primerpaar, Desoxynucleotide (dNTP), die bei der Synthese eingebaut werden und eine DNA-abhängige Polymerase. Außerdem werden Magnesium-Ionen und ein Puffersystem zur Einstellung des pH-Wertes (pH-Optimum = 8,8) benötigt. Durch die spezifischen Primerpaare wird es möglich, selektiv einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Die beiden Primer flankieren den zu vervielfältigen Bereich, wobei einer an den Sinnstrang bindet und der andere an den Gegensinnstrang (Orita et al. 1989). In der ursprünglichen Vorschrift war die DNA-Amplifizierung nach der oben beschriebenen Methode teuer und aufwendig, da nach jeder Denaturierung bei 90 °C die damals verwendete bakterielle DNA-Polymerase inaktiviert war und erneut zugesetzt werden musste. Heute werden jedoch hierfür DNA-Polymerasen verwendet, die aus thermophilen Bakterien isoliert werden (Saiki et al. 1988). Diese Bakterien leben beispielsweise in heißen Quellen und produzieren Enzyme, die eine Hitzebeständigkeit von bis zu 94 °C haben. Das für die PCR verwendete Enzym stammt aus dem Organismus *Thermus aquaticus* und wird infolgedessen als Taq-Polymerase bezeichnet. Sie ist bis zu 94 °C hitzebeständig und hat eine optimale Arbeitstemperatur von 80 °C. Die Enzymaktivität ist abhängig von zweiwertigen Kationen, wobei optimale Bedingungen mit 10 mM Mg^{2+} eingestellt werden.

Das PCR-Verfahren wurde ursprünglich für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten beschrieben und eignet sich für DNA-Stücke von einigen 100 bis 1000 Basenpaaren Länge (*Rolfs et al.* 1991). Diese Klonierungsmethode bietet drei Vorteile: Sie ist schnell, empfindlich und robust. Die wesentlichen Nachteile der PCR sind, dass man nur kurze Produkte erhält und dass die DNA-Replikation ungenau ist.

Sie bietet ein breites Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten, wobei sie besonders häufig eingesetzt wird, um Polymorphismen und pathogene Mutationen aufzuspüren.

2.4.2.1 Amplifizierung des Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens

In dieser Untersuchung sollte ein durch eine Mutation veränderter DNA-Abschnitt im Exon B des PPAR γ 2-Gens amplifiziert werden, welcher zu einer Substitution der Aminosäure Prolin durch Alanin am Codon 12 führte (CCG^{Pro}--->GCG^{Ala}) (*Yen et al.* 1997, *Elbrecht et al.* 1996, *Evans et al.* 2000, 2001). Die Sequenz der eingesetzten Oligonucleotide ist in Tabelle 7 angegeben. Die einzelnen Reagenzien wurden in Aliquotts bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Vor der Benutzung wurden die benötigten Aliquotts aufgetaut und gemischt.

Tab. 7 Primer für die Amplifizierung des Pro12Ala-Polymorphismus

Oligonukleotid	Sequenz	Konz.
Primer 1(vorw.)	5'-GCC-AAT-TCA-AGC-CCA-GTC-3'	10 pmol/ μ l
Primer 2(rückw.)	5'-GAT-ATG-TTG-CAG-ACA-GTG-TAT-CAG-TGA-AGG-AAT-CGC-TTT-CCG-3'	10 pmol/ μ l

Konz.=Konzentration; rückw.=rückwärts; vorw.=vorwärts

Die Amplifizierungsmischung wurde in sterilen Mikrozentrifugenröhrchen nach dem Protokoll in Tabelle 8 durch Zugabe der Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge hergestellt. In der Regel wurde ein sogenannter Mastermix hergestellt, der einen Ansatz für 20 oder 40 Proben enthielt. Hierdurch werden die einzelnen Mengen genauer pipettiert und die Fehlermöglichkeit reduziert, da die Gesamtzahl der

Pipettiervorgänge reduziert wird. Nach sorgfältigem Mischen des Mastermix wurden jeweils 19 μl der Flüssigkeit in autoklavierte Eppendorf-Gefäße aliquottiert, wobei aus einem Mastermix 20 x wegen Volumenverlusten beim Pipettieren in der Regel 19 Proben hergestellt wurden. Anschließend wurden die Aliquotts beschriftet und mit 1 μl DNA der entsprechenden Probanden versetzt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde zuletzt jeweils ca. 50 μl Mineralöl auf die Oberfläche geschichtet. Alle Proben wurden gemischt und kurz abzentrifugiert, um sie von Luftblasen zu befreien und die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu sammeln. Die Amplifizierung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll mit 35 Zyklen im Thermoblock. Die PCR wurde mit einer „annealing“-Temperatur von 55 °C durchgeführt. Die Temperatur zur Denaturierung betrug 95 °C, für die Elongation wurden 72 °C festgesetzt. Die einzelnen Phasen hatten eine Dauer von 1 Minute mit Ausnahme des ersten und letzten Zyklus mit 5 bzw. 10 Minuten. Das Protokoll ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 8 Herstellung der Amplifizierungsmischung des Pro12Ala-Polymorphismus

Reagenz	Ansatz 1 x	Mastermix 20 x
Steriles, bidest H ₂ O	12,6 μl	252 μl
PCR-Puffer, 10 x	2,0 μl	40 μl
Mg ²⁺	2,0 μl	40 μl
DNTP	0,5 μl	10 μl
Primer 1	0,8 μl	16 μl
Primer 2	0,8 μl	16 μl
Taq-DNA-Polymerase	0,3 μl	6 μl
Volumen	19,0 μl	380 μl
Genomische DNA	1,0 μl	
Gesamtvolumen	20,0 μl	

Die einzelnen Reagenzien wurden in Aliquotts bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Vor der Benutzung wurden die benötigten Aliquotts aufgetaut und gemischt. Endkonz.= Endkonzentration.

Tabelle 9 Temperaturen und Inkubationszeiten zur Amplifizierung des Pro12Ala-Polymorphismus.

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer
Erster Zyklus	Denaturierung	95 °C	5 min
	Annealing	55 °C	1 min
	Elongation	72 °C	1 min
33 Zyklen	Denaturierung	95 °C	1 min
	Annealing	55 °C	1 min
	Elongation	72 °C	1 min
Letzter Zyklus	Denaturierung	95 °C	1 min
	Annealing	55 °C	1 min
	Elongation	72 °C	10 min

2.4.2.2 Probleme bei der Durchführung der PCR

Um das Risiko einer Kontamination der Proben mit DNA zu verringern, wurden der Mastermix und die Aliquotts an einem speziellen Arbeitsplatz (Clean Bench) und räumlich getrennt von den weiteren Arbeitsschritten hergestellt. Außerdem wurde von jedem Mastermix ein Ansatz ohne Zusatz von DNA verarbeitet, um eine mögliche Kontamination identifizieren zu können.

2.4.3 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in doppelsträngiger DNA eine spezifische Sequenz von 4-8 Nukleotiden erkennen und dort die DNA spalten. Es handelt sich dabei normalerweise um sogenannte Pallindrome, d.h. die Basensequenz ist vom 5'Phosphatende gelesen identisch in den beiden Strängen (*Rolfs et al.* 1991). Eingesetzt wird die Restriktionsanalyse eines PCR-Produkts zur Identifizierung von Schnittstellen für die Klonierung bzw. zur Erkennung eines Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Ein RFLP entsteht aufgrund eines Poly-

morphismus an den Restriktionsschnittstellen und führt zu Unterschieden in der Größe aller Restriktionsfragmente. Die beim Pro12Ala-Polymorphismus verwendete Restriktionsendonuklease BstU I entstammt dem *Bacillus stearothermophilus* und erkennt die Sequenz CG//CG, welche sich im Exon B des PPAR γ 2-Gens befindet, 34 Basenpaare strangaufwärts von der TATA Box (Abb. 7). Sie schneidet demnach nur bei Vorliegen eines Basenaustausches C \rightarrow G. Im Falle einer homozygoten Mutation ergeben sich ein 227 bp und ein 43 bp großes Fragment, im Falle einer heterozygoten Mutation ein 270 bp, ein 227 bp und ein 43 bp großes Fragment. Liegt kein Basenaustausch an Position 34 vor, so findet sich nur ein 270 bp großes Fragment, welches dem Wildtypen entspricht. Die kurzen Fragmente von 43 bp Länge sind in den Geldarstellungen nicht sichtbar (siehe Abb. 6)

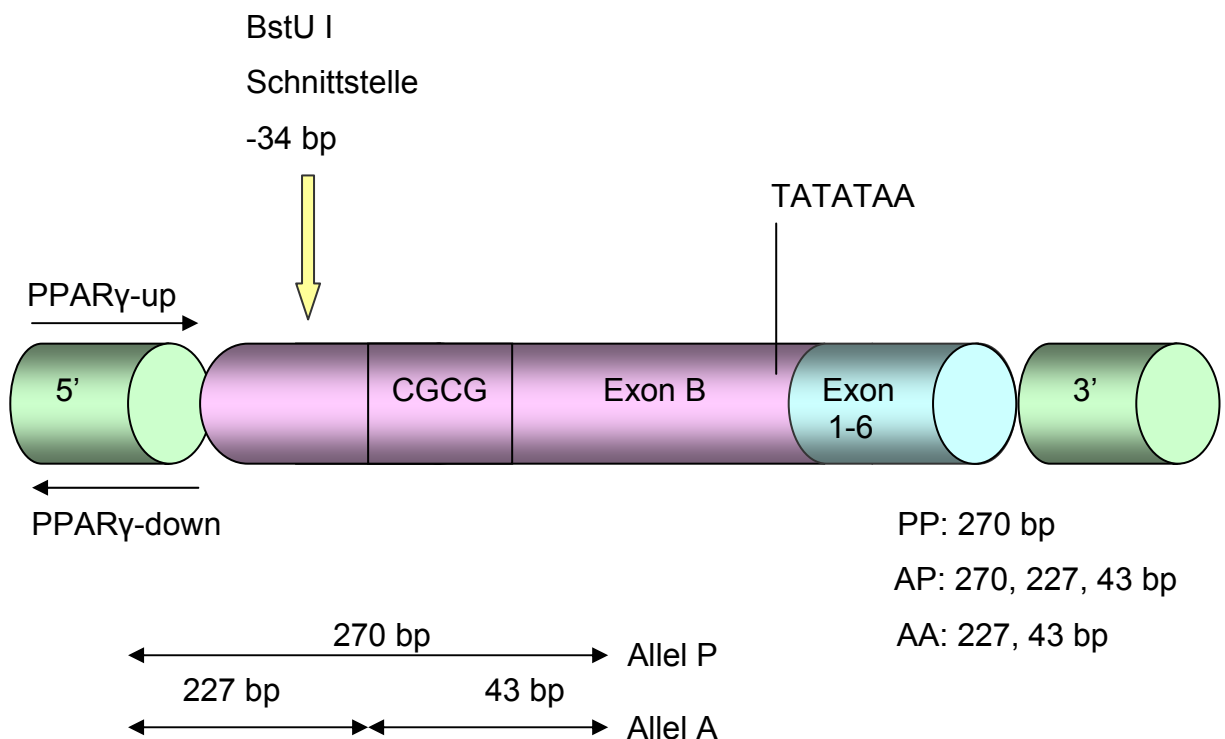


Abb. 7 Exon B-Abschnitt des PPAR γ 2-Gens.

Die Schnittstelle des BstU I-Restriktionsenzym ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. PPAR γ -up = Vorwärts-Primer, PPAR γ -down = Rückwärts-Primer.

Zur Durchführung des Restriktionsverdau wurde das Enzym auf Eis verarbeitet, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern. Das Enzym, welches in einer Konzentration von 10 Units/ μl vorlag, wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:5 mit dem mitgelieferten Inkubationspuffer versetzt. Die Bedingungen wie Puffer, Inkubationsdauer- und Temperatur sind abhängig von dem jeweiligen Enzym.

Die Enzymeinheit Unit ist als diejenige Menge definiert, die in der Lage ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen alle spezifischen Spaltungsstellen in 1 μg DNS in einer Stunde in einem 20 μl Ansatz vollständig zu spalten. Im Anschluss an die Amplifizierung wurde 1 μl des Gemisches direkt in die Eppendorf-Gefäße gegeben. Die Proben wurden durch Schwenken gemischt und im Wärmeschrank wurde bei einer Temperatur von 37 °C in der Regel über Nacht (24 h) inkubiert.

2.4.4 Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der Fragmente wurde nach dem Restriktionsverdau mit BstU I eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandert DNA in Trägermedien im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit ist dabei proportional zur Feldstärke und Ionenladung und umgekehrt proportional zur Viskosität des Mediums und dem Teilchenradius. Kürzere DNA-Fragmente laufen demnach schneller im Gel als längere, wodurch die Auftrennung von Fragmenten entsprechend ihrer Größe gelingt. Die einzelnen Schritte zur Durchführung einer Gel-Elektrophorese sind im Folgenden beschrieben.

2.4.4.1 Gelherstellung

Die Viskosität eines Polyacrylamidgels wird durch das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt (hier 29:1) sowie durch die Acrylamidkonzentration in der Gelösung (hier 12,5 %). Die Polymerisation des Gels wird durch die Vernetzung von Bisacrylamid in Acrylamid erreicht. Katalysatoren für diese Reaktion sind TEMED (0,2 %) und AMP (1 %). Polyacrylamid-Gele mit den Abmessungen 80 x 70 x 0,6 mm wurden in vertikalen Gießkassetten hergestellt, die sich aus je zwei Glasplatten zusammensetzen und über vier Klammern zusammengehalten werden. Eine der

beiden Platten ist an den vertikalen Rändern mit zwei 0,6 mm dicken Glas-Spacern versehen. Zwischen den Platten wird zur Dichtung ein U-förmiges Gummi eingespannt. Für die Gellösung wurden 3,13 ml Acrylamid (40 %) sowie 65 µl Ammoniumpersulfat 10 % und 30 µl TEMED mit 4,77 ml H₂O und 2 ml TBE 10 x versetzt, so dass insgesamt ein Volumen von 10 ml mit einer 12,5 %igen Konzentration des Acrylamids vorlag. Die Lösung wurde durch leichtes Schwenken gemischt und luftfrei in die vorbereitete Gießkassette gegossen. Mit Hilfe eines Kunststoffkamms wurden 20 Taschen im Gel hergestellt. Nach wenigen Minuten war die Lösung polymerisiert. Der Kamm wurde vorsichtig herausgezogen und die nun entstandenen Taschen mit TBE 1x gespült. Das Gel war nun gebrauchsfertig.

2.4.4.2 Elektrophorese

Nach Entfernung des Dichtungsgummis wurden die Glasplatten mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Anschließend wurden die Puffertanks der Trennkammer mit 1 x TBE als Pufferlösung gefüllt. 5 µl der im Verhältnis 1:3 mit „loading buffer“ versetzten Proben wurden vorsichtig in die Auftragetaschen einpipettiert. Jeweils eine der ersten Taschen wurde mit dem 1 kb DNA „Ladder Marker“ versehen, um einen Standard zur Auswertung der Fragmentgrößen zu gewährleisten und die korrekte Reihenfolge der Proben sicherzustellen. Anode und Kathode wurden mit dem Stromgeber verbunden und eine Stromstärke von 30 mA für ca. 30 min eingestellt. Gel-Viskosität, Stromstärke und Laufdauer wurden so gewählt, dass eine gute Trennung der Restriktionsfragmente erreicht wurde.

2.4.4.3 Gelfärbemethoden

Nach der Elektrophorese liegen die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt vor, sind aber noch nicht sichtbar. Eine bewährte Methode zur Anfärbung von PCR-Produkten auf Polyacrylamidgelen ist die Ethidiumbromidfärbung. Als Standardverfahren wurde in vorliegender Arbeit jedoch die Silberfärbung eingesetzt, die im Vergleich zur Ethidiumbromidfärbung eine höhere Empfindlichkeit aufweist, jedoch

weitaus zeitaufwendiger ist. Mit Hilfe des Standardmarkers wurde nun die Größe der Banden festgestellt und der Genotyp anhand des Musters der Fragmente bestimmt.

2.4.4.4 Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-Ethyl-5-Phenanthridiumbromid) ist ein fluoreszierender Stoff, der sich an Doppelstrang-DNA anlagert. Es handelt sich dabei um eine interkalative Substanz, deren Moleküle die Zwischenräume zwischen den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix besetzen. Daraus ergibt sich zum einen die Verwendung zur Anfärbung von PCR-Produkten innerhalb eines Gels, andererseits aber auch die mutagene Wirkung der Lösung. Die Färbung wird daher unter Verwendung besonderer Schutzmaßnahmen wie spezieller Handschuhe durchgeführt.

Zur Herstellung der Färbelösung werden 5 µl Ethidiumbromid in 100 ml 1 x TBE verdünnt, die Konzentration beträgt dann 50 µg Ethidiumbromid/100 ml. Die Gele werden für 5-10 min in der Ethidiumbromidlösung geschwenkt, bis eine ausreichende Anlagerung von Ethidiumbromid erreicht wird. Unter dem UV-Transilluminator werden die Gele bei einer Wellenlänge im Bereich 254-300 nm bestrahlt. Die DNA wird in Form fluoreszierender Banden sichtbar. Die Gele werden mit einer Polaroid Kamera bei einer Beleuchtungszeit von 3 Sekunden für die Dokumentation fotografiert.

2.4.4.5 Silberfärbung

Das Prinzip der Silberfärbung ähnelt dem photographischen Prozess mit Silberhalogeniden. Dabei wird ausgenutzt, dass einwertige farblose Silberverbindungen wie Silberbromid (AgBr) oder Silbernitrat (AgNO₃) zu elementarem schwarzen Silber reduziert werden. Bei der Silberfärbung wird das Gel in Silbernitrat-Lösung gegeben. Silber-Ionen gehen mit Makromolekülen wie DNA, nicht jedoch mit Polyacrylamid, Komplexverbindungen ein. Die komplexgebundenen Silber-Ionen werden durch Formaldehyd unter Ausbildung von Silberkeimen reduziert, wodurch das latente (unsichtbare) Bild entsteht. Durch das Entwickeln in alkalischer Carbonatlösung mit Formaldehyd (HCHO) wird die unmittelbare Umgebung der Silberkeime ebenfalls reduziert, wodurch das latente Bild zunehmend verstärkt wird. Mit Natriumthiosulfat

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) werden nicht gebundene Silber-Ionen unter Bildung farbloser Bisargentat-Komplexe aus der Gelschicht herausgelöst. Das Überführen des Gels in Essigsäure unterbricht den Entwicklungsvorgang. Die Silberfärbung wurde nach *Bassam et al.* (1991) durchgeführt. Zur Übersicht sind die Vorschriften zur Herstellung der Lösungen sowie die Dauer der einzelnen Schritte in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Protokoll zur Durchführung einer Silberfärbung

Schritt	Reagenzien	Mengen	Dauer
1. Fixierung	Essigsäure 10 %	100 ml	20 min
2. Waschen	Wasser	500 ml	3 x 2 min
3. Imprägnierung	Silbernitrat 10 %	2 ml	30 min
	Formaldehyd 37 %	150 μl	
	Wasser	100 ml	
4. Waschen	Wasser	200 ml	2 min
5. Entwicklung	Natriumcarbonat 10 %	60 ml	1 min 2-15 min
	Natriumthiosulfat 20 mg/ml	60 μl	
	Formaldehyd 37 %	300 μl	
	Wasser	140 ml	
6. Entwicklungsstop	Essigsäure 10 %	100 ml	20 min
7. Fixierung	Methanol 30 % Glyzerin 3 %		Bis zur Trocknung

Alle Lösungen werden eisgekühlt verwendet.

Im Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel für ca. 20 Minuten in 10 %ige Essigsäure gelegt. Es folgen drei kurze Waschgänge von je ca. 2 min in destilliertem H_2O . Nun wird das Gel für 30 min in Silbernitratlösung inkubiert. Anschließend wird das Gel zunächst in Wasser, dann in 1/3 der vorbereiteten Carbonatlösung kurz geschwenkt. Zur Entwicklung der Banden wird das Gel in die restliche Carbonatlösung gegeben, die abgedunkelt einwirken muss. Unter wiederholten Sichtkontrollen wird die

Ausprägung der Silberbanden verfolgt. Nach einer Zeit von 2 bis 10 min werden Banden sichtbar, die in kurzer Zeit an Intensität zunehmen. Der Zeitpunkt zum Abbruch der Entwicklung ist gegeben, wenn die Farbtiefe der spezifischen Banden ausreichend ist und durch weiteres Einwirken nur das Verschleiern des Bildes erreicht wird. Das Gel wird für 20 min in 10 %iger Essigsäure gewaschen und anschließend noch in 5 %iger Essigsäure für 10 min eingelegt. Der letzte Schritt ist die Fixierung in Methanol 30 % und Glycerin 3 %.

2.5 Statistische Berechnungen

Für die statistische Auswertung werden die Programme „*Statistica für Windows*“, Version 5.1, und „*Microsoft Excel*“, Version 97 verwendet. Die klinischen Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

2.5.1 Bestimmung der Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen wurden nach der Genzähl-Methode ermittelt. Da Prolin (P) und Alanin (A) die einzigen Allele für den Locus des PPAR γ 2-Polymorphismus sind, sind die beiden Allelfrequenzen unmittelbar voneinander abhängig.

$$\text{Allelfrequenz } P = \frac{2N_{PP} + N_{PA}}{2N}$$

$$\text{Allelfrequenz } A = \frac{2N_{AA} + N_{PA}}{2N} = 1 - \text{Allelfrequenz } P$$

2.5.2 Hardy-Weinberg-Gesetz

Die Allelfrequenz P entspricht p, die Allelfrequenz A entspricht q. Daraus ergibt sich die folgende theoretische Verteilung der Genotypen. Für den Genotyp PP wird eine relative Häufigkeit von p^2 erwartet, für PA von $2pq$ und für AA von q^2 .

$$p + q = 1$$

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = \frac{N'_{PP} + N'_{PA} + N'_{AA}}{N} = 1$$

2.5.3 Chi-Quadrat-Test

Die Verteilung von Häufigkeiten wurde mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet. Chi-Quadrat (χ^2) ist das statistische Maß für die Abweichung von beobachteten und erwarteten Werten. Dazu wurden die Differenzen zwischen beobachtetem und erwartetem Wert quadriert und durch den Erwartungswert dividiert. Die Summe der einzelnen Werte ergibt χ^2 .

$$\chi^2 = \sum \frac{(N_{\text{Beobachtet}} - N'_{\text{Erwartet}})^2}{N'_{\text{Erwartet}}}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade ist bestimmt durch die Zahl der Klassen, die beliebig festgesetzt werden können. Für die Hardy-Weinberg-Verteilung wurde ein Freiheitsgrad (df = 1) angenommen, da die erwartete Verteilung nur von zwei Größen, den Frequenzen für Allel P und A abhängig ist. Damit liegt der kritische Wert für ein Signifikanzniveau von 95 % bei $\chi^2 = 3,84$.

2.5.4 Mann-Whitney-U-Test

Zur Beurteilung von Assoziationen des PPAR γ 2-Polymorphismus wurden die Eigenschaften der durch den Genotyp definierten Gruppen verglichen. Bei dieser Untersuchung wurde geprüft, ob sich die klinischen Werte der Personen in Abhängigkeit vom Genotyp unterschieden.

Der so genannte t-Test wird am häufigsten verwendet, um die Unterschiede zwischen parametrischen Kriterien in zwei Gruppen zu überprüfen. Er setzt jedoch eine Normalverteilung und Varianzhomogenität voraus. Diese Bedingungen waren hier nicht erfüllt. Daher wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, der auf Rangfolgen basiert.

Die Unterschiede zwischen den Genotypen wurden zum einen für den Vergleich von Normaltyp und Heterozygoten, zum anderen für den Vergleich von Normaltyp und Homozygoten ermittelt.

3. Ergebnisse

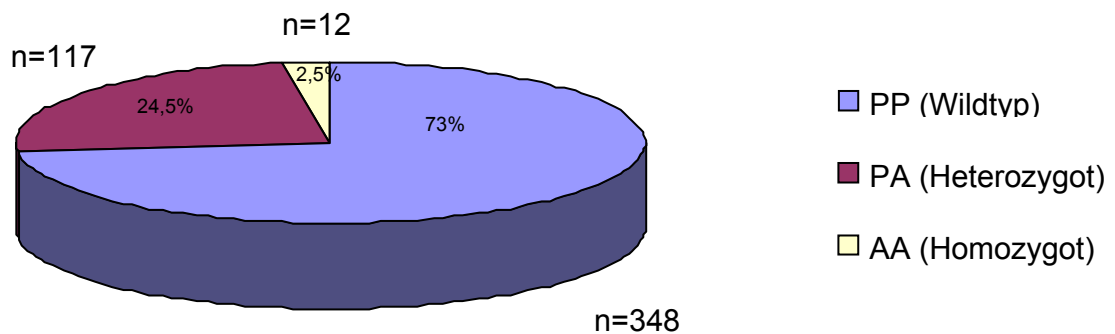
3.1 Einführung

Zunächst wurde die PPAR γ 2-Genotypverteilung auf eine Unabhängigkeit von Geschlecht und Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz geprüft. Weiterhin wurde eine mögliche Assoziation mit klinischen Parametern wie Alter, BMI und Lipidwerten untersucht und durch Gegenüberstellung der Patientenkollektive eine differenziertere Betrachtung ermöglicht. Abschließend folgten eine detaillierte Prüfung des Zusammenhanges zwischen Genotyp und Hyperlipoproteinämien anhand der klinischen Werte und ein Vergleich der in Gewichtskategorien und Altersgruppen eingeteilten Patienten. Ergänzend wurden Diabetes mellitus Typ2 sowie Adipositas untersucht.

3.2 Verteilung des PPAR γ 2-Genotypen im Gesamtkollektiv

Für die Exonregion des PPAR γ 2-Gens sind an Nukleotidposition 34 zwei Allele bekannt, das häufigere Allel P und das seltenere Allel A. Da jede Person zwei Allele besitzt, ergeben sich für PPAR γ drei Genotypen, nämlich PP (Wildtyp), PA (Heterozygot) und AA (Homozygot). Im Gesamtkollektiv wurden 348 Wildtypen (N_{PP}), 118 Heterozygote (N_{PA}) und 12 Homozygote (N_{AA}) vorgefunden. In Abbildung 8 ist neben der absoluten Anzahl der unterschiedlichen Genotypen auch die relative Häufigkeit wiedergegeben.

Nach der Genzähl-Methode wurden die Allelfrequenzen ermittelt. Die Frequenz für das P-Allel beträgt 0,852, die für das A-Allel entsprechend 0,148.

Abbildung 8 Relative und absolute Häufigkeiten der Genotypverteilung

3.2.1 PPAR γ 2-Genotypverteilung bei Männern und Frauen

Vor der weiteren Analyse wurde geprüft, ob die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen grundsätzlich geschlechtsabhängige Unterschiede zeigte. Bei einer ungleichen Genotypverteilung unter Männern und Frauen könnte im Hinblick auf die Allelfrequenzen sowie klinischen Parametern eine Abhängigkeit vorgetäuscht werden. Das Gesamtkollektiv wurde unter Berücksichtigung des Geschlechts in zwei Gruppen aufgeteilt. In Tabelle 11 sind neben den gezählten Häufigkeiten die relativen Anteile aufgeführt sowie die Frequenz für das Allel A. Die Frequenz des Allel A ist bei Frauen mit 0,141 etwas niedriger als bei Männern mit 0,153 und ohne statistische Signifikanz ($P = 0,6014$). Für die weiteren Untersuchungen von Allelfrequenzen wurden die Geschlechter daher zusammengefasst.

Tabelle 11 Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen bei Männern und Frauen.

Geschlecht	PP	PA	AA	PP %	PA %	AA %	Allel A
Frauen	146	50	3	73,4	25,1	1,5	0,141
Männer	202	67	9	72,7	24,1	3,2	0,153

Chi-Quadrat = 0,27; Freiheitsgrade 2; P-Wert = 0,60. Drei Personen des Gesamtkollektivs konnten aufgrund fehlender Angabe des Geschlechts nicht einbezogen werden.

3.2.2 Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz

Anhand der berechneten Allelfrequenzen wurde geprüft, ob die Genotypverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz im Gleichgewicht ist. Die Unterschiede von beobachteter und erwarteter Verteilung ergaben ein Chi-Quadrat von 0,338 und einen p-Wert von 0,62. Daraus folgt eine Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Die Daten wurden in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12 Verteilung der Genotypen im Gesamtkollektiv

Genotyp	Beobachtet		Erwartet		$(B-E)^2/E$
PP	348	73,0 %	346,4	72,6 %	0,007
PA	117	24,5 %	120,2	25,2 %	0,085
AA	12	2,5 %	10,4	2,2 %	0,246
Summe	477	100 %	477	100 %	0,338

Chi-Quadrat = 0,338, Freiheitsgrad = 1, P = 0,62. B = Beobachtet, E = Erwartet.

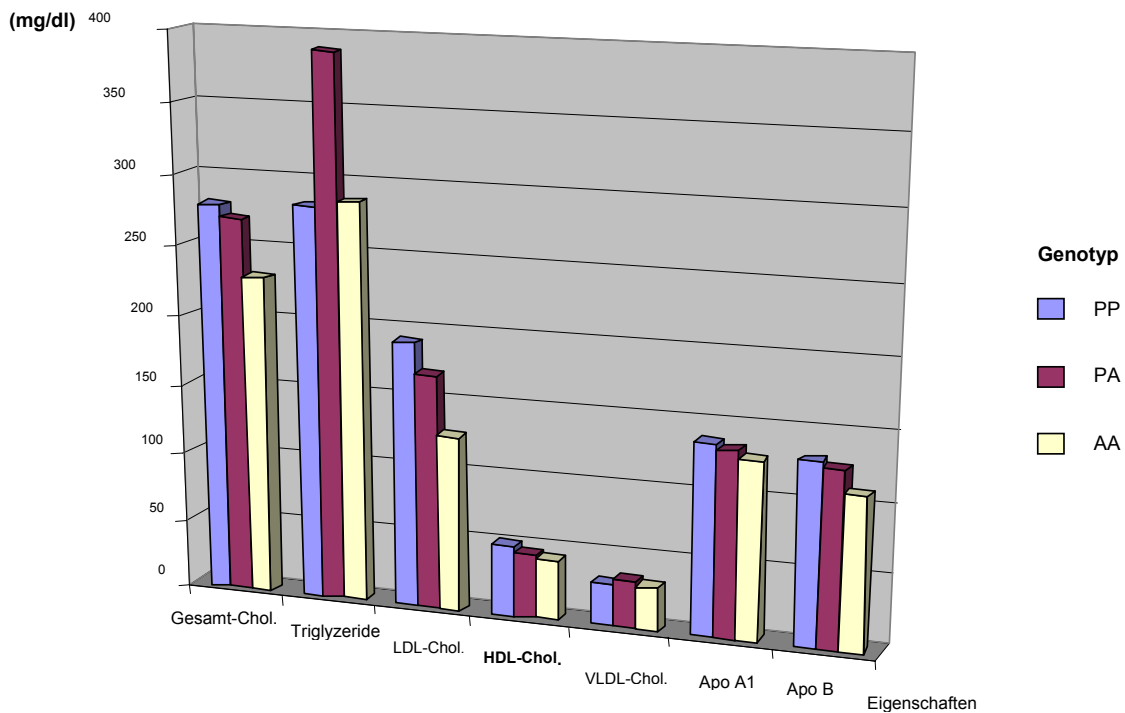
3.2.3 Assoziationen der PPAR γ 2-Genotypen mit klinischen Daten

Im Hinblick auf den BMI konnten bei den Genotypen vergleichbare aber sich nicht signifikant unterscheidende Werte beobachtet werden. Bei den Lipidwerten hingegen traten Unterschiede auf, wobei nur zwischen Wildtypen und Heterozygoten das Signifikanzniveau erreicht wurde. Eine fehlende statistische Signifikanz bezüglich der Homozygoten kann möglicherweise auf deren geringe Anzahl zurückgeführt werden. Dabei wiesen Wildtypen insgesamt höhere und damit ungünstigere Werte für Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Apo A₁ und Apo B auf. Lediglich bei den Triglyzeriden konnten höhere Werte für Heterozygote und Homozygoten festgestellt werden (siehe Tab. 13).

Tabelle 13 Charakterisierung des Gesamtkollektivs (N = 477) unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=348)	PA(n=117)	P	AA(n=12)	P
Alter	Jahre	46 ± 14	45 ± 14	0,374	43 ± 10	0,382
BMI	(kg/m ²)	26 ± 4	27 ± 5	0,058	27 ± 5	0,418
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	279 ± 76	270 ± 77	0,148	229 ± 80	0,071
Triglyzeride	(mg/dl)	282 ± 349	388 ± 657	0,039	286 ± 276	0,588
LDL-Chol.	(mg/dl)	191 ± 69	169 ± 60	0,006	126 ± 57	0,074
HDL-Chol.	(mg/dl)	51 ± 17	46 ± 16	0,011	44 ± 15	0,390
VLDL-Chol.	(mg/dl)	31 ± 17	35 ± 20	0,193	31 ± 15	0,820
Apo A ₁	(mg/dl)	138 ± 30	134 ± 29	0,232	128 ± 35	0,684
Apo B	(mg/dl)	131 ± 40	127 ± 41	0,136	111 ± 42	0,156

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte (P < 0,05) sind rot gedruckt.

Abb. 9 Graphische Darstellung der Eigenschaften des Gesamtkollektivs

3.2.4 Zusammenfassung der PPAR γ 2-Verteilung im Gesamtkollektiv

Die Verteilung des PPAR γ 2-Polymorphismus im Gesamtkollektiv war in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Es zeigte sich keine Abhängigkeit vom Geschlecht. Der BMI der drei Genotypen war vergleichbar. Insgesamt verzeichneten die Wildtypen ein ungünstigeres Lipidprofil.

3.3 Analyse der Patientenkollektive

Die Gesamtstichprobe wurde aus sieben verschiedenen Kollektiven rekrutiert, die im Abschnitt 2 näher klassifiziert wurden. Um die Besonderheiten der einzelnen Kollektive hervorzuheben, wurden die Häufigkeiten bestimmter Eigenschaften gegenübergestellt (Tab. 14). Neben Unterschieden, die in den jeweiligen Selektionskriterien begründet lagen, variierte darüber hinaus die Verteilung der Lipidwerte und unspezifischer Merkmale wie Alter und Geschlecht. So fand sich der größte Anteil an jüngeren (50 %) sowie weiblichen Patienten (57 %) im Hypercholesterinämie-Kollektiv,

wohingegen in allen anderen Gruppen das männliche Geschlecht zahlenmäßig dominierte, insbesondere im gemischten HLP-Kollektiv (74 %). Bei Betrachtung der Diabetiker, welche prozentual am häufigsten im Adipositas- und HTG-Kollektiv vertreten waren, zeigten 79 % der Patienten erhöhte Gesamt-Cholesterin-Werte. Vergleichbare Befunde spiegelten sich bei den Adipösen wieder, die außerdem in 68% der Fälle erhöhte Triglyzeridwerte aufwiesen. Im Hinblick auf die unten angeführten Lipoproteinfraktionen, war weiterhin auffällig, dass im HTG-Kollektiv das ungünstigste Profil (52 % der Patienten mit erniedrigtem HDL und 78 % mit erhöhtem VLDL) vorherrschte. Bezüglich der HC-Gruppe konnte in 84 % der Fälle neben erwartungsgemäß hohen LDL-Werten, nur in 3 % eine ungünstige HDL-Konstellation beobachtet werden.

Tabelle 14 Häufigkeiten bestimmter Eigenschaften in den sieben Kollektiven

Eigenschaften		HLP	HC	HTG	GHLP	DM II	AD	Non-HLP
Anzahl	N	438	234	27	176	56	80	39
Männer	%	57	43	67	74	64	63	
Frauen	%	43	57	33	26	36	37	
Alter < Median*	%	48	50	22	49	38	40	46
D.m.	%	11	5	22	18	100	28	15
BMI ≥ 30 kg/m ²	%	17	9	19	28	39	100	13
Triglyzeride ≥ 200 mg/dl	%	40	0	100	100	68	68	0
Gesamt-Chol. ≥ 200 mg/dl	%	40	100	0	100	79	86	0
LDL ≥ 155 mg/dl	%	58	84	0	33	32	36	0
HDL ≤ 35 mg/dl	%	17	3	52	30	36	34	18
VLDL ≥ 30 mg/dl	%	38	23	78	51	41	31	15

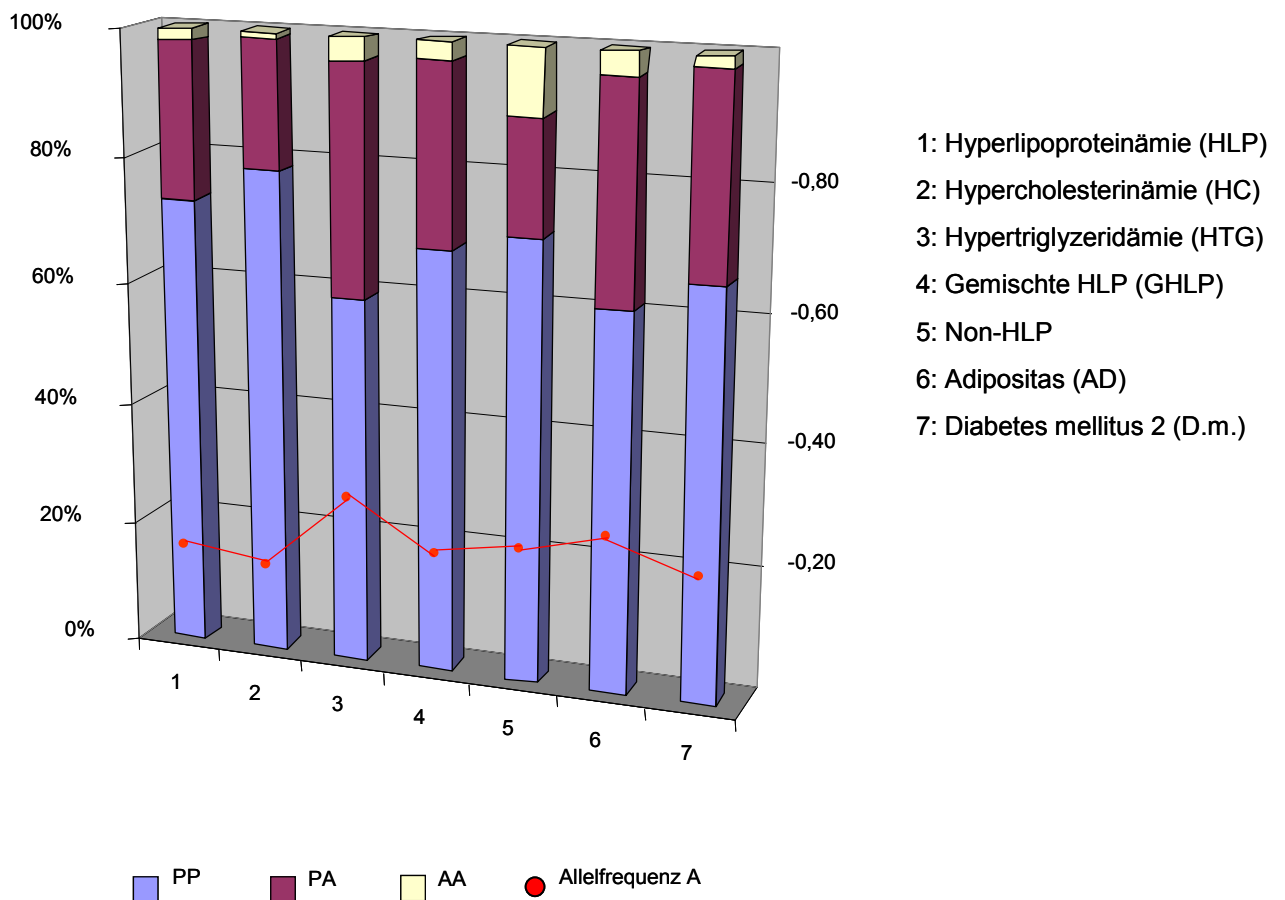
*Median des Alters ist 45 Jahre. Die dem Einschlusskriterium entsprechenden Werte sind rot gedruckt.
HLP = Hyperlipoproteinämie, HC = Hypercholesterinämie, HTG = Hypertriglyzeridämie, DM II = Diabetes mellitus Typ 2, AD = Adipositas, Non-HLP = Keine Hyperlipoproteinämie.

Gemäß der in Abschnitt 2 näher beschriebenen Einschlusskriterien unter Berücksichtigung der isolierten und gemischten Hyperlipoproteinämien zeigten nicht alle HLP-Patienten gleichzeitig erhöhte Triglyzerid- und Gesamt-Cholesterin-Werte.

3.3.1 Vergleich der Allelfrequenzen in den sieben Kollektiven

Die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen in den beschriebenen Untergruppen wurde mit der Fragestellung, ob der PPAR γ 2-Polymorphismus in einem der Kollektive auffällig häufig vorkommt, geprüft.

Abbildung 10 Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen in den sieben Kollektiven



Von besonderem Interesse war der Vergleich der Patienten aus dem HLP-Kollektiv bzw. dessen Untergruppen mit dem Non-HLP-Kollektiv. Die höchste Allelfrequenz A wurde mit 0,222 bei den Patienten mit Hypertriglyzeridämie vorgefunden. Im Hypercholesterinämie-Kollektiv wurde mit 0,111 die niedrigste Allelfrequenz bestimmt. Diabetiker und Adipöse lagen mit Allelfrequenzen von 0,179 und 0,213 über dem Mittel, Patienten mit gemischter Hyperlipoproteinämie mit 0,173 darunter. In der Abbildung 10 sind die relativen Anteile von PA- und AA- Genotyp als Säulen (linke Y-Achse) und die Allelfrequenz A als Linie (rechte Y-Achse) eingezeichnet. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass Patienten ohne Hyperlipoproteinämie mit 0,197 eine nicht nur deutlich über dem Mittelwert liegende Allelfrequenz zu verzeichnen hatten, sondern diese auch gegenüber den HLP-Gruppen, mit Ausnahme der HTG-Patienten, erhöht war. Ein signifikanter Unterschied ($P = 0,034$) fiel lediglich bezüglich des HC-Kollektivs auf. Die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen innerhalb der sieben Kollektive war insgesamt statistisch unauffällig mit Chi-Quadrat von 7,88, $df = 12$ und $P = 0,80$ (vergleiche Tab. 15). Auch die für Frauen und Männer getrennt durchgeführte Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede (Werte nicht gezeigt). Die direkte Gegenüberstellung der Kollektive mit höchster und niedrigster Allelfrequenz ergab jedoch mit Chi-Quadrat = 5,56, $df = 2$ und $P = 0,018$ einen signifikanten Unterschied. Möglicherweise ist dieser durch die niedrige Fallzahl von nur 27 Patienten im HTG-Kollektiv gegenüber 234 Patienten im HC-Kollektiv zu erklären. Bei Betrachtung der Prozentanteile der Homozygoten fielen teilweise relativ große Spannbreiten (0,9 bis 10,5 %) auf, wobei die Patienten ohne HLP mit 10,5 % den größten Anteil zu verzeichnen hatten. Schwankungen unterlagen ebenfalls Wildtypen (59,3 % bis 78,6 %) und Heterozygote (18,4 % bis 35 %). Auch hier könnten die Unterschiede auf die zahlenmäßig ungleiche Patientenverteilung zurückgeführt werden.

Bei abschließender Prüfung auf Übereinstimmung des Hardy-Weinberg-Gesetzes konnte dies mit einem Chi-Quadrat von 0,18 ($P = 0,72$) im HLP-, 0,353 ($P = 0,61$) im HC-, 0,13 ($P = 0,75$) im HTG-, 0,025 ($P = 0,97$) im gemischtem HLP- und 0,16 ($P = 0,73$) im Adipositas- bzw. 0,529 ($P = 0,50$) im Diabetes-Kollektiv bestätigt werden, wohingegen das Non-HLP-Kollektiv mit Chi-Quadrat = 6,51 und einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,014$ dies nicht erfüllte.

Tabelle 15 Chi-Quadrat der Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen in den Kollektiven. Oben: Beobachtete Verteilung. Unten: Erwartete Verteilung.

Beobachtet	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
HLP	320	110	8	438	73,1	25,1	1,8	0,144
HC	184	48	2	234	78,6	20,5	0,9	0,111
HTG	16	10	1	27	59,3	37,0	3,7	0,222
GHLP	120	51	5	176	68,2	29,0	2,8	0,173
Non-HLP	27	7	4	38	71,1	18,4	10,5	0,197
AD	49	28	3	80	61,3	35,0	3,8	0,213
DM II	37	18	1	56	66,1	32,1	1,8	0,179

Erwartet	PP	PA	AA	Σ	$(B-E)^2/E$	$(B-E)^2/E$	$(B-E)^2/E$	Σ
HLP	319,5	110,9	7,6	438	0,003	0,045	0,133	0,181
HC	184,9	46,2	2,9	234	0,004	0,070	0,279	0,353
HTG	16,4	9,3	1,3	27	0,006	0,053	0,069	0,128
GHLP	120,3	50,4	5,3	176	0,0007	0,007	0,017	0,025
Non-HLP	24,5	12,0	1,5	38	0,255	2,083	4,167	6,505
AD	49,6	26,8	3,6	80	0,007	0,054	0,1	0,161
DM II	37,8	16,4	1,8	56	0,017	0,156	0,356	0,529
Σ	753	272	27	1049	0,293	2,468	5,121	7,882

Chi-Quadrat = 7,882, Freiheitsgrade 12, P-Wert = 0,80.

HLP = Hyperlipoproteinämie, HC = Hypercholesterinämie, HTG = Hypertriglyzeridämie, GHLP = Gemischte HLP, Non-HLP = Keine HLP, AD = Adipositas, DM II = Diabetes mellitus Typ 2, Σ = Summe.

3.3.2 Zusammenfassung der Analyse der Patientenkollektive

Die Kollektive hatten deutliche Unterschiede entsprechend der Einschlusskriterien aufzuweisen. Zudem zeigte sich neben einer auffälligen Verteilung des Geschlechts ein eher gleichmäßiges (um den Median herum) Auftreten des Alters.

Die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen innerhalb der sieben Kollektive war insgesamt statistisch unauffällig und entsprach mit Ausnahme des Non-HLP-Kollektivs dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Eine auffällig hohe A-Allelfrequenz mit dem größten Anteil an Homozygoten konnte bei Non-HLP-Patienten nachgewiesen werden. Die höchste A-Allelfrequenz wurde bei HTG-Patienten beobachtet.

3.4 PPAR γ 2-Genotyp und Stoffwechselkrankheiten

Aufgrund der Häufung von Patienten mit Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, gemischter Hyperlipoproteinämie und Diabetes mellitus Typ2 im Gesamtkollektiv wurde eine genauere Untersuchung des Zusammenhangs der PPAR γ 2-Genotypen mit diesen Stoffwechselkrankheiten ermöglicht.

3.4.1 PPAR γ 2-Genotyp und Lipidstoffwechsel

Im Gesamtkollektiv sind Unterschiede bei den Lipidwerten in Abhängigkeit vom PPAR γ 2-Genotyp beobachtet worden. Um einen möglichen Zusammenhang aufzeigen zu können, wurden die Lipidwerte für Männer und Frauen getrennt betrachtet. Die klinischen Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Bei Frauen wurde für Wildtypen nicht nur ein signifikant höheres LDL- sondern auch HDL-Cholesterin als für Heterozygote festgestellt (Tab. 16). Trotz gleicher Konstellation für das Gesamt-Cholesterin konnte das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht werden. Insgesamt bot der PA-Genotyp jedoch ein schlechteres Lipidprofil (höhere Triglyzeride, Apo B und niedrigere HDL sowie Apo A₁) als der PP-Genotyp. Die günstigste Lipid-Konstellation konnte den Homozygoten zugeschrieben werden, wobei aufgrund einer geringen Fallzahl diese Befunde nicht statistisch signifikant waren.

Tabelle 16 Lipidwerte der 199 Frauen unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften	PP(n=146)	PA(n=50)	P	AA(n=3)	P
Gesamt-Chol. (mg/dl)	290 ± 74	271 ± 75	0,051	212 ± 106	0,234
Triglyzeride (mg/dl)	193 ± 245	243 ± 304	0,140	151 ± 87	0,892
LDL-Chol. (mg/dl)	200 ± 69	171 ± 63	0,010	126 ± 82	0,099
HDL-Chol. (mg/dl)	61 ± 19	53 ± 18	0,003	55 ± 12	0,720
VLDL-Chol. (mg/dl)	27 ± 15	31 ± 18	0,254	30 ± 18	0,693
Apo A ₁ (mg/dl)	153 ± 32	127 ± 39	0,134	144 ± 26	0,766
Apo B (mg/dl)	136 ± 42	145 ± 30	0,048	109 ± 63	0,690

Tabelle 17 Lipidwerte der 278 Männer unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften	PP(n=202)	PA(n=67)	P	AA(n=9)	P
Gesamt-Chol. (mg/dl)	271 ± 77	269 ± 79	0,831	235 ± 77	0,209
Triglyzeride (mg/dl)	347 ± 397	496 ± 814	0,116	331 ± 306	0,821
LDL-Chol. (mg/dl)	182 ± 68	166 ± 58	0,167	127 ± 50	0,032
HDL-Chol. (mg/dl)	44 ± 12	41 ± 12	0,185	40 ± 15	0,841
VLDL-Chol. (mg/dl)	35 ± 19	39 ± 21	0,428	32 ± 16	0,863
Apo A ₁ (mg/dl)	127 ± 37	126 ± 26	0,727	122 ± 38	0,789
Apo B (mg/dl)	127 ± 22	127 ± 43	0,652	111 ± 37	0,210

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt.

Diese bei Frauen festgestellten Unterschiede waren auch bei Männern mit gleicher Tendenz vorhanden (Tab. 17). Das statistische Signifikanzniveau wurde hier allerdings nur einmalig beim Vergleich der mittleren Werte für LDL-Cholesterin zwischen PP- und AA-Genotyp erreicht.

3.4.1.1 Parameter im Gesamt- Hyperlipoproteinämie-Kollektiv

Im HLP-Kollektiv hatten A-Allelträger einen signifikant größeren BMI ($1\text{kg}/\text{m}^2$) als Wildtypen. Bei Betrachtung des Lipidprofils fand sich bei den PP- wie auch den PA-Genotypen eine ungünstigere Konstellation als bei den AA-Individuen (höheres Gesamt-Chol. und höheres LDL- bzw. höhere Triglyzerid-Werte und niedrigeres HDL). Diese Befunde konnten durch ähnliche Ergebnisse in der Apo B-Fraktion untermauert werden, wobei der Unterschied zwischen Wildtypen und Heterozygoten das statistische Signifikanzniveau erreichte (Tab. 18).

Tabelle 18 Eigenschaften der 438 Patienten mit Hyperlipoproteinämie

Eigenschaften		PP(n=320)	PA(n=110)	P	AA(n=8)	P
Alter	Jahre	46 ± 14	44 ± 14	0,314	43 ± 10	0,268
BMI	(kg/m^2)	26 ± 4	27 ± 5	0,008	27 ± 5	0,193
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	288 ± 73	276 ± 76	0,056	229 ± 80	0,776
Triglyzeride	(mg/dl)	297 ± 360	407 ± 674	0,041	286 ± 276	0,129
LDL-Chol.	(mg/dl)	199 ± 67	173 ± 61	0,001	126 ± 57	0,250
HDL-Chol.	(mg/dl)	51 ± 18	47 ± 16	0,022	44 ± 15	0,965
VLDL-Chol.	(mg/dl)	32 ± 18	36 ± 20	0,167	31 ± 15	0,271
Apo A ₁	(mg/dl)	139 ± 39	135 ± 29	0,219	128 ± 35	0,831
Apo B	(mg/dl)	134 ± 39	129 ± 41	0,044	111 ± 42	0,369

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt.

Während Wildtypen bei direktem Vergleich mit Heterozygoten signifikant höhere LDL- und HDL-Werte zeigten, wiesen die PA-Individuen erhöhte Triglyzerid-Werte auf, wobei auch hier der Unterschied das statistische Signifikanzniveau von 95 % erreichte. Die nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse ergab ähnliche

Ergebnisse bei den Frauen, wohingegen bei den Männern nur im Hinblick auf BMI sowie Triglyzeride signifikante Unterschiede nachweisbar waren (Werte nicht gezeigt).

3.4.1.2 Unterteilung des Hyperlipoproteinämie-Kollektivs und Analyse der Parameter

Um den Zusammenhang von Hyperlipoproteinämien und PPAR γ 2-Genotyp genauer untersuchen zu können, wurden die Patienten aus dem HLP-Kollektiv deskriptiven Kriterien nach in drei Gruppen eingeteilt. Zum einen in die Gruppe der Hypertriglyzeridämie (Patienten mit isoliert erhöhten Triglyzeridwerten > 200 mg/dl), zum anderen in die der Hypercholesterinämie (Patienten mit isoliert erhöhten Gesamtcholesterinwerten > 200 mg/dl) und schließlich noch in die Gruppe der kombinierten Hyperlipoproteinämie (parallel erhöhte Triglyzerid- und Cholesterin-Werte).

3.4.1.2.1 Parameter im Hypercholesterinämie-Kollektiv

Bei gleichzeitig größtem BMI und höchstem Durchschnittsalter hatten die Homozygoten, wie bereits im HLP-Kollektiv, die günstigste, Wildtypen dagegen mit höheren Gesamt-Chol.- und LDL-Chol.-Werten die ungünstigste Lipidkonstellation (Unterschiede statistisch signifikant). Die Heterozygoten verzeichneten auffällige ApoB-Werte, welche bei Gegenüberstellung mit den Wildtypen das Signifikanzniveau erreichten. Auch die nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse ergab ähnliche Werte für Frauen ($P = 0,014$, $P = 0,049$ und $P = 0,018$). Zudem wurde beim weiblichen Geschlecht das Signifikanzniveau mit $P = 0,016$ bei den HDL-Cholesterin-Werten erreicht. Bei den männlichen Individuen hingegen waren die aufgeführten Unterschiede zwischen Normaltypen und Heterozygoten nicht mehr signifikant nachweisbar. Die Werte sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 Eigenschaften der 234 Patienten mit Hypercholesterinämie unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=184)	PA(n=48)	P	AA(n=2)	P
Alter	Jahre	45 ± 14	42 ± 15	0,307	53 ± 11	0,398
BMI	(kg/m ²)	25 ± 3	25 ± 4	0,677	29 ± 6	0,205
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	292 ± 61	271 ± 58	0,009	255 ± 7	0,325
Triglyzeride	(mg/dl)	113 ± 41	108 ± 41	0,450	120 ± 8	0,751
LDL-Chol.	(mg/dl)	211 ± 61	191 ± 57	0,022	176 ± 6	0,369
HDL-Chol.	(mg/dl)	59 ± 17	58 ± 17	0,557	55 ± 11	0,787
VLDL-Chol.	(mg/dl)	23 ± 10	22 ± 8	0,457	24 ± 1	0,741
Apo A ₁	(mg/dl)	145 ± 29	128 ± 35	0,716	142 ± 18	0,884
Apo B	(mg/dl)	139 ± 36	143 ± 27	0,008	128 ± 5	0,607

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt.

3.4.1.2.2 Parameter im Hypertriglyzeridämie-Kollektiv

Aufgrund der geringen Anzahl an Homozygoten wurden die AA-Individuen mit den PA-Genotypen in einer Gruppe zusammengefasst, so dass der Genotyp in diesem speziellen Fall als dichotome Variable (Anwesenheit oder Fehlen des Polymorphismus) untersucht wurde. Bei Analyse der klinischen Werte konnten keine Besonderheiten in Bezug auf Alter, BMI und Lipidwerte nachgewiesen werden. Bezüglich der Homozygoten konnte keine konkrete Aussage mit statistischer Relevanz getroffen werden.

Tabelle 20 Eigenschaften der 27 Patienten mit Hypertriglyzeridämie unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=16)	PA(n=10)	P	AA(n=1)	P
Alter	Jahre	53 ± 16	50 ± 8	0,586	44	*
BMI	(kg/m ²)	28 ± 3	28 ± 2	0,961	21	*
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	173 ± 18	179 ± 12	0,429	190	*
Triglyzeride	(mg/dl)	379 ± 179	345 ± 139	0,474	226	*
LDL-Chol.	(mg/dl)	81 ± 18	77 ± 16	0,698	87	*
HDL-Chol.	(mg/dl)	37 ± 18	37 ± 9	0,288	58	*
VLDL-Chol.	(mg/dl)	58 ± 12	61 ± 13	0,778	45	*
Apo A ₁	(mg/dl)	126 ± 52	132 ± 43	0,311	86	*
Apo B	(mg/dl)	83 ± 18	92 ± 15	0,444	157	*

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt. * Bei Berechnung der Wahrscheinlichkeit P bzw. der Signifikanz wurden PA- und AA-Genotypen zusammengefasst.

3.4.1.2.3 Parameter im Kollektiv mit gemischter Hyperlipoproteinämie

Bei annähernd gleich hohen Gesamt-Chol.-Werten, wiesen die Patienten mit gemischter HLP bei allen Genotypen im Vergleich zu den bisher untersuchten Kollektiven die höchsten Triglyzeridwerte auf. Beim Vergleich der übrigen Lipidwerte zeigten sich keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede, wie der Tabelle 21 zu entnehmen ist. Hinsichtlich des BMI und Alters fanden sich bei A-Allelträgern die jüngsten und übergewichtigsten Patienten.

Tabelle 21 Eigenschaften der 176 Patienten mit gemischter Hyperlipoproteinämie unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=120)	PA(n=51)	P	AA(n=5)	P
Alter	Jahre	47 ± 13	45 ± 13	0,470	36 ± 5	0,044
BMI	(kg/m ²)	27 ± 4	28 ± 5	0,004	29 ± 4	0,246
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	296 ± 82	300 ± 82	0,627	299 ± 40	0,525
Triglyzeride	(mg/dl)	569 ± 461	704 ± 899	0,361	507 ± 315	0,970
LDL-Chol.	(mg/dl)	188 ± 66	171 ± 44	0,423	187 ± 17	0,780
HDL-Chol.	(mg/dl)	41 ± 11	38 ± 10	0,264	44 ± 14	0,590
VLDL-Chol.	(mg/dl)	55 ± 11	56 ± 12	0,673	51 ± 1	0,680
Apo A ₁	(mg/dl)	131 ± 24	136 ± 46	0,900	141 ± 23	0,338
Apo B	(mg/dl)	134 ± 41	129 ± 26	0,580	143 ± 31	0,249

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt.

3.4.2 PPAR γ 2-Genotyp und Diabetes mellitus Typ2

Für die Untersuchung einer möglichen Assoziation des Pro12Ala-Polymorphismus mit Diabetes mellitus Typ2 wurden Diabetiker mit Nicht-Diabetikern verglichen (Tab. 22).

Tabelle 22 Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern

Kollektiv	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
Diabetiker	37	18	1	56	66,1	32,1	1,8	0,179
N.-Diabetiker	311	99	11	421	73,9	23,5	2,6	0,144
Σ	348	117	12	477	73,0	24,5	2,5	0,148

Chi-Quadrat = 0,95, Freiheitsgrade 2, P-Wert = 0,329.

Tabelle 23 Eigenschaften der 56 Patienten mit Diabetes mellitus Typ2 unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=37)	PA(n=18)	P	AA(n=1)	P
Alter	Jahre	51 ± 13	49 ± 12	0,585	44	*
BMI	(kg/m ²)	28 ± 4	33 ± 4	0,0009	21	*
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	263 ± 79	298 ± 104	0,295	190	*
Triglyzeride	(mg/dl)	417 ± 441	632 ± 573	0,065	226	*
LDL-Chol.	(mg/dl)	161 ± 59	167 ± 66	0,921	87	*
HDL-Chol.	(mg/dl)	44 ± 17	37 ± 10	0,271	58	*
VLDL-Chol.	(mg/dl)	38 ± 19	53 ± 22	0,480	45	*
Apo A ₁	(mg/dl)	129 ± 40	138 ± 58	0,938	86	*
Apo B	(mg/dl)	131 ± 35	132 ± 33	0,869	157	*

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind fett gedruckt. * Bei Berechnung der Wahrscheinlichkeit P bzw. der Signifikanz wurden PA- und AA-Genotypen zusammengefasst.

Die A-Allelfrequenzen betragen 0,179 bei Diabetikern und 0,144 bei Nicht-Diabetikern. Dieser Trend war bei Frauen mit Allelfrequenzen von 0,175 und 0,137 ausgeprägter als bei Männern mit 0,179 bzw. 0,149. Die Unterschiede der Genotypverteilung waren weder im Gesamtkollektiv ($P = 0,329$) noch nach Geschlecht getrennt ($P = 0,484$ bzw. $P = 0,511$) statistisch signifikant. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung der klinischen Werte in Abhängigkeit von den Genotypen (Tab. 23). Aufgrund der geringen Anzahl an Homozygoten wurden die AA-Individuen mit den PA-Genotypen in einer Gruppe zusammengefasst, so dass der Genotyp in diesem speziellen Fall als dichotome Variable (Anwesenheit oder Fehlen des Polymorphismus) untersucht wurde (analog zu Tab. 21). Hierbei wurden lediglich signifikante Unterschiede bezüglich des mittleren BMI festgestellt, der bei den Heterozygoten (mit 32,5 kg/m²) am größten war, gefolgt von den Wildtypen und Homozygoten.

3.4.3 Zusammenfassung der Untersuchung zu den Stoffwechselkrankheiten

Im Gesamtkollektiv wie auch bei der Analyse der klinischen Daten der HLP- und HC-Kollektive zeigten die Homozygoten die günstigste Lipidkonstellation.

Im HLP-Kollektiv hatten A-Allelträger einen signifikant größeren BMI (1 kg/m^2).

Bei den Patienten mit gemischter HLP konnten die höchsten Triglyzeridwerte aller Kollektive beobachtet werden. Weiterhin kamen innerhalb dieser Gruppe bei den A-Allelträgern sowohl die jüngsten als auch die übergewichtigsten Patienten vor.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen PPAR γ 2-Genotyp und Diabetes mellitus Typ2 nachgewiesen werden.

3.5 PPAR γ 2-Genotyp und BMI

Um den Zusammenhang zwischen Körpergewicht und PPAR γ 2-Genotyp genauer zu untersuchen, wurden die Patienten aus dem HLP-Gesamtkollektiv gemäß der WHO-Klassifikation in Normalgewichtige (BMI 18,5-24,9 kg/m^2), Übergewichtige (BMI 25-29,9 kg/m^2) und Adipöse (BMI > 30 kg/m^2) eingeteilt.

Weiterhin wurde die Gesamtstichprobe aufgeteilt in jüngere und ältere Personen in Anlehnung an den Median des Alters (45 Jahre), um so einen möglichen Zusammenhang der A-Allelträger mit dem Alter aufzeigen zu können. Als Kontroll- bzw. Vergleichsgruppe wurden Patienten mit innerhalb des Normbereichs liegenden Lipidwerten herangezogen.

3.5.1 Allelfrequenzen nach BMI-Kategorien

Die Aufteilung des Gesamtkollektivs in Gewichtskategorien ergab, dass das A-Allel um so häufiger vorkam, je größer der BMI war. So konnte die höchste A-Allelfrequenz mit 0,21 bei den morbid Adipösen (BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$), die niedrigste mit 0,12 bei den Normalgewichtigen (BMI 18,5 - 24,9 kg/m^2) beobachtet werden. Diese auffällige Allelverteilung erreichte das statistische Signifikanzniveau ($P = 0,009$). In der Gruppe der Adipösen fiel der hohe Anteil an Heterozygoten (35 %) bei gleichzeitig niedrigem Prozentsatz an Wildtypen (61,3 %) auf. Non-HLP-Patienten verzeichneten mit 0,197

die zweithöchste A-Allelfrequenz (Tab.24). Außerdem wurde eine ungewöhnliche Genotypverteilung mit niedrigem Anteil an Heterozygoten (18,4 %) und hohem Anteil an Homozygoten (10,5 %) beobachtet ($P = 0,013$). Möglicherweise sind diese Abweichungen durch die geringe Fallzahl (27 Patienten) zu erklären.

Bei Anwendung des Chi-Quadrat Tests konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,18$) festgestellt werden. Auch die nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse erbrachte keine statistischen Auffälligkeiten (Werte nicht gezeigt).

Tabelle 24 Chi-Quadrat der Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen in den drei Gewichtskategorien und bei den Non-HLP-Patienten.

Oben: Beobachtete Verteilung. Unten: Erwartete Verteilung

Beobachtet	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
BMI ≥ 30	49	28	3	80	61,3	35,0	3,8	0,213
BMI 25 – 29,9	146	51	4	201	72,6	25,4	2,0	0,147
BMI 18,5 – 24,9	145	36	5	186	77,9	19,4	2,7	0,124
Non-HLP	27	7	4	38	71,1	18,4	10,5	0,197

Erwartet	PP	PA	AA	Σ	$(B-E)^2/E$	$(B-E)^2/E$	$(B-E)^2/E$	Σ
BMI ≥ 30	49,6	26,8	3,6	80	0,0073	0,054	0,10	0,16
BMI 25 - 29,9	146,3	50,4	4,3	201	0,0006	0,009	0,021	0,031
BMI 18,5 - 24,9	144,9	35,3	5,8	186	0,034	0,459	1,729	2,22
Non-HLP	26,2	9,5	2,3	38	0,2551	2,083	4,167	6,50
Σ	367	122	16		0,30	2,60	6,0	8,90

Chi-Quadrat = 8,9, Freiheitsgrade 6, P-Wert = 0,18, BMI in [kg/m 2].

3.5.2 Parameter von Adipösen, Übergewichtigen, Normalgewichtigen und Non-HLP-Patienten

Der Einfluss der PPAR γ -2-Genotypen auf die klinischen Werte wurde für Patienten mit morbidem Adipositas und Übergewicht sowie für normalgewichtige Patienten getrennt geprüft. Als Vergleichsgruppe wurden die Patienten ohne erhöhte Lipidwerte (Non-HLP) aufgeführt. Bei dieser Untersuchung muss jedoch auf die zahlenmäßige Inhomogenität der gegenübergestellten Kollektive hingewiesen werden.

3.5.2.1 Patienten mit Adipositas

Bei Betrachtung des mittleren BMI war dieser mit 34,3 kg/m² bei den Heterozygoten am größten.

Tabelle 25 Eigenschaften des Adipositas-Kollektivs (N=80) unter Berücksichtigung der PPAR γ 2-Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=49)	PA(n=28)	P	AA(n=3)	P
Alter	Jahre	48 ± 14	51 ± 12	0,546	37 ± 9	0,157
BMI	(kg/m ²)	33 ± 3	34 ± 3	0,032	33 ± 0,3	0,596
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	289 ± 111	298 ± 91	0,338	263 ± 12	0,953
Triglyzeride	(mg/dl)	464 ± 499	597 ± 536	0,105	570 ± 449	0,596
LDL-Chol.	(mg/dl)	195 ± 93	175 ± 53	0,678	180 ± 0	1,0
HDL-Chol.	(mg/dl)	44 ± 15	39 ± 10	0,173	35 ± 10	0,247
VLDL-Chol.	(mg/dl)	34 ± 17	45 ± 22	0,121	23 ± 0	1,0
Apo A ₁	(mg/dl)	133 ± 28	129 ± 28	0,787	119 ± 27	0,680
Apo B	(mg/dl)	113 ± 44	132 ± 52	0,360	123 ± 15	0,875

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte (P < 0,05) sind rot gedruckt.

Erklärt werden konnte dies durch die hohen Werte der weiblichen Patienten (35 kg/m²) im Vergleich zu den männlichen Individuen (32 kg/m²). Der Unterschied zwischen Normaltypen und Heterozygoten war mit $P = 0,032$ statistisch signifikant. Eine nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse konnte diese Signifikanz jedoch nicht bestätigen, da mit $P = 0,06$ und $P = 0,27$ weder für Männer noch für Frauen das Signifikanzniveau erreicht werden konnte. Beim Vergleich der Genotypen wurde außerdem festgestellt, dass die Träger des A-Allels jünger waren. Bezüglich der Lipidwerte konnten neben erwartungsgemäß hohen Triglyzerid- und Gesamt-Cholesterin-Werten keine Besonderheiten beobachtet werden (Tab. 25).

3.5.2.2 Patienten mit Übergewicht

In diesem Kollektiv waren Homozygote tendenziell jünger und hatten einen größeren BMI (2 kg/m²) als PP- und PA-Genotypen, wobei bezüglich beider Merkmale ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden konnte. Bei Betrachtung des Lipidprofils ergaben sich auffällige Unterschiede zwischen Heterozygoten und Wildtypen für das Gesamt-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Apo A₁ und Apo B. Wie im Adipositas-Kollektiv wurden auch hier bei allen Genotypen hohe Triglyzerid- und Gesamt-Cholesterin-Werte beobachtet. Dennoch konnte keine konkrete Zuweisung der günstigsten bzw. ungünstigsten Lipidkonstellation zu einem der Genotypen erfolgen (Tab. 26).

Die nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse ergab ähnliche Ergebnisse (Werte nicht gezeigt).

Tabelle 26 Eigenschaften der 187 übergewichtigen Patienten in Abhängigkeit der PPAR γ 2-Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=137)	PA(n=48)	P	AA(n=2)	P
Alter	Jahre	49 ± 14	42 ± 12	0,014	37 ± 2	0,104
BMI	(kg/m ²)	27 ± 1	27 ± 1	0,762	29 ± 1	0,046
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	290 ± 70	261 ± 68	0,010	334 ± 45	0,219
Triglyzeride	(mg/dl)	326 ± 378	445 ± 892	0,30	346 ± 127	0,349
LDL-Chol.	(mg/dl)	201 ± 70	164 ± 62	0,069	199 ± 0	1,0
HDL-Chol.	(mg/dl)	49 ± 18	41 ± 10	0,036	51 ± 2	0,426
VLDL-Chol.	(mg/dl)	35 ± 20	40 ± 20	0,223	51 ± 0	1,0
Apo A ₁	(mg/dl)	135 ± 40	123 ± 32	0,036	163 ± 12	0,133
Apo B	(mg/dl)	136 ± 33	126 ± 28	0,034	152 ± 9	0,182

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte (P < 0,05) sind rot gedruckt.

3.5.2.3 Normalgewichtige Patienten

Die 177 normalgewichtigen Patienten wiesen bezüglich Alter und BMI beim Vergleich der einzelnen Genotypen nur minimale Unterschiede auf. Auch bei differenzierter Betrachtung der Lipidwerte konnten keine Besonderheiten beobachtet werden, wobei den Wildtypen insgesamt das ungünstigste Lipidprofil zugeschrieben werden musste. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse kann der Tabelle 27 entnommen werden.

Tabelle 27 Eigenschaften der 177 normalgewichtigen Patienten unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=139)	PA(n=35)	P	AA(n=3)	P
Alter	Jahre	43 ± 14	43 ± 16	0,885	48 ± 11	0,410
BMI	(kg/m ²)	23 ± 2	23 ± 2	0,547	22 ± 2	0,804
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	281 ± 61	274 ± 71	0,247	245 ± 50	0,353
Triglyzeride	(mg/dl)	203 ± 233	193 ± 229	0,568	200 ± 65	0,284
LDL-Chol.	(mg/dl)	195 ± 57	181 ± 64	0,080	145 ± 50	0,136
HDL-Chol.	(mg/dl)	56 ± 17	60 ± 19	0,229	61 ± 3	0,395
VLDL-Chol.	(mg/dl)	29 ± 16	27 ± 17	0,520	40 ± 13	0,148
Apo A ₁	(mg/dl)	143 ± 26	151 ± 25	0,112	158 ± 5	0,164
Apo B	(mg/dl)	136 ± 37	133 ± 42	0,325	125 ± 36	0,782

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt.

3.5.2.4 Non-HLP-Kollektiv

Da sowohl die Adipösen als auch die Normalgewichtigen aus dem Gesamt-HLP Kollektiv stammten und deswegen mit einer ungünstigen Lipidkonstellation behaftet waren, schien es von Interesse zu sein, diese Untersuchung bei Patienten mit innerhalb des Normbereichs liegenden Lipidwerten zu wiederholen bzw. deren klinischen Werte als Vergleich heranzuziehen. Des Weiteren lag das Interesse auch darin begründet, dass bei diesem deutlich zahlenmäßig unterlegenen Kollektiv ein auffällig hoher Prozentsatz an AA-Genotypen zu verzeichnen war. Bei Analyse der übrigen klinischen Werte wie BMI und Alter konnten keine größeren Abweichungen von den zuvor betrachteten Kollektiven aufgezeigt werden.

Tabelle 28 Eigenschaften der 38 Patienten aus dem Non-HLP-Kollektiv in Abhängigkeit der PPAR γ 2-Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=27)	PA(n=7)	P	AA(n=4)	P
Alter	Jahre	46 \pm 17	48 \pm 11	0,749	47 \pm 10	0,976
BMI	(kg/m ²)	26 \pm 4	27 \pm 3	0,287	25 \pm 2	0,596
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	178 \pm 17	177 \pm 18	0,831	183 \pm 38	0,031
Triglyzeride	(mg/dl)	108 \pm 44	101 \pm 18	0,766	109 \pm 61	0,930
LDL-Chol.	(mg/dl)	110 \pm 18	117 \pm 12	0,296	81 \pm 33	0,045
HDL-Chol.	(mg/dl)	47 \pm 12	40 \pm 7	0,153	34 \pm 16	0,118
VLDL-Chol.	(mg/dl)	22 \pm 9	20 \pm 4	0,609	22 \pm 12	0,929
Apo A ₁	(mg/dl)	126 \pm 25	101 \pm 29	0,406	96 \pm 41	0,055
Apo B	(mg/dl)	93 \pm 25	124 \pm 27	0,865	68 \pm 21	0,118

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt

3.5.3 Zusammenhang von BMI und Alter beim PPAR γ 2-Genotypen

Wie bereits gezeigt wurde, waren im Kollektiv der übergewichtigen Patienten A-Allelträger jünger als Wildtypen (siehe 3.5.2). Daher erschien es sinnvoll, die Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Alter näher zu untersuchen. Die Gesamtstichprobe wurde aufgeteilt in jüngere und ältere Personen in Anlehnung an den Median des Alters (45 Jahre). Die Allelfrequenzen betragen in den beiden Gruppen 0,163 (< 45 Jahre) bzw. 0,134 (\geq 45 Jahre) und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf ($P = 0,20$). Anschließend wurden die Personen gemäß der BMI-Kriterien in Adipöse und Schlanke aufgeteilt.

3.5.3.1 Allelfrequenzen nach Einteilung in BMI-Kategorien bei Patienten unter 45 Jahren

Auch bei Analyse jüngerer Patienten konnten ähnliche Ergebnisse, wie in oberen Abschnitten beschrieben (siehe 3.5.1), beobachtet werden. So zeigte sich bei größer werdendem BMI eine Häufigkeitszunahme der A-Allelträger. Außerdem konnte hier ebenfalls bei den Non-HLP-Patienten eine auffällig hohe (zweithöchste) A-Allelfrequenz festgestellt werden. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang der hohe Anteil an Wildtypen unter den Normalgewichtigen im Vergleich zu den Adipösen und Übergewichtigen erwähnenswert (Tab. 29).

Tabelle 29 PPAR γ 2-Genotypen in 3 BMI Kategorien bei jüngeren Patienten

Beobachtet	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
BMI \geq 30	19	11	2	32	59,3	34,4	6,3	0,234
BMI 25 – 29,9	58	27	4	89	65,2	30,3	4,5	0,197
BMI 18,5 – 24,9	84	19	3	106	79,3	17,9	2,8	0,118
Non-HLP	13	2	3	18	72,2	11,1	16,7	0,222

Chi-Quadrat = 10,4, Freiheitsgrade 6, P = 0,13, BMI in [kg/m²].

Die Unterschiede der Genotypverteilung in den vier Kategorien waren jedoch nicht statistisch signifikant (P = 0,13). Aufgrund der ähnlichen Allelfrequenzen der Übergewichtigen und der morbid Adipösen wurden beide Gruppen zusammengefasst und einer Vergleichsgruppe, bestehend aus Schlanken bzw. Normalgewichtigen, gegenübergestellt (Tab. 30). Der direkte Vergleich der Allelfrequenzen dieser beiden Gruppen unterstrich mit P < 0,01 die Beobachtung, dass junge Übergewichtige häufiger als junge Normalgewichtige Träger des A-Allels sind.

Tabelle 30 PPAR γ 2-Genotypen in zwei Gewichtskategorien bei jüngeren Patienten
Oben: Beobachtete Verteilung. Unten: Erwartete Verteilung.

Beobachtet	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
BMI \geq 25	77	38	6	121	63,3	31,4	5,0	0,207
BMI < 25	87	19	3	109	79,8	17,4	2,8	0,115

Erwartet	PP	PA	AA	Σ	$(B-E)^2/E$	$(B-E)^2/E$	$(B-E)^2/E$	Σ
BMI \geq 25	77,6	37,2	6,2	121	0,0084	0,073	0,123	0,204
BMI < 25	86,4	19,8	2,8	109	0,030	0,435	1,829	2,29
Σ	164	57	9	232	0,04	0,51	1,95	2,49

Chi-Quadrat = 2,49, Freiheitsgrade 2, P-Wert = 0,30, BMI in [kg/m²].

3.5.3.2 Parameter der Patienten unter 45 Jahre

Anhand der klinischen Daten der Patienten wurde der Einfluss der Genotypen bei den jüngeren Patienten weiter untersucht. Insbesondere sollte geprüft werden, ob in dieser Personengruppe signifikante Unterschiede hinsichtlich der Lipidwerte und des BMI vorzufinden waren (Tab. 31). Anders als bei den Übergewichtigen ohne Berücksichtigung des Alters (siehe Tab. 26) verhielt sich die Genotypverteilung in dieser Untergruppe wie bei den Normalgewichtigen (siehe Tab. 27). Das bedeutet, dass die Homozygoten älter als die Heterozygoten und Wildtypen waren, wobei zwischen letzteren ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Bezüglich des BMI wiesen A-Allelträger durchschnittlich größere Werte (2 kg/m²) als Wildtypen auf. Dabei ergab der direkte Vergleich von Wildtypen und Heterozygoten einen signifikanten Unterschied. Bei den Lipidwerten konnten bei allen Genotypen erhöhte Triglyzerid- und Gesamt-Cholesterin-Werte beobachtet werden. Die Analyse der einzelnen Lipoproteinfraktionen zeigte lediglich für die Homozygoten im Normbereich liegende LDL-Werte, die, verglichen mit den Wildtypen, eine signifikante Differenz erkennen ließen. Die Unterschiede in den klinischen Parametern wurden stärker durch die Werte der weiblichen Patienten beeinflusst. Hierbei waren die oben genannten

Werte mit Ausnahme des BMI gleichermaßen signifikant, während bei den Männern lediglich bezüglich der LDL- und BMI-Werte das Signifikanzniveau erreicht wurde ($P = 0,010$ und $P = 0,009$).

Tabelle 31 Eigenschaften junger Patienten unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=164)	PA(n=57)	P	AA(n=9)	P
Alter	Jahre	34 ± 8	33 ± 8	0,628	39 ± 5	0,045
BMI	(kg/m ²)	25 ± 4	27 ± 5	0,028	27 ± 5	0,228
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	280 ± 75	281 ± 85	0,655	239 ± 79	0,175
Triglyzeride	(mg/dl)	263 ± 348	456 ± 884	0,067	346 ± 297	0,107
LDL-Chol.	(mg/dl)	192 ± 64	176 ± 55	0,106	126 ± 48	0,013
HDL-Chol.	(mg/dl)	51 ± 17	45 ± 17	0,011	42 ± 16	0,265
VLDL-Chol.	(mg/dl)	29 ± 17	33 ± 20	0,360	36 ± 16	0,255
Apo A ₁	(mg/dl)	136 ± 28	131 ± 30	0,592	126 ± 40	0,344
Apo B	(mg/dl)	130 ± 28	131 ± 47	0,199	115 ± 40	0,90

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind rot gedruckt.

3.5.3.3 Allelfrequenzen nach Einteilung in BMI-Kategorien bei Patienten über 45 Jahre

Im Unterschied zu den jüngeren Patienten konnte keine stetige Zunahme der A-Allelfrequenz bei größer werdendem BMI verzeichnet werden. So waren zwar die morbid Adipösen häufiger A-Allelträger als die Normalgewichtigen, jedoch zeigte sich mit einer A-Allelfrequenz von 0,102 eine Abweichung bei den Übergewichtigen. Die älteren Non-HLP-Patienten hatten innerhalb ihrer Altersklasse eine relativ hohe, im Gegensatz zur jüngeren Vergleichsgruppe allerdings eine niedrigere A-Allelfrequenz (Tab. 32).

Tabelle 32 PPAR γ 2-Genotypen in 3 BMI Kategorien bei älteren Patienten

Beobachtet	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
BMI \geq 30	28	16	0	44	63,6	36,4	0	0,182
BMI 25 – 29,9	86	22	0	108	79,6	20,4	0	0,102
BMI 18,5 – 24,9	62	17	2	81	76,5	21,0	2,5	0,130
Non-HLP	14	4	1	19	73,7	21,0	5,3	0,158

Chi-Quadrat = 4,57, Freiheitsgrade 6, P = 0,65, BMI in [kg/m²].

Die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen war statistisch nicht signifikant (P = 0,65). Insgesamt ergab sich nach Zusammenfassung der Gewichtskategorien eine mit 0,125 für die Adipösen bzw. Übergewichtigen kaum von den Normalgewichtigen (0,128) zu unterscheidende A-Allelfrequenz, so dass auch in dieser Untersuchung bei den älteren Patienten kein signifikanter Unterschied (P = 0,20) aufgezeigt werden konnte (Tab. 33).

Tabelle 33 PPAR γ 2-Genotypen in zwei Gewichtskategorien bei älteren Patienten

Oben: Beobachtete Verteilung. Unten: Erwartete Verteilung

Beobachtet	PP	PA	AA	Σ	PP %	PA %	AA %	Allel A
BMI \geq 25	114	38	0	152	75,0	25,0	0	0,125
BMI < 25	63	17	2	82	76,9	20,7	2,4	0,128

Erwartet	PP	PA	AA	Σ	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	Σ
BMI \geq 25	114,7	36,7	0,6	152	0,0495	0,663	2,30	3,013
BMI < 25	62,3	18,3	1,4	82	0,008	0,092	0,257	0,357
Σ	177	55	2	234	0,058	0,755	2,557	3,37

Chi-Quadrat = 3,37, Freiheitsgrade 2, P-Wert = 0,20, BMI in [kg/m²].

3.5.3.4 Parameter der Patienten ab 45 Jahre

Anders als bei den jüngeren Patienten, konnte eine eindeutige Tendenz der Homozygoten dahingehend beobachtet werden, dass diese neben innerhalb des Normbereichs liegenden BMI-Werten, eine ebenfalls den Normkriterien entsprechende Lipidkonstellation aufwiesen (ausgenommen Apo A₁ und Apo B). Dagegen verzeichneten die Wildtypen und Homozygoten deutlich erhöhte Werte.

Tabelle 34 Eigenschaften alter Patienten unter Berücksichtigung der Genotypen.

Eigenschaften		PP(n=177)	PA(n=55)	P	AA(n=2)	P
Alter	Jahre	58 ± 8	57 ± 7	0,430	61 ± 0	0,402
BMI	(kg/m ²)	27 ± 4	28 ± 5	0,086	24 ± 2	0,144
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	278 ± 79	258 ± 68	0,082	175 ± 120	0,190
Triglyzeride	(mg/dl)	304 ± 356	302 ± 293	0,511	103 ± 33	0,185
LDL-Chol.	(mg/dl)	191 ± 75	163 ± 66	0,036	102 ± 99	0,172
HDL-Chol.	(mg/dl)	51 ± 18	49 ± 15	0,451	53 ± 15	0,726
VLDL-Chol.	(mg/dl)	33 ± 18	37 ± 20	0,321	21 ± 6	0,290
Apo A ₁	(mg/dl)	132 ± 42	123 ± 34	0,142	85 ± 66	0,249
Apo B	(mg/dl)	140 ± 31	139 ± 28	0,916	134 ± 28	0,864

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von PA- bzw. AA-Genotyp und PP-Genotyp. Statistisch signifikante Werte (P < 0,05) sind rot gedruckt.

3.5.4 Zusammenfassung der Untersuchung zum BMI

Die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen zeigte in den Kategorien Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas keine signifikanten Unterschiede. Im Gesamtkollektiv konnte eine Frequenzzunahme des A-Allels bei größer werdendem BMI festgestellt werden, dabei verzeichneten die Adipösen die höchste, die Non-HLP-Patienten die

zweithöchste A-Allelfrequenz. Zudem fand sich bei letzteren der größte Anteil an Homozygoten. Die differenziertere Betrachtung der Gewichtskategorien ergab, dass übergewichtige Homozygote tendenziell jünger waren und einen größeren BMI verzeichneten als PP- und PA-Genotypen. Bei der Lipidwert-Analyse wiesen adipöse und übergewichtige Patienten, unabhängig vom Genotypen, erhöhte Gesamt-Cholesterin- und Triglyzeridwerte auf. Bei den Normalgewichtigen dagegen, zeigten die Wildtypen das ungünstigste Lipidprofil. Nach Einteilung in zwei Gruppen in Anlehnung an den Median des Alters konnten bei jüngeren Patienten, die bezüglich der Allelfrequenzen aufgeführten Ergebnisse, bestätigt werden. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass junge Übergewichtige häufiger Träger des A-Allels waren als junge Normalgewichtige. Bei den älteren Patienten hingegen, ließ sich keine stetige Zunahme der A-Allelfrequenz bei größer werdendem BMI nachweisen. Des Weiteren fanden sich in dieser Gruppe bei den Homozygoten im Normbereich befindliche Lipidwerte, wohingegen bei den jüngeren Individuen alle Genotypen mit einem ungünstigen Profil behaftet waren.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Verteilung der PPAR γ -2-Genotypen im Gesamtkollektiv ist in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz und unabhängig vom Geschlecht.
2. Der Vergleich der Häufigkeiten der PPAR γ 2-Genotypen in den sieben Kollektiven, darunter Patienten mit Hyperlipoproteinämie, Adipositas, Diabetes mellitus Typ2 und Kontrollgruppe (Non-HLP) erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Mit Ausnahme der Kontrollgruppe entsprachen diese dem Hardy-Weinberg-Gesetz.
3. Es konnte kein Zusammenhang zwischen A-Allelträgern und einer Hyperlipoproteinämie nachgewiesen werden.
 - Im HLP-Gesamtkollektiv zeigten die Wildtypen die ausgeprägteste Hyperlipoproteinämie und boten damit das ungünstigste Lipidprofil. Bei den Homozygoten dagegen konnte bei Analyse des Gesamtkollektivs wie auch der klinischen Daten der HLP- und HC-Kollektive die günstigste Lipidkonstellation verzeichnet werden.

- Auch die differenziertere Analyse der Patientenkollektive konnte diese Hypothese untermauern. So zeigten die Patienten mit nicht erhöhten Lipidwerten (Non-HLP-Patienten) eine besonders hohe A-Allelfrequenz mit dem größten Anteil an Homozygoten. Bei sonst im Normbereich befindlichen Lipidwerten, verzeichneten die HTG-Patienten die höchste A-Allelfrequenz.
- Unter den Kollektiven fielen die Patienten mit gemischter HLP durch extrem hohe Triglyzerid-Werte auf. Weiterhin kamen innerhalb dieser Gruppe bei den A-Allelträgern sowohl die jüngsten als auch die übergewichtigsten Patienten vor.
- Im HLP-Kollektiv hatten die A-Allelträger einen signifikant größeren BMI.
- Die Lipidwerte zeigten eine Altersabhängigkeit. So fand sich lediglich bei älteren Homozygoten ein positives Lipidprofil, wohingegen die jüngeren AA-Genotypen deutlich über der Norm liegende Werte zu verzeichnen hatten.

4. Es wurde kein Zusammenhang zwischen PPAR γ 2-Genotypen und Diabetes mellitus Typ2 nachgewiesen.

5. Die A-Allelfrequenz korrelierte mit der Größe des BMI. Die detaillierte Untersuchung des Zusammenhangs von PPAR γ 2-Genotyp und Adipositas zeigte:

- Im Gesamtkollektiv stieg die Zahl der A-Allelträger mit zunehmendem BMI
- Bei jüngeren Patienten (< 45 Jahre) konnte dieses Ergebnis, im Gegensatz zu den über 45 Jährigen, bestätigt werden.
- In der Gruppe der Adipösen fand sich die höchste, bei den Non-HLP-Patienten die zweithöchste A-Allelfrequenz.
- In der Gruppe der Übergewichtigen waren die AA-Genotypen tendenziell jünger und hatten einen größeren BMI als PP- und PA-Genotypen. Desweiteren zeigten sie im Vergleich zu den Wildtypen ein ungünstigeres Lipidprofil bezüglich Gesamt-Cholesterin, Triglyzeride und Apo B.
- Adipöse und übergewichtige Patienten hatten unabhängig vom Genotyp erhöhte Gesamt-Cholesterin- und Triglyzerid-Werte. Unter den Normalgewichtigen zeigten die Wildtypen das ungünstigste Lipidprofil.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Die vorliegende Studie mit einer Fallzahl von $N = 477$ lieferte die Häufigkeiten der Genotypen und die Allelfrequenzen des Pro12Ala-Polymorphismus im PPAR γ 2-Gen für die deutsche Bevölkerung. Das besondere an dem untersuchten Patientenkollektiv war der überwiegende Anteil an hyperlipidämischen Patienten sowie die Häufung von Patienten mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ2.

4.2 Allelfrequenzen

Die Verteilung der PPAR γ 2-Genotypen in dem untersuchten Studienkollektiv war in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz und unabhängig vom Geschlecht. Im Gesamtkollektiv betrug die Allelfrequenz 0,15 für das Allel A und 0,85 für das Allel P. Bezogen auf die einzelnen Kollektive variierten die Allelfrequenzen von 0,14 im HLP-Gesamtkollektiv, 0,18 im Diabetes-Kollektiv bis hin zu 0,21 im Adipositas-Kollektiv. Die ermittelten Allelfrequenzen wurden den Daten bereits veröffentlichter Studien gegenübergestellt.

Die Tabelle 35 zeigt (in der Reihenfolge von oben nach unten) die verfügbaren Daten zu dyslipidämische und adipöse Patienten, Diabetiker und Personen aus der normalen Population (unten). Die Reihenfolge entspricht der Höhe der Allelfrequenzen. Bei der Betrachtung wird deutlich, dass zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche nur wenig Daten aus ähnlich großen Untersuchungen und insbesondere keine Daten für die deutsche Bevölkerung vorlagen. Die im Gesamtkollektiv ermittelte Allelfrequenz von 0,15 für das Allel A im PPAR γ 2-Gen war vergleichbar mit den Daten von anderen Untersuchungen der Kaukasischen Bevölkerung.

Tabelle 35 Allelfrequenzen bei dyslipidämischen Personen, Adipösen, Diabetikern und in der Bevölkerung.

Studie	N	PP %	PA %	AA %	f [A]	Populat.	Kollektiv
Evans(2001)	127	78,0	22,0	0	0,11	Deutschland	Dyslipidämie
Diese Studie	438	73,1	25,1	1,8	0,14	Deutschland	HLP
Pihlajamäki(2000)	217	72,3	26,3	1,4	0,15	Finnland	Dyslipidämie
Auwerx(2000)	228	72,0	25,4	2,6	0,15	Finnland	FCHL
Swarbrick(2001)	28	57,1	42,9	0	0,21	Australien	HLP
Beamer(1997)*	112	n.a.	n.a.	n.a.	0,08	U.S.A.	BMI ≥ 25
Beamer(1997)**	57	n.a.	n.a.	n.a.	0,11	U.S.A.	BMI ≥ 25
Ek(1999)	752	n.a.	n.a.	n.a.	0,11	Dänemark	BMI ≥ 30
Evans(2000)	200	72,0	25,0	2,0	0,15	Deutschland	BMI ≥ 30
Rosmond(2003)	284	65,5	32,4	2,1	0,18	Schweden	BMI ≥ 25
Diese Studie	80	61,3	35,0	3,8	0,21	Deutschland	BMI ≥ 30
Hara(2000)	415	n.a.	n.a.	n.a.	0,02	Japan	D.m. Typ 2
Vigouroux(1998)	57	n.a.	n.a.	n.a.	0,06	Frankreich	D.m. Typ 2
Yen(1997)	26	n.a.	n.a.	n.a.	0,12	U.S.A.	D.m. Typ 2
Schuldiner(1997)	52	77,4	21,2	1,4	0,12	U.S.A.	D.m. Typ 2
Hasstedt(2000)***	580	77,9	20,3	1,7	0,12	U.S.A.	D.m. Typ 2
Ringel(1999)	503	74,0	23,5	2,5	0,14	Deutschland	D.m. Typ 2
Evans(2001)	219	71,7	25,1	3,2	0,16	Deutschland	D.m. Typ 2
Diese Studie	56	66,1	32,1	1,8	0,18	Deutschland	D.m. Typ 2
Koch(1999)***	108	n.a.	n.a.	n.a.	0,18	Deutschland	D.m. Typ 2
Zietz(2002)	560	77,9	21,1	1,1	0,19	Deutschland	D.m. Typ 2
Mancini(1999)	312	n.a.	n.a.	n.a.	0,10	Italien	Populat.

Cudas(2001)	371	74,7	24,8	0,5	0,13	Australien	Schlanke
Ears(2000)	675	n.a.	n.a.	n.a.	0,13	Europa	Junge Gesunde
Deeb(1998)	973	n.a.	n.a.	n.a.	0,15	Finnland	Populat.
Evans(2000)	192	72,0	25,0	3,0	0,16	Deutschland	Populat.
Evans(2000)	106	65,1	30,2	4,7	0,20	Deutschland	Populat.
Fritsche (2001)	77	66,2	27,3	6,5	0,20	Deutschland	Populat.
Diese Studie	39	71,7	18,4	10,5	0,20	Deutschland	Populat.
Diese Studie	477	73,0	24,5	2,5	0,15	Deutschland	Gesamtkollektiv

N = Anzahl, f [A] = Allelfrequenz des Allels A, Populat. = Population, n.a. = nicht angegeben, HLP = Hyperlipoproteinämie, FCHL = familial combined hyperlipidemia, D.m. = Diabetes mellitus, * nur Männer, ** nur Frauen, *** Verwandte ersten Grades von Typ2-Diabetikern.

Die veröffentlichten Studien nennen Allelfrequenzen zwischen 0,10 und 0,21, wohingegen eine amerikanische, französische und japanische Untersuchung, bei ersteren beiden allerdings mit kleineren Fallzahlen (N = 112, N = 57), mit 0,08, 0,06 und 0,02 deutlich niedrigere Allelfrequenzen für das Allel A zeigten (*Beamer et al.*, 1997; *Vigouroux et al.*, 1998; *Hara et al.*, 2000). Der Pro12Ala-Polymorphismus scheint in der japanischen Population mit einer Allelfrequenz von 0,02 (bei ähnlich großer Fallzahl N = 415) insgesamt seltener vorzukommen als in der europäischen und australischen. Diese Ergebnisse sind auch in Einklang mit Untersuchungen von *Deeb et al.* (1998), *Meirhaeghe et al.* (2000), *Mori et al.* (1998), *Poirier et al.* (2000) und *Yen et al.* (1997), wo Allelfrequenzen zwischen 0,1 und 0,2 in der kaukasischen und eine ungefähr 10fach niedrigere Prävalenz des A-Allels in der asiatischen Bevölkerung beschrieben werden.

Neben der Herkunft des Studienkollektivs war die Art der Rekrutierung innerhalb der Bevölkerung von besonderem Interesse für die Interpretation der Allelfrequenzen. Bei den genannten Studienkollektiven handelte es sich einerseits um selektierte Personen mit Dyslipidämie, Adipositas oder Diabetes mellitus Typ2, andererseits um schlanke und gesunde oder zufällig, das heißt ohne Berücksichtigung der Lipidwerte oder des BMI, ausgewählte Personen aus der normalen Bevölkerung.

Die in den Studien ermittelten Allelfrequenzen von dyslipidämischen und aus der Bevölkerung stammenden Personen lagen in einem ähnlichen Bereich. Als Tendenz konnte zwar festgestellt werden, dass unter den europäischen und australischen Untersuchungen die Studien mit dyslipidämischen Patienten eher höhere Allelfrequenzen (Australien 0,21, Finnland 0,15) aufwiesen als die Populationsstudien (Australien 0,13, Italien 0,10). In der vorliegenden Untersuchung allerdings war die Allelfrequenz bei nicht-dyslipidämischen Personen mit 0,20 höher als bei Patienten mit Hyperlipidämie ($f[A] = 0,14$), ohne dass das statistische Signifikanzniveau erreicht wurde. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses sei auf der einen Seite auf die kleine Fallzahl des Vergleichskollektivs mit großem Anteil an Homozygoten verwiesen, wodurch diese Diskrepanz durchaus erklärt werden könnte, auf der anderen Seite zeigte eine Studie von *Evans et al.* (2000) bei zwei annähernd gleich großen Kollektiven von dyslipidämischen und aus der normalen Bevölkerung stammenden Personen ($N = 127$ und $N = 106$) mit Allelfrequenzen von 0,20 bzw. 0,11 ein vergleichbares Ergebnis. Diese Ergebnisse führten zu der Auffassung, dass dieser Polymorphismus im PPAR γ 2-Gen kein alleiniger Risikofaktor für die Entstehung der Hyperlipoproteinämie sein kann.

Das Vorkommen weiterer Polymorphismen im Gen des PPAR γ wurde in einer deutschen Studie (*Ristow et al.* 1998) untersucht. In einem Studienkollektiv von 121 Übergewichtigen und 238 Normalgewichtigen wurde der Pro115Gln-Polymorphismus in 3 % der Fälle bei übergewichtigen Patienten vorgefunden, wohingegen dieser unter den Normalgewichtigen nicht vorkam. Demzufolge wird ein Einfluss des Pro115Gln-Polymorphismus auf den BMI bzw. Adipositas diskutiert und bedarf weiterer Exploration. Der Nachweis dieses Polymorphismus bzw. einer weiteren genetischen Varianz im PPAR γ -Gen soll aufzeigen, dass Einflüsse auf den Lipidmetabolismus auch bei selteneren Mutationen, wie bei eben beschriebener, vermutet werden können, die allerdings aufgrund ihrer Seltenheit von eher geringer Bedeutung zu sein scheinen.

4.3 Assoziationen mit Stoffwechselkrankheiten

4.3.1 PPAR γ 2 und Lipidwerte

Bei der Betrachtung der veröffentlichten Studien wurde deutlich, dass zum einen noch keine Arbeitsgruppe ein derart großes HLP-Kollektiv im Hinblick auf eine Assoziation mit dem Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens untersucht hatte. Zum anderen zeigten die Untersuchungen an dyslipidämischen Patienten, dass es eine Vielzahl kontroverser Meinungen gibt, die umso mehr eine gezieltere Exploration dieses Themas, wie in vorliegender Arbeit erfolgt, erfordern.

Bei der Untersuchung der Lipidwerte im HLP-Gesamtkollektiv war aufgefallen, dass sowohl die PP- wie auch die PA-Genotypen eine ungünstigere Konstellation als die AA-Individuen (höhere Gesamt-Chol., LDL- bzw. Triglyzerid-Werte und niedrigeres HDL) aufwiesen. Eine getrennte Untersuchung von Männern und Frauen konnte eine Signifikanz bezüglich des HDL-Profiles bei dem weiblichen Geschlecht bestätigen.

In der Literatur werden in Bezug auf die Lipidwerte unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Die oben angeführten Befunde können mit den Ergebnissen von *Deeb et al.* (1998), *Beamer et al.* (1997) und *Philajamäki et al.* (2000) in Beziehung gesetzt werden. In der Arbeitsgruppe von *Deeb et al.* (1998) konnte an einem zahlenmäßig großen Kollektiv (973) dyslipidämischer Patienten bei A-Allelträgern signifikant niedrigere Triglyzerid-Werte bei gleichzeitig höheren HDL-Werten beobachtet werden. Auch bei 112 weiblichen Patienten in der Studie von *Beamer et al.* (1997) hatten die A-Allelträger niedrigere Triglyzeridwerte zu verzeichnen. Gleiches gilt für das Patientenkollektiv aus der Arbeitsgruppe *Philajamäki et al.* (2000) bei dem zusätzlich auch erhöhte HDL-Werte bei den PA- und AA-Genotypen im Vergleich zu den Normaltypen konstatiert wurden. Als Pendant dazu können die Studien von *Beamer et al.* (1997) und *Swarbrick et al.* (2001) herangezogen werden. In diesen Untersuchungen zeigte sich ein gegensätzliches Ergebnis mit höheren Triglyzerid- und niedrigeren HDL-Werten bei A-Allelträgern, wobei dies in der Untersuchung von *Beamer et al.* (1997) nur auf die 57 männlichen Individuen zutraf. Bei der weiteren Charakterisierung des Gesamt- und HLP-Kollektivs im Hinblick auf das Lipidprofil konnte auch bei separater Analyse des Geschlechts festgestellt werden, dass die Wildtypen durchweg höhere LDL-Werte und damit ein ungünstigeres Lipidprofil als Hetero- oder Homozygote hatten. Letztere zeigten außerdem die günstigste

Konstellation. Im Sinne eines Gen-Dosis-Effektes wäre das Gegenteil zu erwarten. Diese Beobachtung kann als Argument gegen das Bestehen eines Zusammenhangs von Pro12Ala-Polymorphismus und Hyperlipoproteinämie ausgelegt werden. Ein weiteres Argument dagegen lieferten die Ergebnisse des Apo B, dessen Erhöhung mit einem gesteigerten atherogenen Risiko und folglich mit Erkrankungen wie z.B. Herzinfarkt oder peripherer AVK assoziiert ist. So zeigte sich ein höheres atherogenes Risikoprofil bei den Normaltypen im HLP-Kollektiv im Vergleich zu den A-Allelträgern, welches statistisch signifikant war. Zwar hatten die weiblichen Patienten aus dem Gesamtkollektiv eine gegensätzliche Konstellation als die eben beschriebene bezüglich der PP- bzw. PA-Genotypen, allerdings waren die Apo B-Werte bei den Homozygoten in keinem Kollektiv höher als die der Heterozygoten bzw. Normaltypen. Bei *Iwata et al.* (2001) konnten Überschneidungen mit oben aufgeführten Befunden dahingehend beobachtet werden, als dass statistisch signifikante Unterschiede für Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin und non-HDL-Cholesterin (Differenz zwischen Gesamt-Chol. und HDL-Chol.) beschrieben wurden, die tendenziell mit den in der vorliegenden Untersuchung gefundenen, insbesondere aber dem LDL-Cholesterin, übereinstimmen. Andererseits zeigten *Meirhaeghe et al.* (2000) und *Zietz et al.* (2002) in ihren Studien einen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens und erhöhten Lipidwerten. So hatten in beiden Untersuchungen Patienten mit dem Pro12Ala-Polymorphismus höhere Gesamt- und LDL-Cholesterin-Werte als Normaltypen. Letztere Studie bezog sich mit einer A-Allelfrequenz von 0,19 allerdings nur auf männliche Individuen. *Meirhaeghe et al.* (2000) beschrieben weiterhin höhere Apo B-Werte für A-Allelträger als für PP-Genotypen.

Eine differenziertere Betrachtung des HLP-Kollektivs im Sinne einer Unterteilung in ein Hypercholesterinämie-, Hypertriglyzeridämie- sowie gemischte HLP-Kollektiv und Analyse unter Berücksichtigung des PPAR γ 2-Genotypen bestätigte lediglich im Hypercholesterinämie-Kollektiv die in der Literatur beschriebenen und oben erwähnten signifikanten Unterschiede zwischen PP- und PA-Genotypen bezüglich Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Apo B. In den übrigen Kollektiven waren keine Auffälligkeiten vorhanden. So konnte demnach in der vorliegenden Untersuchung auch nicht die von *Swarbrick et al.* (2001) gezeigte Assoziation zwischen A-Allelträgern und kombinierter Hyperlipidämie bestätigt werden.

Die detaillierte Untersuchung unter Berücksichtigung der Faktoren wie Alter, BMI und PPAR γ 2-Genotyp zeigte, dass es mit größer werdendem BMI auch parallel zu einer

Zunahme der A-Allelfrequenz kam. So hatten bei der Unterteilung in die Kategorien Normalgewicht, Übergewicht und morbid Adipositas, die morbid adipösen mit 0,23 die höchste Allelfrequenz, gefolgt von den Übergewichtigen mit 0,20 und den Normalgewichtigen mit 0,12. Anders als die AA-Genotypen aus dem HLP-Gesamtkollektiv hatten hier die (übergewichtigen) Homozygoten ein ungünstigeres Lipidprofil bezüglich Gesamt-Cholesterin, Triglyzeride und Apo B als die (übergewichtigen) Normaltypen und waren jünger. An dieser Stelle sei auf die Studie von *Meirhaeghe et al.* (2000) verwiesen, bei der eine vergleichbare Lipidkonstellation bei einem durchschnittlichen BMI von 25-26 kg/m² festgestellt werden konnte, wohingegen von *Deeb et al.* (1998) bei einem Patientenkollektiv mit Übergewicht (BMI 25-27 kg/m²) statistisch signifikant niedrigere Triglyzerid-Werte und höhere HDL-Werte bei A-Allelträgern und somit ein günstigeres Lipidprofil gezeigt wurden. *Swarbrick et al.* (2001) untermauern dagegen die Ergebnisse von *Meirhaeghe et al.* (2000), indem sie in einem Patientenkollektiv von 663 Personen, darunter 292 Übergewichtige und 371 Schlanke, eine Assoziation zwischen übergewichtigen A-Allelträgern und kombinierter Hyperlipoproteinämie aufzeigten.

Nach Aufteilung des Gesamtkollektivs in zwei Gruppen anhand des Median des Alters, der bei 45 Jahren lag, wurde eine gezieltere Untersuchung der Patienten ermöglicht. Es konnte keine Abhängigkeit bzw. kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Lipidwerte beobachtet werden.

Bei Diabetikern wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Lipidwerte in Abhängigkeit von den PPAR γ 2-Genotypen festgestellt. Aus der Literatur können hier zwei gegensätzliche Darstellungen herangezogen werden. Zum einen die Studie von *Iwata et al.* (2001) in der 106 Patienten mit Diabetes mellitus Typ2 untersucht wurden, wobei die A-Allelträger statistisch signifikant niedrigere Werte für Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und non-HDL-Cholesterin (Differenz zwischen Gesamt-Chol. und HDL-Chol.) zu verzeichnen hatten. Zum anderen die Studie von *Zietz et al.* (2002) mit 560 männlichen Typ2-Diabetikern, bei der das seltenere A-Allel mit höheren Lipidwerten (höheres Gesamt- und LDL-Cholesterin) assoziiert war.

Schlussfolgernd konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens und einer HLP nachgewiesen werden. Der Einfluss der PPAR γ 2-Genotypen auf den Lipidstoffwechsel scheint jedoch von großer Bedeutung zu sein. Aus den vorliegenden Daten kann allerdings nicht entschieden werden, ob der Pro12Ala-Polymorphismus mit höheren Lipidwerten einhergeht.

Vielmehr zeigt die kontroverse Darstellung, also das Nebeneinander von niedrigen und hohen Lipidwerten, günstigem und ungünstigem Lipidprofil, dass allenfalls ein Einfluss auf die Lipidwerte ausgeübt wird und treffenderweise eher der Begriff einer Dyslipidämie in Zusammenhang mit dem untersuchten Polymorphismus gebraucht werden sollte.

4.3.2 PPAR γ 2 und Diabetes mellitus Typ2

In der Literatur werden zu dieser Thematik unterschiedliche Befunde geschildert. So wurden von *Fritsche et al.* (2001) festgestellt, dass das A-Allel mit einem verminderten Risiko an Diabetes mellitus Typ2 zu erkranken, einhergeht. Diese Schutzwirkung des Alanin-Allels bezüglich Diabetes mellitus konnte durch eine verbesserte Insulinsensitivität erklärt werden, die nicht mit einer reduzierten Insulinsekretion einhergeht. Bei einem Kollektiv von 77 Patienten und einem Anteil von 6,5 % an Homozygoten betrug die A-Allelfrequenz 0,20. Zudem erreichte diese Assoziation mit $P = 0,003$ das statistische Signifikanzniveau. Diese Befunde waren mit denen von *Mori et al.* (2001) und *Altshuler et al.* (2000) konsistent. In der Arbeitsgruppe von *Mori et al.* (2001) wurden ein besonders großes Patientenkollektiv, bestehend aus 2201 Typ2-Diabetikern und 1212 Nicht-Diabetikern, untersucht. Dabei hatten die A-Allelträger in der Diabetiker-Gruppe eine niedrigere A-Allelfrequenz als in der Kontrollgruppe und ebenfalls ein vermindertes Risiko zu erkranken. Weiterhin legten die Daten die Vermutung nahe, dass unter Diabetikern die Alanin-Variante mit einer verminderten Insulinsekretion, erhöhtem Gesamt-Cholesterin und einer Tendenz zu erhöhtem HbA_{1c} assoziiert sein könnte. Demnach tendieren Diabetiker mit dieser genetischen Variante dazu, schwerer zu erkranken. Diese Daten stimmten, was das Lipidprofil angeht, mit denen von *Deeb et al.* (1998) und *Meirhaeghe et al.* (2000) überein. Dort konnte gezeigt werden, dass das A-Allel sowohl mit erhöhten HDL-Cholesterin und erniedrigten Triglyzeriden als auch mit erhöhtem Gesamt-Cholesterin und LDL-Cholesterin einherging. *Altshuler et al.* (2000) beobachteten bei mehr als 3000 untersuchten Patienten, dass P-Allelträger ein 1,25fach höheres Risiko hatten, an Diabetes mellitus Typ2 zu erkranken, als A-Allelträger.

Für den in der Bevölkerung weit verbreiteten Pro12Ala-Polymorphismus mit einer Prävalenz von ca. 25 % bedeutet dies, dass sich bei einer relativen Häufigkeit von ca.

85% für das Risikoallel (P-Allel) (*Altshuler et al.* 2000), ein zunächst moderat erscheinender Effekt in ein respektables Risiko verwandelt, wenn der Einfluß auf die Gesamtbevölkerung bezogen wird. Konkret hieße das, dass bis zu 25 % aller Typ 2-Diabetiker affiziert würden. Auch die Studie von *Koch et al.* (1999) reiht sich als weiteres Glied in die Kette der bereits aufgeführten Befunde, da in dieser Arbeitsgruppe ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Pro12Ala-Polymorphismus und der Anfälligkeit für Diabetes Typ2 vermutet wurde.

Evans et al. (2001) befassten sich mit der Fragestellung, ob es eine Assoziation zwischen Pro12Ala-Polymorphismus und einem weiteren, durch eine c → t Substitution am Nukleotid 1431 entstehenden, Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens gibt. Bei einem 648 Personen umfassenden Kollektiv, wovon 219 Typ2-Diabetiker und 429 Patienten Nicht-Diabetiker waren, konnte bei einer A-Allelfrequenz von 0,14 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen der Typ2-Diabetiker bzw. Kontrollgruppe festgestellt werden. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass es sich entweder um einen Zusammenhang zwischen homozygoten A-Allelträgern und einer Prädisposition für Typ2 Diabetes handelte oder aber um eine bisher unbekannte Mutation, welche an den A12/c1431 Haplotyp gekoppelt ist, die mit dieser Prädisposition assoziiert sein könnte. Demnach könnte der PPAR γ 2-Polymorphismus auch als potentieller Risikofaktor angesehen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde im Diabetes Kollektiv eine mit obigen Studien vergleichbare A-Allelfrequenz von 0,18 vorgefunden. Im Gesamtkollektiv gab es, wie in *Evans et al.* (2001) ebenfalls beschrieben, keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen A-Allelfrequenz bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern (0,18 bzw. 0,14). Das Alter differierte nicht zwischen A-Allelträgern und Normaltypen. Auch die Lipidwerte der Diabetiker zeigten keine Abhängigkeit von den PPAR γ 2-Genotypen. Lediglich im Hinblick auf den BMI wiesen A-Allel-tragende Diabetiker einen größeren BMI als Normaltypen auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dem untersuchten Kollektiv kein Einfluss der PPAR γ 2-Genotypen auf die Entstehung oder den Verlauf des Diabetes mellitus Typ2 zu erkennen ist. Bleibt allerdings hinzuzufügen, dass es sich bei den vorliegenden Daten um ein zahlenmäßig kleines Kollektiv handelte mit nur einem homozygoten Individuum. Dies könnte einen möglichen rezessiven Einfluss des Pro12Ala-Polymorphismus kaschieren und die Vermutung nahe legen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse auf die Anzahl der Homozygoten in den jeweiligen

Studien zurückgeführt werden können. Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von *Vigouroux et al.* (1998) und *Mancini et al.* (1999) bestärkt. Weder in der französischen noch in der italienischen Population konnte eine Assoziation aufgezeigt werden und in beiden Kollektiven konnten ebenfalls, bei zahlenmäßig vergleichbar großen Studien, keine A12A homozygoten Patienten gefunden werden. Auch *Ringel et al.* (1999), die sich mit dieser Fragestellung befassten, konnten keinen Zusammenhang aufzeigen; ferner auch keine Assoziation zu Diabetes-Komplikationen.

Zusammenfassend zeigen die aus der vorliegenden Untersuchung sowie aus anderen Studien gewonnenen Daten, dass mehrere Faktoren im Zusammenspiel und auch ergänzend ihren Beitrag dazu leisten, dass dem Pro12Ala-Polymorphismus eine respektable Bedeutung im Hinblick auf diese Stoffwechselerkrankung beigemessen werden kann. Nicht zuletzt deswegen, weil die Inzidenz dieses Polymorphismus bei den deutschen Kontrollgruppen (*Evans et al.* 2001, *Koch et al.* 1999, *Ringel et al.* 1999) mit 0,13, 0,15 und 0,15 größer als bei den japanischen oder chinesischen (*Yen et al.* 1997) mit 0,09 bzw. 0,01 war, was eine größere Bedeutung dieser genetischen Variante in der deutschen Bevölkerung vermuten lässt.

4.4 Assoziationen mit dem BMI

Für die verfügbaren Studien wurden die Intervalle der BMI-Werte sowie die Allelfrequenzen in Tabelle 39 dargestellt. Das seltenere Allel A des Pro12Ala-Polymorphismus wurde bei 169 morbid adipösen (mittlerer BMI 36,5 kg/m²) und 516 mäßig übergewichtigen amerikanischen Kaukasiern mit einer A-Allelfrequenz von 0,11 mit einem höheren BMI in Zusammenhang gebracht (*Beamer et al.* 1998). Ähnliches Ergebnis ergaben auch die Untersuchungen von *Rosmond et al.* (2003), wo bei 284 genotypisierten schwedischen Männern mittleren Alters homozygote A-Allelträger einen statistisch signifikant ($P = 0,022$) höheren BMI zu verzeichnen hatten als Normaltypen. Außerdem hatten sie tendenziell niedrigere Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterinwerte im Vergleich zu den übrigen Genotypen. *Hasstedt et al.* (2000) konnten diese Korrelation bestätigen, wobei in dieser Studie angenommen wurde, dass die Pro12Ala-Variante eher wie eine rezessive Mutation zu agieren scheint, mit dem größten Effekt bei homozygoten Individuen, die nur 1-2 % der Bevölkerung darstellen.

In der vorliegenden Studie wurde bei der Untersuchung aller adipösen und übergewichtigen Personen ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$, $n = 80$ und $\text{BMI} 25 - 29,9 \text{ kg/m}^2$, $n = 187$) eine Assoziation zwischen den PPAR γ 2-Genotypen und BMI festgestellt. Im Adipositas-Kollektiv waren die Wildtypen mit einem BMI-Mittelwert von $33,1 \text{ kg/m}^2$ schlanker als die A-Allelträger mit $34,3 \text{ kg/m}^2$ ($P = 0,03$). Auch bei den übergewichtigen Patienten konnte Ähnliches beobachtet werden; so hatten AA-Genotypen mit $29,2 \text{ kg/m}^2$ einen signifikant höheren BMI ($P = 0,046$) als PP- und PA-Genotypen mit jeweils $27,0 \text{ kg/m}^2$.

Bei einer Person mit einer Größe von 1,70 m würde es sich um einen Unterschied von drei bzw. sechs kg Körpergewicht handeln. Ein solcher Unterschied würde sich bei den Übergewichtigen und morbid Adipösen mit einer Spanne von 72 bis 134 kg Körpergewicht kaum statistisch nachweisen lassen. Diese Befunde sprechen dafür, dass der PPAR γ 2-Polymorphismus einen, wenn auch geringen, Einfluß auf den BMI haben könnte.

Im Hinblick auf die Allelfrequenzen konnte im Gesamtkollektiv beobachtet werden, dass das A-Allel umso häufiger vorkam, je größer der BMI war. So hatten die morbid Adipösen mit 0,2 die größte, die Normalgewichtigen dagegen mit 0,1 die kleinste, zu verzeichnende A-Allelfrequenz. Diese Allelverteilung erreichte mit $P = 0,009$ das statistische Signifikanzniveau. Weiterhin ergab sich im Kollektiv der Übergewichtigen eine auffällige Altersverteilung ($P = 0,014$). Die übergewichtigen A-Allelträger waren im Durchschnitt jünger als übergewichtigen Normaltypen und hatten einen größeren BMI ($P = 0,046$). Diese Beobachtung kann derartig interpretiert werden, als dass bei A-Allelträgern die Indikation zur Adipositas-Intervention bereits in jüngerem Lebensalter aufgrund eines schneller progredienten Krankheitsbildes gestellt würde. In diesem Zusammenhang sei auf *Ek et al.* (1999) verwiesen, die beobachten konnten, dass A12A-Homozygote, die initial übergewichtig waren, im Laufe der Jahre eine größere Tendenz zur Gewichtszunahme hatten als Heterozygote oder Wildtypen. Im Gegensatz dazu, zeigten Homozygote, die initial normalgewichtige waren, diesbezüglich eine verminderte Neigung. Erwähnenswert ist außerdem, dass übergewichtige Normaltypen ein teilweise (HDL-Chol. und Apo A $_1$) günstigeres Lipidprofil als übergewichtige PA-Genotypen ($P = 0,036$) hatten. *Deeb et al.* (1998) hingegen, stellten in ihrer Studie fest, dass A-Allelträger höhere HDL-Chol.- und niedrigere Triglyzerid-Werte hatten. Die übrigen Lipidwerte zeigten in den anderen BMI-Kategorien keine signifikanten Unterschiede.

Die detaillierte Betrachtung der Faktoren Alter, BMI und PPAR γ 2-Genotyp zeigte, dass nach Aufteilung des Gesamtkollektivs in zwei Gruppen, in Anlehnung an den Median des Alters, der bei 45 Jahren lag, bei den jüngeren Personen A-Allelträger einen größeren BMI hatten als Wildtypen ($P = 0,03$). Bei den älteren Personen ergab sich eine gegensätzliche Konstellation, allerdings ohne statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits im oberen Abschnitt angeführten Befunde. Dennoch gab es auch Arbeitsgruppen wie *Deeb et al.* (1998), die bei vergleichbaren A-Allelfrequenzen mit 0,12 bzw. 0,15 (333 bzw. 973 Patienten aus Finnland), A-Allelträgern einen statistisch signifikant niedrigeren BMI beimessen konnten. Dies könnte so interpretiert werden, dass die Ala-Variante zu einer wenig effizienteren Stimulation der PPAR γ -Zielgene führt und folglich auf molekularer Ebene zu einer geringeren Fettgewebsakkumulation. Eine für PPAR γ 2 kodierende, insbesondere im Fettgewebe vorgefundene, mRNA-Expression, könnte die Erklärung für die positive Korrelation zum BMI liefern.

Abschließend konnte in einer Studie an der deutschen Bevölkerung von *Evans et al.* (2000), in der 200 Patienten mit morbidem Adipositas und 192 gesunde Blutspender untersucht wurden, weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen noch ein Zusammenhang zwischen Pro12Ala-Polymorphismus und der Entwicklung einer morbidem Adipositas aufgezeigt werden. Einschränkend muss hier allerdings erwähnt werden, dass in dieser Untersuchung nur massiv übergewichtige Patienten berücksichtigt wurden, so dass ein maskierender Effekt auf die weniger übergewichtigen Personen nicht ausgeschlossen werden kann. Bei einem durchschnittlichen BMI von über 30 kg/m² waren die Untersuchungsergebnisse eines dänischen Patientenkollektivs von *Ek et al.* (1999) kongruent.

Zusammenfassend zeigen die in vorliegender Untersuchung beschriebenen Befunde sowie die Gegenüberstellung unterschiedlicher Studien, dass vorherrschende Meinungen bestätigt und auch erweitert werden konnten. So scheint der Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens eine Rolle in der Entstehung der Adipositas zu spielen und die genetische Variabilität dieses Gens mit unterschiedlichen BMI-Werten einherzugehen.

4.5 Perspektiven

Genetische Studien, die Assoziationen aufzeigen sollen, können in mancher Hinsicht als problematisch aufgefasst werden und sind oft von fehlender Reproduzierbarkeit. So gibt es einige Studien, die sich bereits mit dyslipidämischen Patientenkollektiven befasst haben, aber nur die wenigsten konnten in mehreren Untersuchungen bei vergleichbar großen Kontrollgruppen vorher beschriebene Hypothesen verifizieren. So wurden in vorliegender Untersuchung 477 Patienten untersucht, von denen rund 92 % an einer Hyperlipoproteinämie litten. Ein bezüglich dieses Merkmals durchaus als homogen zu bezeichnendes Kollektiv. In einer nachfolgenden Untersuchung könnte durch Auswahl eines ähnlichen Patientenguts die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen HLP und Pro12Ala-Polymorphismus näher untersucht werden. Zudem könnte in folgenden Studien, z.B. durch Auswahl eines jungen Patientenguts, auch auf eine mögliche altersabhängige Komponente intensiver eingegangen werden. So waren in vorliegender Untersuchung junge Übergewichtige signifikant häufiger A-Allelträger als ältere Übergewichtige. Die mRNA, die für das PPAR γ 2-Gen kodiert, wird fast ausschließlich im Fettgewebe exprimiert. Die Tatsache, dass die Masse des braunen Fettgewebes und die Stimulierbarkeit der Thermogenese mit zunehmendem Alter abnehmen, unterstützt die besondere Bedeutung des Alters für die Funktion des PPAR γ 2.

In einigen Untersuchungen wurde das Zusammenspiel des besagten Polymorphismus mit weiteren untersucht. *Ristow et al.* (1998) postulierten einen additiven Einfluss des Pro12Ala-Polymorphismus und der Pro115Gln-Mutation im PPAR γ 2-Gen. *Evans et al.* (2001) versuchten, mögliche Interaktionen zwischen dem W64R-Polymorphismus im beta-3-Adrenorezeptor (β -A3) und dem Pro12Ala-Polymorphismus sowie dem ApoE-Genotypen aufzuzeigen. Ähnliches könnte für Polymorphismen in weiteren Genen, wie PPAR γ 1 (welches ebenfalls zu einem gewissen Teil im Fettgewebe exprimiert wird) oder β -2-Adrenorezeptor, gelten. Da die Hyperlipoproteinämie ein polygenes Merkmal ist, sollte unter Einbeziehung möglichst vieler beteiligter Gene die stärkste Aussage in Bezug auf Risikopotential, Präventionsstrategien und individuell abgestimmte Therapiemaßnahmen gelingen.

5. Zusammenfassung

Der sogenannte Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens ist eine in der Bevölkerung (insbesondere in der deutschen Population) verbreitete Mutation mit einer Prävalenz von ca. 25 % (*Evans et al.* 2001, *Deeb et al.* 1998, *Altshuler et al.* 2000). Peroxisomenproliferator-Aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind ligandenaktivierte, im Zellkern lokalisierte Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression bestimmter Zielgene regulieren. PPAR γ , hauptsächlich im braunen und weißen Fettgewebe vorkommend, reguliert die Adipozytendifferenzierung, indem es Adipozyten-spezifische Gene aktiviert. Weiterhin wird PPAR γ als zentraler Regulator des Lipid- und Glukosestoffwechsels diskutiert und hat somit einen bedeutenden Einfluß auf Erkrankungen wie Hyperlipoproteinämien und den Diabetes mellitus. Zur Prüfung eines Zusammenhanges zwischen Pro12Ala-Polymorphismus des PPAR γ 2-Gens und Hyperlipoproteinämie wurden 477 deutsche Patienten mittels PCR-Verfahren genotypisiert. Anschließend wurden die klinischen Patientendaten unter Berücksichtigung der ermittelten Genotypen analysiert.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sich in dieser Untersuchung für diesen Polymorphismus kein eindeutiger Zusammenhang mit der HLP-Entstehung abzeichnete, wohl aber ein Einfluss im Sinne einer Dyslipoproteinämie durchaus vereinbar erschien. So waren im Gesamt- und HLP-Kollektiv höhere Triglyzerid-Werte mit dem A-Allel assoziiert. Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen A-Allel und höheren Gesamt-Chol., Triglyzeriden und Apo B-Werten im Kollektiv der Übergewichtigen zusammen mit einer altersabhängigen Komponente. Zudem wurde ein negativer Einfluss des Polymorphismus auf den BMI festgestellt, wobei A-Allelträger nicht nur im Kollektiv der Adipösen sondern auch in dem der Übergewichtigen mit einem höheren BMI assoziiert waren.

Für einen Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ2 wurden keine Anhaltspunkte gefunden.

6. Literaturverzeichnis

Aitman TJ, Todd JA (1995) Molecular genetics of diabetes mellitus. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 9: 631-656

Alaupovic P, Lee DM, McConarthy (1972) Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 260: 689-707

Aldridge TC, Tugwood JD, Green S (1995) Identification and characterization of DNA elements implicated in the regulation of CYP4A1 transcription. *Biochem J* 306: 473-479

Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl M-C, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES (2000) The common PPAR γ Pro 12 Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 26: 76-80

Assmann G (1982) *Lipidstoffwechsel und Atherosklerose*. Schattauer Verlag

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Steals B, Auwerx J, Laville M, Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46: 1319-1327

Auwerx J (1999) PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42: 1033-1049

Barroso I, Gurnell M, Crowley VEF, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TDM, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VKK, O'Rahilly S (1999) Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880-883

Bassam BJ, Caetano Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196(1): 80-83

Beamer BA, Yen C-J, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Schuldiner A (1988) Association of the Pro 12 Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 47: 1806-1808

Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1989) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8342-8346

Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994) The role of α -2-M-Receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 77: 53-69

Beisiegel U, Ameis D, Will H, Greten H (1995a) Hypertriglyceridämie und Arteriosklerose. *Physiologie und Pathophysiologie des Chylomikronenkatabolismus*. *Internist* 36: 357-361

Beisiegel U, Patsch J (1995) Chylomicronämie. In: Schwandt, Richter (Hrsg) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer, Stuttgart S.201-220

Berg K (1990) Lp(a) lipoprotein: an overview. In: Scanu A, ed. *Lipoprotein(a)*. New York: Academic Press 1990: 1-120

Bocher V, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2002) Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of lipids and inflammation control. *J Soc Biol* 196(1): 47-52

Bouchard C (1996) The genetics of obesity in humans. *Curr Opin Endocrinol Diab* 3: 29-35

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996) Differential expression of peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR alpha, beta and gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-366

Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP (1998) Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 273: 23786-23792

Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein receptors in the liver. *J Clin Invest* 72: 743-749

Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47

Bruin T, Groot NB, Jansen J, Kastelein H (1994) The c-terminus of lipoprotein lipase is essential for biological function but contains no domain for glycosyl phosphatidyl inositol anchorage. *Eur J Biochem* 221: 1019-1025

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B (1998) Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273: 25573-25580

Dargel R (1991) *Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine*. Akademie Verlag

Davignon J, Gregg RE, Sing CF (1988) Apolipoprotein polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 8: 1-21

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J (1998) Pro 12 Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genetics* 20: 284-287

Deep SS, Peng R (1989) Structure of the lipoproteinlipase gene. *Biochemistry* 28: 4131-4134

de Knijff P, Havekes LM (1996) Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease: a genetic and molecular biology approach. *Curr Opin Lipid* 7: 59-63

de Knijff P, van den Maagdenburg AMJM, Frants RR, Havekes LM (1994) Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Human Mutation* 4: 178-194

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85: 394-402

Delerive P, Furman C, Teissier E, Fruchart J, Duriez P, Staels B (2000) Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett* 471: 34-38

Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Rev* 20: 649-688

Devchand PR, Keller H, Petersen JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W (1996) The PPARalpha leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43

Diehm C, Schettler G (Hrsg) (1995) Das Metabolische Syndrom. Mit Beiträgen von Dietze G. München, Medion-Verlag

DiRenzo J, Soderstrom M, Kurokawa R, Ogliastro MH, Ricote M, Ingrey S, Horlein A, Rosenfeld MG, Glass CK (1997) Peroxisome proliferators-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* 17: 2166-2176

Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Petersen VJ, Nevriy DJ, Leid M (1997) p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferators-activator receptor alpha. *J Biol Chem* 272: 33435-33443

Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M (1999) Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferators-receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem* 274: 15901-15907

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992) Control of the peroxisomal beta oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887

Ek J, Urhammer SA, Sørensen TIA, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O (1999) Homozygosity of the Pro 12 Ala variant of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 42: 892-895

Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz MD, Moller DE, Berger J (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ 1 and γ 2. *Biochem and Biophys Res Commun* 224: 431-437

Evans D, Mann WA, de Heer J, Michel U, Wendt D, Kortner B, Wolf A, Beisiegel U (2000) Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor γ does not play a major role in the development of morbid obesity. *Int J Obes* 24: 647-651

Evans D, de Heer J, Hagemann, Wendt D, Wolf A, Beisiegel U, Mann WA (2001) Association between the P12A and c1431t polymorphisms in the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) gene and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 151-154

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Steals B, Vidal H, Auwerx J

(1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *J Biol Chem* 272: 18779-18789

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J (1998) PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438: 55-60

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) 15-Desoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-812

Forman BM, Chen J, Evans RM (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferators-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4312-4317

Fojo SS, Brewer HB (1992) Hypertriglyceridemia due to genetics defects in lipoprotein lipase and apolipoproteinC-II. *J Intern Medicine* 231: 669-677

Fritsche A, Madaus A, Tschritter O, Özeke M, Wulle E-L, Machicao F, Häring H, Stumvoll M (2001) Der Polymorphismus Pro 12 Ala im Peroxisomenproliferator-Aktivierten Rezeptor γ 2 (PPAR γ 2): Betazell-Funktion und Insulinsensitivität. *Dtsch Med Wschr* 126: 580-584

Gofman JW, DeLalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR (1954) The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma (Milano)* 2: 413-428

Goldstein JL, Brown MS (1977) Atherosclerosis: The low density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* 26: 1257

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR (1977) High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am J Med* 62: 707-714

Giovanucci E, Willet WC (1994) Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann. Med.* 26: 443-452

Gibbs WW (1996) Übergewicht: ein Zivilisationsproblem? Spektrum der Wissenschaft 11: 54-63

Granner DK, O'Brien RM (1992) Molecular physiology and genetics of NIDDM. Importance of metabolic staging. Diabetes care 15: 369-395

Grinsberg HN, Goldberg IJ (1999) Erkrankungen des Lipoproteinstoffwechsels. In: Berdel WE (Hrsg der deutschen Ausgabe) Harrisons Innere Medizin, Mc Graw-Hill, International (UK), London, 14. dt Ausg. Bd II, S.2517-2529

Hamann A, Matthaei S, Greten H (1995) Durch Dick und Dünn: Neue Erkenntnisse der Adipositasforschung. Dtsch med Wschr 120: 971-975

Hamman RF (1992) Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). Diabetes Metab Rev 8: 287-338

Hanefeld M, Hofmann D, Reichelt M (1978) Zur Epidemiologie koronarer Risikofaktoren in einer geschlossenen insulinspritzenden Diabetikerpopulation. Dtsch Gesundheitswesen 33: 1552-1556

Hanefeld M, Leonhardt W (1981) Das Metabolische Syndrom. Dtsch Gesundheitsw 35: 545-551

Hanefeld M, Schmechel U, Julius et al. (1991) Five year incidence of coronary heart disease related to major risk factors and metabolic control in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes. The diabetes intervention study (DIS). Nutr Metab Cardiovasc Dis 1: 135-140

Hanefeld M, Kohler C (2002) The metabolic syndrome and its epidemiologic dimensions in historical perspective. Z Ärztl Fortbild Qualitätssich 96(3): 183-188

Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T (2000) The Pro 12 Ala polymorphism in the peroxisome

proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2) may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 212-216

Hasstedt SJ, Ren Q-F, Teng K, Elbein SC (2001) Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 Pro 12 Ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 86(2): 536-541

Hauner H, von Ferber L, Köster I (1992) Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland von Krankenkassendaten. Sekundäranalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund. *Dtsch Med Wschr* 117: 645-650

Havel RJ, Kane JP, Kashyap ML (1978) Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in men. *J Clin Invest* 52: 32-38

Hayashi K (1991) PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Review* 1: 34-38

Hebebrand J, Renschmidt H (1995) Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Med Clin* 7: 403-410

Hellige G, Spiekermann PG, Ziegler A (1995) Lipoproteine und Atherogenese. *Herz-Kreislauf-Forum*

Herold et al. (2004) Stoffwechselkrankheiten. In: *Innere Medizin*

Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT et al. (2000) Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)* 1488(3): 189-210

Huff MW, Evans AJ, Wolfe BM, Connelly PW, Maguire GF, Strong WL (1990) Identification and metabolic characteristics of an apolipoprotein C-II variant isolated from a hypertriglyceridemic subject. *J Lipid Res* 30: 1349-1355

Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B (1997) Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor (RXR) heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272: 20108-20117

Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S (1998) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 370-374

Iverius PH, Ostlund-Linquist AM (1976) Lipoprotein lipase from bovine milk: Isolation procedure, chemical characterization and molecular weight analysis. *J Biol Chem* 251: 7791-7796

Iwata E, Matsuda H, Fukuda T, Fukuen S, Motomura T, Igarashi T, Yamamoto I, Azuma J (2001) Mutations of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) gene in a Japanese population: the Pro 12 Ala mutation in PPAR γ 2 is associated with lower concentrations of serum total and non-HDL-cholesterol. *Diabetologia* 44: 1354-1356

Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86

Jiao S, Kameda Y, Matsuzawa (1986) Influence of endogenous hyperinsulinemia on high density lipoprotein level in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis* 60: 279-286

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

Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170

Kirchgessner TG, Heinzemann C, Antoarakis SE, Kwiterno-Vitch PO, Lusis AJ (1989) Human lipoprotein lipase gene: Structure genetics and evolution. *Arteriosclerosis* 9: 691a

Kliwer SA, Lenhard JM, Wilson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisley GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4318-4323

Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninget M, Renn W, Häring HU (1999) The PPAR- γ 2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of type 2 diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 42: 758-762

Kostner GM, März W (2001) Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwandt, Richter (Hrsg) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer, Stuttgart, 2. Auflage, S. 645-666

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11: 779-791

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki

O, Aizawa S, Kadowaki T (1999) PPAR gamma mediates high fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4: 597-609

Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA (2000) Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101: 1311-1318

Lee H, Shi W, Tontonoz P, Wang S, Subbanagounder G, Hedrick CC, Hama S, Borromeo C, Evans RM, Berliner JA, Nagy L (2000) Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipids-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. *Circ Res* 87: 516-521

Lee SS, Pineau T, Drago L, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15: 3012-3022

Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC^{Min} /+mice. *Nature Medicine* 4(9): 1053-1057

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270: 12953-12956

Lehtovirta M, Kaprio J, Forsblom C, Eriksson J, Tuomilehto J, Groop L (2000) Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins. *Diabetologia* 43: 285-293

Löffler G, Petrides PE (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S.426-481

Luley C, Wieland H (1995) Epidemiologie der Dyslipoproteinämien. In: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schwandt, Richter; Schattauer, Stuttgart S. 84-97

Mahley RW, Stanley C, Rall JR (1989) Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The rule of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. 6th ed. Scriver, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. McGraw-Hill, New York S. 1195-1213

Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L, Tufano A, Rivellese AA, Riccardi G, Colantuoni V (1999) Pro 12 Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 is not associated with type 2 diabetes. Diabetes 48: 1466-1478

Mansen A, Guardiola-Diaz H, Rafter J, Branting C, Gustafsson JA (1996) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 222: 844-851

Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J (1998a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. Circ Res 83: 1097-1103

Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J (1998b) Macrophages in human atheroma contain PPAR-gamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. Am J Pathol 153: 17-23

Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J (1999a) PPAR gamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPAR-gamma as a potential mediator in vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 546-551

Marx N, Sukhova G, Collins T, Libby P, Plutzky J (1999b) PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells. Circulation 99: 3125-3131

Marx N and Hombach V (2001a) Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) in der Gefäßwand-neue Regulatoren der Genexpression in vaskulären Zellen. *Z Kardiol* 90: 470-477

Marx N, Mackman N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J (2001b) PPARalpha activators inhibit tissue Factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 103: 213-219

Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D (1998) Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273: 8560-8563

Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS et al. (2000) Impact of the peroxisome proliferator activated receptor γ 2 Pro 12 Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes* 24: 195-199

Meisinger C, Thorand B, Schneider A, Stieber J, Dörmig A, Lowel H (2002) Sex differences in risk factors for incident type 2 diabetes mellitus: the MONICA Augsburg cohort study. *Arch Intern Med (United States)* 162(1): 82-89

Michalik L, Wahli W (1999) Peroxisome proliferators-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Current opinion in Biotechnology* 10: 564-570

Miller ENC, Sambert N, Freedman RB (1985) Direct evidence that cholesterol transport is mediated by high density lipoproteins in rabbits. *Nature* 314: 109-111

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16(3): 1215

Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M (2001) The Pro 12 Ala substitution in PPAR γ is associated with resistance

to development of diabetes in the general population. Possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 Diabetes. *Diabetes* 50: 891-894

Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273: 16710-16714

Muerhoff AS, Griffin KJ, Johnson EF (1992) The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid and omega-hydroxylase, by clofibrilic acid. *J Biol Chem* 267: 19051-19053

Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 pt 1: 263-273

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNS in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

Müller-Wieland D, Kotzka J, Knebel B, Streicher R, Siemeister G, Krone W (1996) Metabolisches Syndrom und koronare Herzkrankheit: Molekulare Prozesse. In: Hanefeld M (Hrsg) *Das Metabolische Syndrom*, 1. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, S. 76-81.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell* 93: 229-240

Newton CR, Graham A (1994) PCR. Spektrum, Akademischer Verlag, Kapitel 13, S. 140-159

Niemeier A, Grafwels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U (1996) The VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res* 37: 1733-1742

Olivecrona T, Bengsson-Olivecrona G (1987) Lipoprotein lipase from milk-model enzyme in lipoproteinlipase research. In: Borensztajn J. Lipoproteinlipase, Evener Publishers, Chicago, p.15

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O' Malley BW (1995) Sequenze and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879

Pihlajamäki J, Miettinen R, Valve R, Karjalainen L, Mykkänen L, Kusisto J, Deeb S, Auwerx J, Laakso M (2000) The Pro 12 Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia. *Atherosclerosis* 151(2): 567-574

Poirier O, Nicaud V, Cambien F, Tiret L (2000) The Pro 12 Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 is not associated with postprandial responses to glucose or fat tolerance tests in young healthy subjects: the European Atherosclerosis Research Study II. *J Mol Med* 78: 346-351

Poynter ME and Daynes RA (1998) Peroxisome proliferators-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signalling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 273: 32833-32841

Reina M, Brunzell JD, Deeb SS (1992) Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoproteinC-II genes. *J Lip Res* 33: 1823-1832

Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR (1998) Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14751-14756

Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK (1998a) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7614-7619

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998b) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82

Riesen WF (2000) Fettstoffwechsel. In: Thomas L (Hrsg) *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 5. Aufl., Frankfurt/Main, TH-books-Verl.-Ges., S.171-190

Ringel J, Engeli S, Distler A, Sharma AM (1999) Pro 12 Ala Missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor γ and diabetes mellitus. *Biocheml and Biophys Res Com* 254: 450-453

Ristow M, Muller Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR (1998) Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 339: 953-959

Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269: 18767-18772

Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I (1991) *PCR: Clinical diagnostics and research*. Springer Laboratory, Heidelberg

Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C (2003) The Pro 12 Ala PPAR gamma 2 gene missense mutation is associated with obesity and insulin resistance in Swedish middle-aged men. *Diabetes Metab Res Rev* 19(2): 159-163

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, Bunker CH, Nwanko M, Majumder PP, Ferrell RE (1989) Genetic studies of human apolipoproteins. XI. The effect of the apolipoprotein C-II polymorphism on lipoprotein levels in nigerian blacks. *J Lipid Res* 30: 1349-1355

Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferators response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270: 19269-19276

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996a) Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expressions. *J Lipid Res* 37: 907-925

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996b) The peroxisome proliferators activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302 : 93-109

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe j, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J (1996c) PPAR alpha and PPAR gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15: 5336-5348

Schoonjans K, Martin G, Staels B and Auwerx J(1997) Peroxisome proliferators-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Current opinion in Lipidology* 8: 159-166

Schoonjans K, Auwerx J (2000) Thiazolidinediones: an update. *The Lancet* 355: 1008-1010

Schunack W (2003) Cardiovascular risk factor reduction. Cholesterol absorption inhibitors: a new action principle. *Pharm Unserer Zeit (Germany)* 32(6): 498-502

Shuldiner AR (1997) Obesity and diabetes: research points to genetic connection. Interview by Mark E. Weksler. *Geriatrics (United States)* 52(2): 57-60

Shuldiner AR, Tanner K (1997) Rapid (ligase-free) subcloning of PCR products. *Methods Mol Biol (United States)* 67: 69-78

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393: 790-793

Steinmetz A, Kaffarnik H (1995) Dysbetalipoproteinämie (Typ III-Hyperlipoproteinämie) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schwandt, Richter, Schattauer, Stuttgart S.161-181

Strachnan T (1994) *Das menschliche Genom*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Strachnan T, Read AP (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Swarbrick MM, Chapman CML, McQuillan BM, Hung J, thompson PL, Beilby JP (2001) A Pro 12 Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *Eur J Endocrinol* 144: 277-282

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156

Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 351-357

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM (1998) PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252

Turner RC, Hattersley AT, Shaw JT, Levy JC (1995) Type II Diabetes: clinical aspects of molecular biological studies. *Diabetes* 44: 1-10

Ugozoli L, Wallace RB (1991) Allel-specific polymerase chain reaction. A companion to methods in enzymology 2: 42-48

Vamecq J, Latruffe N (1999) Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 354: 141-148

Van Haeften TW, Dubbeldam S, Zonderland ML, Erkelens DW (1998) Insulin secretion in normal glucose-tolerant relatives of type 2 diabetic subjects. Assessments using hyperglycemic glucose clamps and oral glucose tolerance tests. *Diabetes care* 21: 278-282

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99: 2416-2422

Vigouroux C, Fajas L, Khallouf E, Meier M, Gyapay G, Lascols O, Auwerx J, Weissenbach J, Capeau J, Magre J (1998) Human peroxisome proliferator-activated receptor-2. Genetic mapping, identification of a variant in the coding sequence, and exclusion as the gene responsible for lipotrophic diabetes. *Diabetes* 47: 490-492

von Schacky C, Kiefl R, Marcus AJ, Broekman MJ, Kaminsky WE (1993) Dietary n-3 fatty acids accelerate catabolism of leukotriene B₄ in human granulocytes. *Biochim Biophys Acta* 1166: 20-24

Vosper H, Khoudoli GA, Graham TL, Palmer CAN (2002) Peroxisome proliferator activated agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. *Pharmacology & Therapeutics* 95: 47-62

Whal P (1999) Stoffwechsel. In: Bob A (Hrsg) *Innere Medizin*. Hippokrates Verlag im Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Aufl., S. 930-982

Wasan HS, Novelli M, Bee J, Bodmer WF (1997) Dietary fat influences on polyphenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3308-3313

Wechsler JG (1995) Endokrinologische Erkrankungen und Dyslipoproteinämien. In: Schwandt, Richter (Hrsg) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer, Stuttgart S. 273-284

Weitgasser R (2002) Risk status of screened population based on elevated serum cholesterol values. *Acta Med Austriaca Suppl (Austria)* 56: 14-6

Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS (1997) Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 272: 20230-20235

Windler E, Beil FU, Greten H (1996) Fettstoffwechselerkrankungen. In: Classen, Diehl, Kochsiek (Hrsg) *Innere Medizin* 3. Auflage S. 900-917

Windler E, Greten H (1998) Fettstoffwechsel. In: Schettler G, Greten H (Hrsg) *Innere Medizin*. Thieme, Stuttgart, New York, 11. Auflage, S.646-660

Winter WE, Nakamura M, House DV (1999) Monogenic diabetes mellitus in youth. The MODY syndromes. *Endocrinol Metab Clin north Am* 28: 765-785

Wion KL, Kirchgessner TG, Lusic AJ, Schotz MC, Lawn RM (1987) Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 235: 1638-1641

Yen CJ, Beamer B, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR (1997) Molecular scanning of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma (hPPARgamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPARgamma2 missense mutation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 241: 270-274

Yki-Järvinen H (1994) Pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 343: 91-95

Zamir I, Zhang J, Lazar M (1997) Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 11: 835-846

Zhang B, Marcus SL, Sajjadi FG, Alvares K, Reddy JK, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP (1992) Identification of a peroxisome proliferators-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7541-7545

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferators activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield of two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7921-7925

Zietz B, Barth N, Spiegel D, Schmitz G, Scholmerich J, Schaffler A (2002) Pro 12 Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2) is associated with higher levels of total cholesterol and LDL-cholesterol in male caucasian type 2 diabetes patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110(2): 60-66

7. Abkürzungsverzeichnis

AA	homozygot für das A-Allel
Abb.	Abbildung
ACBP	Acety-CoA-Bindungsprotein
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACO	Acetyl-CoA-Oxidase
ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
AD	Adipositas
Ala	Alanin
aP2	Adipozyten-Fettsäuren-Bindungsprotein P2
Apo B	Apolipoprotein B
Apo C	Apolipoprotein C
Apo E	Apolipoprotein E
B	Beobachtet
BMI	Body mass index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise

CETP	Cholesterinester-Transferprotein
Chol.	Cholesterin
CoA	Coenzym A
CM	Chylomikronen
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
CR	Chylomikronenremnants
CT	Carnitin
E	Erwartet
Endkonz.	Endkonzentration
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DM II	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR-1	Direct repeat-1-Sequenz

FABP	Fettsäure-Bindungsprotein
FAS	Fettsäure-Synthetase
FAT	Fettsäure-Transporter
FATP	Fettsäure-Transport-Protein
FCHL	familial combined hyperlipidemia
FFA	Freie Fettsäuren
GHLP	gemischte HLP
HC	Hypercholesterinämie
HDL	high density lipoproteins
HLP	Hyperlipoproteinämie
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HTG	Hypertriglyzeridämie
IDL	intermediate density lipoproteins
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
L	Ligand

LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoproteins
LDL-R	LDL-Rezeptor
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL receptor-related protein
MCAD	Mittellange-Acyl-CoA-Dehydrogenase
ME	Malat-Enzym
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTP	mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein
N	Anzahl
n.a.	nicht angegeben
Non-HLP	Personen ohne HLP
P	Wahrscheinlichkeit
p.A.	per Analyse
PA	heterozygot für das A-Allel
PCR	Polymerasekettenreaktion

PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PL	Pankreatische Lipase
Populat.	Population
PP	Wildtypträger
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisome proliferator response element
Pro	Prolin
RA	retinoid acid
RES	retikuloendotheliales System
rückw.	rückwärts
RXR	retinoid X receptor
STAT	signal transducers and activators of transcription
Tab.	Tabelle
Upm	Umdrehungen pro Minute
VLDL	very low density lipoproteins
vorw.	vorwärts
z.B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Frau Prof. Dr. Dr. Beisiegel für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Anleitung bei der Erstellung und Durchführung der Arbeit sowie für jegliche fachlich und menschlich kompetente Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Dave Evans danke ich für alle konstruktiven Vorschläge und die gesamte Betreuung während der Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des biochemischen Stoffwechsellabors von Frau Prof. Dr. Dr. Beisiegel für die herzliche Aufnahme und Hilfe bei Fragen bedanken.

Prof. Berger danke ich für seine Beratung bezüglich statistischer Auswertungen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Aberle für die praktischen Hilfestellungen sowie immer offenes Ohr bei der Bewältigung kleiner und großer Probleme.

Weiterhin bedanke ich mich bei Carolina Drys, die in allen Lebenslagen mit aller Liebe und von ganzem Herzen immerwährend für mich da war.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mit Liebe, Geduld und Mut mir immer zur Seite standen und mir dieses Studium und damit auch diese Promotion überhaupt ermöglichten. Auf diesem Wege mussten sie auf vieles verzichten, das Ihnen und mir weiterhin im Leben fehlen wird. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

9. Lebenslauf

Personalien:

Name: Vasilios Papadopoulos
Wohnort: Suhrenkamp 16
22335 Hamburg
Tel.: 0049-40-51319564
Geburtstag und -ort: 12.04.1978 in Berlin
Familienstand: ledig
Eltern: Stavros und Vasilias Papadopoulos
Nationalität: Deutsch

Berufstätigkeit:

Seit 01/2004 Arzt im Praktikum in der I.Med. des AK St. Georg (Innere)

Studium:

12/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002-10/2003 Praktisches Jahr:
Pädiatrie: Altonaer Kinderkrankenhaus
Innere Medizin: Israelitisches Krankenhaus
Chirurgie: UKE / University Hospital of Athens/Griechenland
09/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1999 Ärztliche Vorprüfung
10/1997 Beginn mit dem Studium der Humanmedizin an der
Universität Hamburg

Schulbildung:

05/1997 Abitur am Wolfgang-Borchert-Gymnasium
08/1988-05/1997 Wolfgang-Borchert-Gymnasium in Halstenbek (Schleswig-Holstein)
1987-1988 Grundschule Krupunder (Schleswig-Holstein)
1984-1987 Fritzler-Homberg-Grundschule in Berlin

Stand: September 2004

10. Erklärung

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

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

Hamburg, im Jahre 2004

Vasilios Papadopoulos