

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der genetischen Variabilität im Promotor des
AdipoQ-Gens bezüglich zirkulierender Proteinspiegel und ihrer
Bedeutung für das Typ 2 Diabetesrisiko

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sheila Melanie Müller
aus Schwerin

Datum der Promotion: 27.02.2015

„HÖRE NIE AUF ANZUFANGEN – FANGE NIE AN AUFZUHÖREN“

-Volksmund-

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Heredität des Diabetes mellitus Typ 2	2
1.2 Methoden zur Identifizierung von Risikogenen	2
1.2.1 Grundprinzip der Kandidatengen-Assoziationsstudien	3
1.2.2 Grundprinzip von genomweiten Assoziationsstudien.....	3
1.2.2.1 Replikation – Eine Schwierigkeit!	5
1.3 Die Promotorregion – Regulation der Transkriptionsaktivität	6
1.4 Adiponectin – DNA, Protein, Rezeptoren.....	8
1.5 Adiponectin, Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus	10
1.5.1 Adiponectin- Einfluss auf die Insulinresistenz	12
1.5.2 Adiponectin und die β -Zelle	13
1.5.2.1 Adiponectin und β -Zell-Dysfunktion.....	15
1.5.2.2 Adiponectin und β -Zell-Masse.....	16
1.5.3 Adiponectin – ZNS	17
1.6 Einfluss genetischer Varianten im AdipoQ-Gen auf die zirkulierenden Plasma-adiponectinspiegel und den Typ 2 Diabetes mellitus.....	20
1.7 Ziele der Arbeit.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Methoden Probanden	24
2.1.1 Charakterisierung der EPIC-Potsdam Kohorte	24
2.1.1.1 Blutentnahme und Labordiagnostik	25
2.1.1.2 Anthropometrie.....	25
2.1.1.3 Blutdruckmessung	27
2.1.2 Charakterisierung der MeSy-BePo-Kohorte (Metabolisches Syndrom Berlin-Potsdam)	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.2.1 Blutentnahme und Bestimmung der Laborparameter	28
2.1.2.2 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT) – Durchführung	28
2.1.2.3 Glukosemetabolismus - Indizes	29
Bestimmung der Insulinsensitivität	30
Bestimmung der hepatischen Insulinsensitivität und der β -Zell-Funktion –Homeostasis Model Assessment [HOMA _{IR}]	31
Bestimmung der Insulinsekretion	31
2.2 METHODEN – GENOTYPISIERUNG	32
2.2.1 Darstellung der Polymorphismen – Ein Überblick.....	32
2.2.2 Die Polymerasekettenreaktion.....	33
2.2.2.1 Durchführung der Polymerasekettenreaktion	33
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.4 Durchführung der Genotypisierung	34
2.2.4.1 Didesoxymethode nach Sanger und single nucleotide primer-extension (SNUPe)- Methode	35
2.2.4.1.1 Durchführung der SNP-Diagnostik	35
2.2.4.1.2 Aufreinigung	36
2.2.4.1.3 SNUPe-Reaktion	36
2.2.4.1.4 Aufreinigung des SNUPe-Produktes	37
2.2.4.1.5 SNP-Detektion.....	37
2.2.4.2 Real time PCR - TaqMan®-Assay	38
2.2.4.2.1 Prinzip TaqMan®-Assay.....	39
2.2.4.2.2 Durchführung der TaqMan- Genotypisierung	42
2.3 Material	43
2.3.1 Biochemikalien	43
2.3.2 Chemikalien	43
2.3.3 Verbrauchsmaterial	43
2.3.4 Kits und Assays zur Genotypisierung.....	44
2.3.5 Laborparameter	44
2.3.6 Geräte zur Phänotypisierung.....	45
2.3.7 Primer und Sonden.....	45
2.3.8 Laborgeräte	45
2.3.9 Software	46
2.4 Analysen.....	47
2.4.1 Test Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)	47
2.4.2 Powerkalkulation.....	48
2.4.3 Datenanalyse SPSS	48

3	ERGEBNISSE	50
3.1	Ergebnisse der Powerkalkulation	50
3.2	Charakterisierung der EPIC Potsdam-Kohorte	51
3.2.1	Häufigkeitsverteilung der Promotorpolymorphismen im AdipoQ-Gen in der EPIC-Potsdam- Kohorte	52
3.2.2	Klinische Charakteristika der 3 Promotorpolymorphismen im dominanten Modell	52
3.2.3	Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem Diabetes mellitus Typ 2	55
3.3	Charakterisierung der MeSy-BePo-Gesamtkohorte	56
3.3.1	Häufigkeitsverteilung der Promotorpolymorphismen im AdipoQ- Gen in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte	57
3.3.2	Klinische Charakteristika der 3 Promotorpolymorphismen im dominanten Modell in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte	58
3.3.3	Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit den Adiponectinspiegeln in allen Probanden ohne einen manifesten Diabetes mellitus Typ 2 des MeSy-BePo-Kollektives	59
3.3.4	Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem Diabetes mellitus Typ 2 in der MeSy-BePo-Kohorte	61
3.3.5	Assoziation der Promotorpolymorphismen mit dem T2D unter Einbeziehung intermediärer Phänotypen in der MeSy-BePo-Kohorte – 2 Modelle	62
4	DISKUSSION	66
4.1	Assoziation der Polymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel	66
	Der Promotorpolymorphismus rs266729 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte	66
	Der Promotorpolymorphismus rs17300539 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte	70
	Der Promotorpolymorphismus rs16861194 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte	74
4.2	Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem Typ 2 Diabetes, seiner Vorstufen (IFG/IGT) und Indizes des Glukosemetabolismus	77
4.3	Stärken und Limitationen	82
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Ausblick	84
5	LITERATURVERZEICHNIS	86
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101
7	TABELLENVERZEICHNIS	102

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103
Abkürzungen.....	103
Einheiten.....	107
9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	108
10 CURRICULUM VITAE	109
11 DANKSAGUNG	110

ZUSAMMENFASSUNG

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine zunehmend häufigere Erkrankung, wobei die Hauptursache dieser Entwicklung in der ansteigenden Prävalenz der Adipositas zu sehen ist. Es handelt sich hierbei um multifaktorielle Erkrankungen, an deren Pathogenese sowohl genetischen als auch Umweltfaktoren eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Eines der vielen Substanzen, welche vom Fettgewebe als endokrines Organ produziert wird, ist das Adiponectin. Hierbei sind hohe Adiponectinspiegel mit einem selteneren Auftreten eines T2D assoziiert.

Gegenstand der vorliegenden Dissertation war daher zum einen, die Rolle der bereits bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen rs266729, rs17300539, rs16861194 und deren Assoziation mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln, sowie zum anderen mit dem Endpunkt T2D zu untersuchen. Die Bearbeitung der Fragestellungen erfolgte hierbei in 2 voneinander unabhängigen Kohorten, um eine unabhängige Replikation von Ergebnisse zu gewährleisten.

Zur Beantwortung wurde zum einen die EPIC-Potsdam-Kohorte (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) herangezogen, welche zum Zeitpunkt der Dissertation aus 187 Fällen und 376 Kontrollen bestand.

Die Replikation erfolgte in der unabhängigen MeSy-BePo-Kohorte (Metabolisches Syndrom Berlin-Potsdam), welche zum Zeitpunkt der Dissertation 2031 Probanden umfasste.

Die SNP-Detektierung erfolgte mit der S_{Nu}P_e-Methode (rs266729, rs17300539) sowie im weiteren Verlauf unter Anwendung der effizienteren TaqMan-Technologie (rs16861194).

Die Assoziation des Einzelnukleotidpolymorphismus rs17300539 mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln konnte in beiden Kohorten sicher repliziert werden, wobei hier hetero- und homozygote Mutanten (AG/AA) im Vergleich zum Wildtyp (GG) höhere zirkulierende Spiegel aufwiesen, was die Ergebnisse bisheriger Studien bestätigt.

Bezüglich des rs266729 wiesen Probanden mit dem WT im Vergleich zu den Probanden, welche hetero- bzw. homozygot (CG/GG) für den Polymorphismus waren, im Trend [$p = 0,012$ (MeSy-BePo)] höhere zirkulierende Adiponectinspiegel auf. Dieses Ergebnis konnte jedoch in der

EPIC-Potsdam-Kohorte nicht repliziert werden, was wiederum die Bedeutsamkeit der Replikation im Rahmen von Assoziationstudien unterstreicht.

Für den Promotorpolymorphismus rs16861194 ließ sich keine signifikante Assoziation mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln nachweisen, jedoch wiesen in beiden Kohorten Träger des Wildtyps (AA) im Vergleich zu hetero- und homozygoten Mutanten (AG/GG) höhere Adiponectinspiegel auf, wobei in der MeSy-BePo-Kohorte mit einem p-Wert von 0,066 ein Trend erkennbar war.

Eine Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem inzidenten bzw. prävalentem T2D, seiner Vorstufen sowie Indizes des Glukosemetabolismus ließ sich in beiden Kohorten nicht aufzeigen, wobei aufgrund des vermutlich schwachen genetischen Effektes und im Rahmen dieser Dissertation fehlender statistischer Power in beiden Kohorten die Annahme der Nullhypothese nicht gerechtfertigt ist.

Zusammenfassend bestätigen die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse die Assoziation des rs17300539 mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln. Des Weiteren weisen die Ergebnisse auf eine mögliche Assoziation des rs266729 sowie des rs16861194 hin und leisten somit einen Beitrag zu der bisher in der Literatur sehr diskrepanten Datenlage. Bezüglich einer möglichen Assoziation mit dem inzidentem T2D, seiner Vorstufen sowie Indizes des Glukosemetabolismus kann im Rahmen dieser Dissertation keine abschließende Aussage getroffen werden.

Grundsätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass der genetische Hintergrund offenbar das pathophysiologisch wichtige Fettgewebshormon Adiponectin reguliert.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is an increasingly frequent disease and the main cause of this development is seen in the rising prevalence of obesity. Both diseases are multifactorial disorders and for the pathogenesis both, environmental and genetic factors, are of crucial importance.

One of the substances, which is produced from the adipose tissue as an endocrine organ, is called adiponectin. Here, high adiponectin levels are associated with a less frequent occurrence of type 2 diabetes mellitus.

The topic of this thesis was therefore on the one hand to examine the role of the already established single-nucleotide-polymorphisms rs266729, rs17300539, rs16861194 and their association with the circulating plasma adiponectin levels, and on the other hand, with the endpoint T2D. The processing of these questions followed in two independent cohorts to ensure an independent replication of the results.

To answer these questions, the EPIC-Potsdam cohort (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) was used for one, which comprised at the time of the thesis 187 cases and 376 controls. The replication was carried out in the independent MeSy-BePo cohort (Metabolic Syndrome Berlin Potsdam), which included 2031 subjects at the time of the dissertation.

The SNP analysis was performed using the SNUPE method (rs266729, rs17300539) and in the course of using the more efficient TaqMan technology (rs16861194).

The association of the rs17300539 single nucleotide polymorphism with the circulating adiponectin levels could certainly be replicated in both cohorts. Heterozygous and homozygous mutants here (AG / AA) had higher circulating levels compared to wild type (GG), which confirms the results of previous studies.

Concerning the promoterpolymorphism rs266729, study participants with the wild type (CC) had higher circulating adiponectin levels compared to carriers which were hetero-, resp. homozygous for the polymorphism [association for trend : $p = 0,012$ (MeSy-BePo)]. This result could not be

replicated in the EPIC-Potsdam-cohort, which therefore underlines the significance of replication within the scope of genetic association studies.

For the promoterpolymorphism rs16861194 no significant association with the circulating adiponectin levels could be detected, however in both cohorts, study participants who carried the wildtype (AA) had higher adiponectin levels compared to the heterozygous/homozygous mutant. In the MeSy-BePo-cohort with a p-value of 0.066, a trend was evident.

An association of the 3 promoterpolymorphisms with the incident resp. prevalent type 2 diabetes mellitus, its precursors and indices of glucose metabolism did not shown in both cohorts and because of the presumably weak genetic effect and in this thesis the lack of statistical power in both cohorts, the acceptance of the null hypothesis is not justified.

In conclusion, the results of this thesis confirm the association of the rs17300539 with the circulating adiponectin levels. Furthermore, the results for the rs266729 and rs16861194 point out a feasible association and contribute to the previously very discrepant literary data available.

Regarding a possible association with the incident resp. prevalent type 2 diabetes mellitus, its precursors, and indices of glucose metabolism no final conclusion has to be taken in this thesis.

Basically, these results demonstrate that the genetic background obviously regulates the pathophysiologically important adipose tissue hormone adiponectin.

1 EINLEITUNG

Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit und hat mittlerweile ein epidemieartiges Ausmaß angenommen. Schätzungen gehen davon aus, dass aktuell ca. 285 Millionen Erwachsene (20-79 Jahre) weltweit erkrankt sind. Diese Zahl wird weiter ansteigen: so wird die Anzahl der Erkrankten im Jahre 2030 auf 439 Millionen geschätzt, das bedeutet eine Zunahme um 69% innerhalb von 20 Jahren (Shaw et al. 2010). Im Vergleich dazu waren im Jahre 2003 schätzungsweise 170 Millionen Erwachsene weltweit von dieser Erkrankung betroffen (Doria et al. 2008). Unter diesen Individuen sind ca. 90% an einem Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) erkrankt, wobei hier nicht mehr als 10% auf die monogenen Formen zurückzuführen sind, was bedeutet, dass der größte Teil der Individuen an einem T2D erkrankt ist, dessen Ätiologie als komplex polygen angenommen wird (Ridderstrale et al. 2009, Stumvoll et al. 2005).

Als einer der Hauptgründe für den epidemieartigen Anstieg des T2D ist die ebenfalls deutlich ansteigende Zahl der an Adipositas Erkrankten zu sehen, ein ebenfalls komplex polygenes Krankheitsbild, welches vor allem durch den sich vollzogenen Lebenswandel mit einer vorwiegend sitzenden Tätigkeit sowie einem Überangebot an Nahrungsmitteln mit einer hohen Energiedichte bedingt ist (Ridderstrale et al. 2009, Rolla et al. 2009).

Somit scheinen sowohl der T2D als auch die Adipositas auf den ersten Blick Krankheiten zu sein, die erworben sind. Dies ist aber nur eine Seite der Medaille: die Entwicklung der beiden Erkrankungen wird durch Umweltfaktoren in genetisch veranlagten Individuen ausgelöst. Die genetische Veranlagung ist demzufolge eine ganz wesentliche Grundlage der Krankheitsentstehung.

Dieses Zusammenspiel zwischen Genen und Umwelt muss bei der Analyse von pathophysiologischen Studien berücksichtigt werden, grundsätzlich bezeichnet man die Krankheitsentstehung auch als multifaktoriell (Ridderstrale et al. 2009).

1.1 Heredität des Diabetes mellitus Typ 2

Um die hereditäre Komponente einer Erkrankung zu eruieren, eignen sich Zwillingsstudien, Populationsstudien sowie Segregationsanalysen.

Beim T2D liegen die Konkordanzraten für monozygote Zwillinge bei 34-58%, während sie bei dizygoten Zwillingen bei 16-17% liegen (Kaprio et al. 1992, Newman et al. 1987). Des Weiteren konnten Populationsstudien aufzeigen, dass die Prävalenzraten des T2D in unterschiedlichen ethnischen Gruppen sehr stark differieren, wobei höchste Raten bei den Nauro- und Pima-Indianern (41% bzw. 50%) zu finden sind (King et al. 1993). Hinzu kommt, dass die Prävalenzraten in Vollblut-Nauro- bzw. Vollblut-Pima-Indianern im Vergleich zu Halbblut-Nauro- bzw. Halbblut-Pima-Indianern signifikant höher sind, was an allererster Stelle auf eine genetische Komponente zurückzuführen sein dürfte (Knowler et al. 1988, Serjeantson et al. 1983), zumal sich in den genannten Kohorten keine Hinweise für Unterschiede in der Ernährung oder dem Lebensstil finden ließen (Serjeantson et al. 1983). Weiterhin kamen Segregationsanalysen zu dem Schluss, dass Angehörige ersten Grades im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein höheres Risiko haben einen T2D zu entwickeln (Köbberling et al. 1982). So liegt das Risiko von Kindern, deren Eltern an einem T2D erkrankt sind, zwischen 25 und 50 % (Schwarz et al. 2009).

Weitere Hinweise kommen von genomweiten Genkartierungsstudien, die aufzeigen, dass verschiedene chromosomale Regionen mit dem T2D assoziiert sind (Tusié Luna 2005).

1.2 Methoden zur Identifizierung von Risikogenen

Zu Beginn dieser Dissertation gab es eine wesentliche Methode, welche im Bereich der Genforschung bei komplexen Erkrankungen verfolgt wurde, nämlich der sogenannte Kandidatengenansatz. Seit ca. 2007 sind durch technologische Weiterentwicklungen genomweite SNP-Analysen bei großen Patientenzahlen möglich, wodurch der Kandidatengenansatz durch genomweite Assoziationsstudien (GWAs) abgelöst wurde (Park 2011).

Diese Promotion begann im Jahr 2003, weshalb voll umfänglich die Methode des Kandidatengenansatzes zur Anwendung kam. Trotzdem werden im Folgenden beide Methoden näher erläutert, da mittlerweile die GWAs als Standard bei genetischen Studien komplexer Erkrankungen betrachtet werden können.

1.2.1 Grundprinzip der Kandidatengen-Assoziationsstudien

Bei diesem Ansatz werden Kandidatengene untersucht, bei denen es sich um Gene handelt, die aufgrund einer „a priori“ Hypothese über die ätiologische Rolle des Genes im Erkrankungsprozess ausgewählt werden. Es handelt sich demzufolge um einen hypothesengesteuerten Ansatz, welcher Wissen um biochemische Prozesse im Rahmen der Erkrankung zur Voraussetzung hat (Jorgensen et al. 2009, Tabor et al. 2002).

Von Bedeutung ist ebenfalls, in welchem Bereich sich der oder die zu untersuchenden Einzelnukleotidpolymorphismus/en befinden. So sollte man möglichst solche wählen, die einen Einfluss auf die Funktion des von dem Gen zu kodierenden Proteins haben. Hier eignen sich Polymorphismen, die entweder zu einem Aminosäureaustausch führen oder aber solche, die in Regionen liegen, welche die Genaktivität kontrollieren (Kwon et al. 2000). Zu letztgenannten Regionen gehört neben dem „Enhancer“ und dem „Silencer“ die im Rahmen dieser Dissertation untersuchte Promotorregion (de Vooght et al. 2009), welche in Kapitel 1.3 ausführlicher beleuchtet wird.

Diese gewählten Polymorphismen können dann selbst für die Veränderung verantwortlich sein oder aber in LD (Linkage disequilibrium) mit anderen, potentiell unbekanntem Varianten stehen, die den jeweiligen Effekt bedingen.

Untersucht werden diese Kandidatengene und ihre Polymorphismen in der Regel in Form von Fall-Kontroll-Studien, um mit geeigneten statistischen Methoden herauszufinden, ob es signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen gibt und somit eine Assoziation mit dem jeweils untersuchten Phänotyp besteht. Somit werden 2 Punkte berücksichtigt: die statistische Stärke der Assoziation sowie die biologische Plausibilität (Tabor et al. 2002).

Eine wesentliche Limitation von Kandidatengen-getriebenen Assoziationsstudien ist die häufig fehlende Replizierbarkeit der Ergebnisse. So konnten diverse Studien nachweisen, dass initial signifikante Ergebnisse in nachfolgenden Publikationen typischerweise nicht repliziert werden konnten (Hirschhorn et al. 2002), wobei die Gründe hierfür in Kapitel 1.2.2.1 näher erläutert werden.

1.2.2 Grundprinzip von genomweiten Assoziationsstudien

Im Vergleich zum Kandidatengenansatz können bei genomweiten Assoziationsstudien Variationen ermittelt werden, die kein biologisches Wissen zur Voraussetzung haben. Es handelt sich demzufolge um einen hypothesenfreien Ansatz, mit dem es möglich ist „neue“ Gene zu

identifizieren, von denen bisher nicht bekannt ist, auf welche Art und Weise sie einen Einfluss auf den Phänotyp nehmen.

Zum Einsatz kommen bei dieser Methode genetische Marker, welche in einer definierten Dichte über das menschliche Genom verteilt sind. Getestet wird hierbei, ob eine genetische Assoziation zwischen der zu untersuchenden Erkrankung und dem Marker besteht (Sookoian et al. 2009).

Der Vorteil der GWAs im Vergleich zu den Kandidatengenassoziationsstudien liegt darin, dass ein möglicher Bias, bedingt durch die falsche Annahme von biologischen Hypothesen, ausgeschlossen werden kann (Sookoian et al. 2009).

Eine Schwierigkeit ist, aus der Unmenge der entdeckten Einzelnukleotidpolymorphismen diejenigen herauszufiltern, die einen wahren Einfluss auf die Erkrankung haben. Um dies zu erreichen, werden nur Einzelnukleotidpolymorphismen in weitere Analysen einbezogen, welche hohe Signifikanzen bzgl. ihrer Assoziation mit dem Endpunkt haben ($p < 10^{-7}$). Diese initial positiven Treffer werden dann in mehrfachen Replikationskohorten bestätigt, nur solche mit starker Assoziation und erfolgreicher Bestätigung werden als „echte“ genetische Marker gewertet. Dies führt auf der einen Seite zwar zu einer geringeren Rate von falsch positiven Assoziationen, auf der anderen Seite bedeutet das jedoch, dass richtig positive Einzelnukleotidpolymorphismen mit einem nur kleinen genetischen Effekt möglicherweise von weiteren Analysen ausgeschlossen werden. Somit besteht ein Risiko, dass genetische Varianten im Rauschen („Noise“) verschwinden, obwohl sie sehr wohl einen biologischen Effekt haben könnten (Sookoian et al. 2009).

Als nur ein Beispiel sei hier der PRO12ALA-Polymorphismus im PPARgamma-Gen benannt, wobei hier die Pro-Variante moderat ($OR = 1,25$) mit dem T2D assoziiert ist (Altshuler et al. 2000). Diese Assoziation konnte mit der Methode des Kandidatengenansatzes mehrfach positiv repliziert werden, jedoch konnte ein Effekt dieses Polymorphismus bisher nicht regelhaft in vorliegenden genomweiten Assoziationsstudien nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass eine Reihe von genetischen Varianten mit schwachem genetischen Effekt bislang nicht detektiert wurden, trotz der erheblichen Aufwendungen und Patientenzahlen, die für GWAs investiert wurden (Sookoian et al. 2009).

Tatsächlich werden mit den bislang beschriebenen Polymorphismen nur bis zu 10% der Heredität des T2D erklärt. Offenkundig gibt es also noch eine Reihe unbekannter genetischer

Faktoren, die an der Entstehung komplexer Erkrankungen beteiligt sind. Trotzdem ist völlig unstrittig, dass GWAs der wesentliche Fortschritt bei der Aufklärung komplexer Erkrankungen in den letzten Jahren waren und eine Reihe von neuen Kandidaten identifiziert werden konnten, die z.B. mit dem T2D assoziiert sind und nun funktionell charakterisiert werden müssen. Im besten Fall sind diese Zielmoleküle die Grundlage neuer Therapieoptionen (Park 2011).

1.2.2.1 Replikation – Eine Schwierigkeit!

Ein klassisches Problem der Kandidatengen-getriebenen Assoziationsstudien sind falsch positive Ergebnisse, da die Assoziationen oftmals nicht repliziert werden können. Dies kann verschiedene Gründe haben, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Eine häufige Ursache ist ein inadäquates Studiendesign, insbesondere eine fehlende Vergleichbarkeit zwischen der Fall- und Kontrollgruppe, verursacht durch heterogene Umweltfaktoren und Nichtbeachtung des genetischen Backgrounds der untersuchten Population sowie eine zu gering gewählte Fallzahl mit einer entsprechend fehlenden statistischen Power.

Ein weiteres Problem ist, dass die Charakterisierung des Phänotyps zwischen den Studien oftmals variiert, wodurch die Vergleichbarkeit der Studien untereinander erschwert wird.

Zu erwähnen ist letztlich auch noch die Manipulation von Daten, insbesondere was die Modifizierung der Charakterisierung des Phänotyps betrifft, um ein statistisch signifikantes und somit publikationswürdiges Ergebnis zu erzielen. Hier gibt es weiterhin zweifelsfrei einen Publikations-Bias, d.h. dass bevorzugt positive Assoziationen publiziert werden, während negative Ergebnisse typischerweise nicht leicht zu veröffentlichen sind (Chanock et al. 2007).

Zu benennen sind auch eine Verzerrung der Ergebnisse durch das Testen von multiplen Hypothesen ohne Vornahme einer entsprechenden Korrektur sowie die Nichtbeachtung des Hardy-Weinberg-Equilibriums (HWE); (Yesupriya et al. 2008).

Die oben genannten Schwierigkeiten machen deutlich, dass eine sorgfältige Planung und ein rigides Replizieren von Studienergebnissen in unabhängigen Kohorten erforderlich ist, um Ergebnisse als reliabel und reproduzierbar zu bewerten.

Beachten sollte man hierbei, dass die Studien von ausreichender Größe sein sollten, um den zu erwartenden kleinen Effekt überhaupt detektieren zu können. Auch sollte derselbe oder ein ähnlicher Phänotyp analysiert werden sowie eine ähnliche Population untersucht werden. Im Falle einer positiven Replikation sollte eine ähnliche Effektgröße und statistische Signifikanz aufgezeigt werden können, wobei derselbe SNP gewählt werden sollte oder aber ein SNP der in hohem LD (Linkage disequilibrium) zu diesem steht. Auch sollte in der Analyse in beiden Studien

dasselbe genetische Modell zur Anwendung kommen. Eine strenge Rationale für die gewählten replizierten SNPs sollte vorliegen, wobei hier die LD-Struktur, mutmaßliche funktionelle Daten sowie bereits publizierte Literatur miteinbezogen werden sollten. Weiterhin sollte auf eine detaillierte Beschreibung des Studiendesigns sowie des Analyseplanes geachtet werden (Chanock et al. 2007).

1.3 Die Promotorregion – Regulation der Transkriptionsaktivität

Wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt, handelt es sich beim Promotor um einen regulatorischen Bereich der DNA, dem eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription zukommt. Der Promotorbereich besteht zum einen aus dem sogenannten core-Promotor sowie zum anderen aus der proximalen Promotorregion, in der sich auch die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Polymorphismen befinden.

Beim core-Promotor handelt es sich um eine locker definierte Region, welche sich schätzungsweise im Bereich von – 40 bis + 50 Nucleotide vom Transkriptionsstartpunkt befindet und typischerweise für die basale Transkription ausreichend ist. Dieser Bereich enthält Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren sowie für die RNA-Polymerase II, wobei die Transkriptionsfaktoren einen Komplex bilden, der für die RNA-Polymerase II essentiell ist, um an die Transkriptionsstartseite zu binden, so dass diese nun mit ihrer eigentlichen Arbeit beginnen kann (de Vooght et al. 2009, Maston et al. 2006).

Der andere wesentliche Baustein ist die proximale Promotorregion, wobei sich dieser in Bezug auf die Lage unmittelbar „upstream“ an den core-Promotor anschließt und sich im Allgemeinen über einen Bereich von mehreren hundert Basenpaaren erstreckt. Die proximale Promotorregion enthält typischerweise multiple Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Maston et al. 2006). Hier bindet auch eine zweite Klasse von Transkriptionsfaktoren, welche als Aktivatoren bezeichnet werden. Diese sind in der Lage, die Transkriptionsaktivität in einem Rahmen zu stimulieren, der weit über die basale Transkriptionsaktivität hinausreicht (de Vooght et al. 2009). In der folgenden Abbildung (Abb. 1) ist der generelle Aufbau einer Promotorregion zum besseren Verständnis noch einmal schematisch dargestellt (Abb. adaptiert nach de Vooght et al. 2009):

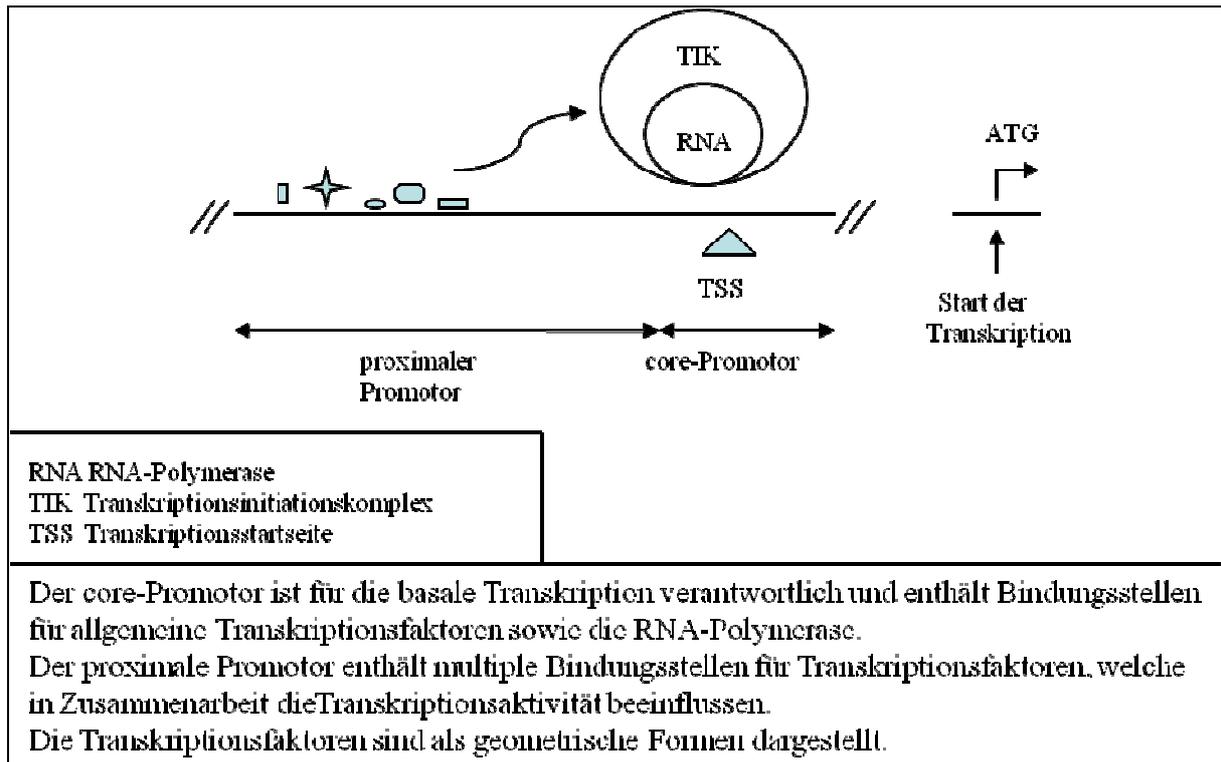


Abb. 1: Der Promotor und seine Elemente (Abb. adaptiert nach de Vooght et al. 2009)

Liegt nun ein Polymorphismus in der Promotorregion, ist es denkbar, dass dieser einen Einfluss auf die Transkriptionsfaktor-Bindung hat, was wiederum die Genexpression sowie schlussendlich die Beeinflussung des von dem Gen produzierten Proteins nach sich ziehen könnte (Guo et al. 2005).

Um nur ein Beispiel zu nennen, haben Ober und seine Arbeitsgruppe einen Polymorphismus im HLA-G Gen (-725 C/G) gefunden, dessen Produkt die mütterliche Immunantwort auf den Fötus inhibiert, wobei das G-Allel mit einem erhöhten Risiko für eine Fehlgeburt assoziiert war (Guo et al. 2005, Ober et al. 2003). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der SNP im Bereich der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor IRF-1 (Interferon Response factor-1) liegt, was die Bindung von IRF-1 beeinflussen könnte und es somit möglicherweise über diesen Weg zur Downregulation der Transkription des HLA-G Genes kommt (Guo et al. 2005).

Kritisch anzumerken ist, dass die genaue Struktur von Promotoren häufig unklar ist, da durch die dreidimensionale Faltung des DNA-Stranges mitunter auch Regionen, die sehr weit vom Transkriptionsstartpunkt entfernt sind, regulatorisch wirksam sein können und damit formal ein Teil des Promotors sein können (de Vooght et al. 2009).

1.4 Adiponectin – DNA, Protein, Rezeptoren

Eines der vielen vom Fettgewebe produzierten Substanzen, die auch als Adipozytokine bzw. Adipokine bezeichnet werden, ist das Adiponectin (Gable et al. 2006). Dieses wurde Mitte der 90er Jahre von 4 unabhängigen Arbeitsgruppen charakterisiert (Hu et al. 1996, Maeda et al. 1996, Nakano et al. 1996, Scherer et al. 1995) und wird beim erwachsenen Menschen hauptsächlich vom weißem Fettgewebe synthetisiert (Nishida et al. 2007).

Das AdipoQ-Gen (Gene ID 9370) befindet sich auf dem Chromosom 3q27, wobei diese Region in genomweiten Linkage-Analysen in europäischen Familien mit dem T2D (Vionnet et al. 2000) bzw. Parametern des metabolischen Syndromes in Verbindung gebracht werden konnte (Kissebah et al. 2000). Das Gen umfasst 1.579 kb und beinhaltet 3 Exone, wobei der Translationsstartpunkt in Exon 2 lokalisiert ist. Die für das AdipoQ-Gen erforderliche Promotorregion beinhaltet up-stream-Sequenzen, die 5'UTR-Region sowie Intron 1 (Gu 2009), wobei gezeigt werden konnte, dass die Region von -676 bis +41 für die basale Transkriptionsaktivität ausreichend ist (Kita et al. 2005).

Das Protein selbst ist aus 244 Aminosäuren aufgebaut und lässt sich in 4 Domänen unterteilen (Nakano et al. 1996): eine aminoterminalen Signalsequenz, eine variable Region, eine kollagenähnliche Domäne sowie eine globuläre Domäne am carboxyterminalen Ende.

In der folgenden Abbildung (Abb. 2) ist die DNA-, mRNA- sowie die Proteinstruktur von Adiponectin zur besseren Veranschaulichung noch einmal graphisch dargestellt (Abb. adaptiert nach Gu 2009):

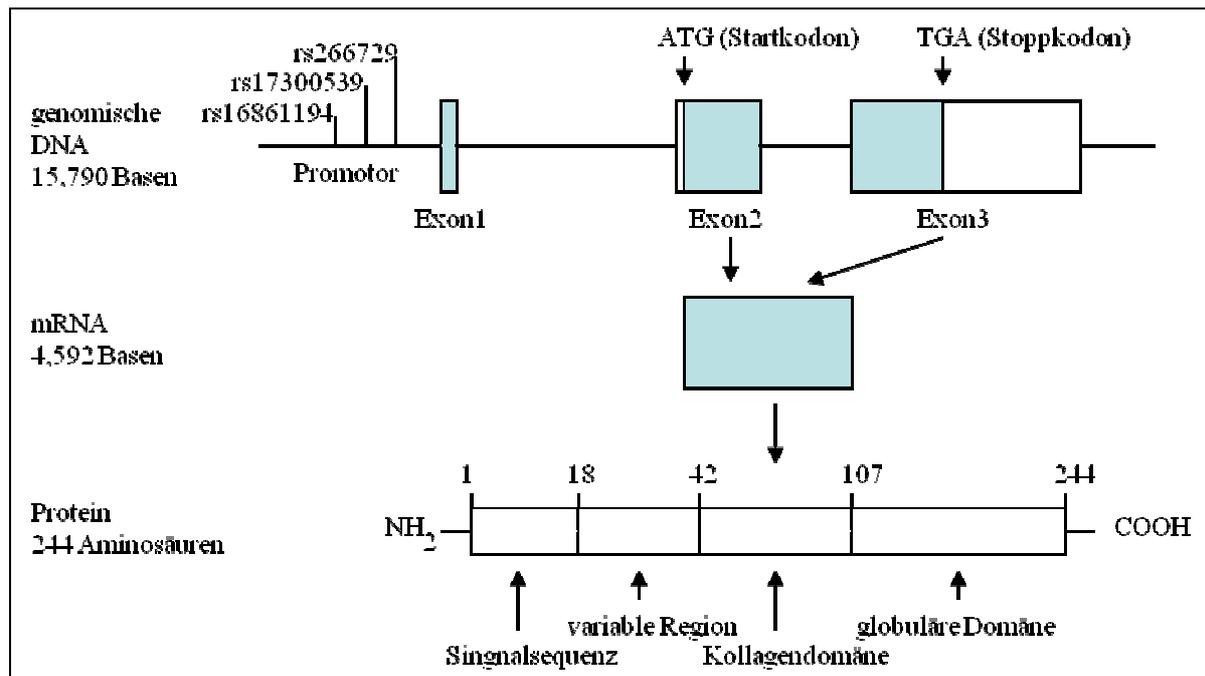


Abb. 2. Schematische Darstellung der Struktur der genomischen DNA, mRNA sowie des Proteins von Adiponektin (Abb. adaptiert nach Gu 2009); Erklärung im Text

Adiponektin kommt im humanen Plasma in seiner monomeren Form nicht vor, sondern assoziiert via Disulfidbrückenbindungen im Bereich der Kollagendomäne zu Multimeren, wobei die Grundstruktur ein Homotrimer mit einem niedrig molekularen Gewicht [LMW-Adiponektin (Low Molecular Weight)] bildet. Diese Trimere, deren Formation via hydrophobe Interaktionen im Bereich der globulären Domäne zustande kommt, assoziieren zu größeren Komplexen, wobei hier zwischen Hexameren mit einem mittleren molekularen Gewicht [MMW-Adiponektin (Medium Molecular Weight)] sowie hochmolekularen Komplexen [HMW-Adiponektin (High Molecular Weight)] unterschieden wird, welche aus 4-6 Homotrimeren bestehen (Wang et al. 2006). Diese Formen werden auch als full-length Adiponektin bezeichnet.

Auch lassen sich geringe Mengen von schmalen Fragmenten, welche die globuläre Region (gAd) beinhalten und möglicherweise via Spaltung durch die Leukozytenelastase entstehen, im humanen Plasma nachweisen (Fruebis et al. 2001, Waki et al. 2005).

Weitere posttranslationale Modifikationen im Bereich der kollagenen Domäne umfassen Hydroxylierungen, Glykosylierungen (Wang et al. 2002) sowie Succinationen (Frizzell et al. 2009).

Diesen posttranslationalen Modifikationen wird eine unterschiedliche biologische Aktivität zugeschrieben, wobei die verschiedenen Isoformen in Abhängigkeit vom Zielgewebe jeweils unterschiedliche biologische Effekte bewirken (Wang et al. 2008).

Im Gegensatz zum Plasma ist die Verteilung der Multimere im ZNS eine andere. So konnten Kusminski et al. im humanen Liquor Trimere und Hexamere, nicht jedoch HMW-Adiponectin detektieren, möglicherweise bedingt durch das hohe Molekulargewicht der HMW-Form, welches die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann (Kusminski et al. 2007).

Bisher sind 2 transmembranäre Rezeptoren bekannt, über die Adiponectin seine metabolischen Wirkungen entfaltet: dies ist zum einen der Adiponectinrezeptor 1 (AdipoR1) sowie zum anderen der Adiponectinrezeptor 2 (AdipoR2). *In vitro* Untersuchungen im Mausmodell kamen zu dem Ergebnis, dass der AdipoR1 ubiquitär, jedoch vorrangig im Skelettmuskel (SM) expremiert ist und eine hohe Affinität zu globulärem Adiponectin (gAD) in Verbindung mit einer niedrigen Affinität zu full-length Adiponectin aufweist, während der AdipoR2 in erster Linie in Hepatozyten expremiert ist und eine intermediäre Affinität zu gAD sowie full-length Adiponectin aufweist (Yamauchi et al. 2003a).

In vitro Untersuchungen im humanen Skelettmuskel ergaben im Vergleich zum Mausmodell eine weniger differenzierte Verteilung der Adiponectinrezeptoren. Hier ließen sich sowohl der AdipoR1 als auch der AdipoR2 im Skelettmuskel nachweisen (Civitarese et al. 2004). Weiterhin ist der AdipoR2 in humanen Hepatozyten expremiert (Kaser et al. 2005). Beide Rezeptoren konnten auch in pankreatischen β -Zellen von Mensch und Ratte (Kharroubi et al. 2003) sowie der AdipoR2 im humanen Fettgewebe (Civitarese et al. 2004) nachgewiesen werden. Auch sind beide Adiponectinrezeptoren im Hypothalamus von Maus (Kubota et al. 2007) und Mensch (Kos et al. 2007) expremiert sowie in den Endothelzellen des ZNS [Mausmodell], (Spranger et al. 2006). Aktuellere Daten zeigen, dass die Adiponectinrezeptoren im menschlichen Körper ubiquitär vorkommen, wobei die Dichte dieser in Abhängigkeit vom Gewebe variiert (Yanai et al. 2005, <http://www.genecards.org>).

Die Arbeitsgruppe um Lodish zeigte weiterhin, dass HMW- und MMW- Adiponectin mögliche Liganden für den T-Catherin-Rezeptor sind (Hug et al. 2004).

1.5 Adiponectin, Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus

Mittlerweile hat sich die Rolle des Fettgewebes als endokrines Organ, welches in die Physiopathologie des T2D involviert ist, fest etabliert (Hivert et al. 2008a).

Adiponectin zirkuliert im humanen Plasma mit einem geschätzten Anteil von 0,01% am gesamten Plasmaprotein in einer bemerkenswert hohen Konzentration (Weyer et al. 2001), wobei die zirkulierenden Spiegel bei Adipositas paradoxerweise erniedrigt sind (Arita et al.

1999, Weyer et al. 2001). Auch die Art der Fettverteilung hat einen Einfluss: so lassen sich bei Vorliegen einer androiden im Vergleich zu einer gynoiden Fettverteilung deutlich niedrigere Konzentrationen von Adiponectin nachweisen (Cnop et al. 2003).

Des Weiteren sind die Adiponectinspiegel negativ korreliert mit der Insulinresistenz (Bacha et al. 2004, Hivert et al. 2008a, Weyer et al. 2001) sowie dem T2D (Hotta et al. 2000, Weyer et al. 2001). Demgegenüber stehen positive Korrelationen der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel mit Surrogatparametern der Insulinsensitivität, gemessen sowohl im OGTT (Hanley et al. 2007, Tschritter et al. 2003), als auch im euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp (Tschritter et al. 2003).

Interessante Daten stammen auch von prospektiven Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass hohe Adiponectinspiegel unabhängig von anderen Einflussfaktoren vor dem späteren Auftreten eines T2D schützen (Lindsay et al. 2002, Spranger et al. 2003).

Dies konnte in einer kürzlich durchgeführten Metaanalyse mit insgesamt 14,598 Probanden bestätigt werden, in der sich weiterhin zeigte, dass der Einfluss des „schützenden“ Hormons dosisabhängig ist und in unterschiedlich ethnischen Gruppen gleichermaßen besteht, was unter Berücksichtigung des prospektiven Studiendesigns ein Hinweis dafür sein könnte, dass es sich hier nicht um einen reinen Surrogatparameter handelt, sondern dass dem Adiponectin eine kausale Rolle in der Pathogenese des T2D zukommt (Li et al. 2009). Diese kausale Rolle des Adiponectins wird weiterhin durch funktionelle Studien unter Verwendung von Tiermodellen unterstützt, wobei sich hier neben einem Einfluss von Adiponectin auf die Insulinresistenz (Combs et al. 2004, Kubota et al. 2002, Maeda et al. 2002, Nawrocki et al. 2006), zunehmend Hinweise für eine Beeinflussung der β -Zell-Funktion (Kubota et al. 2002, Lin et al. 2009, Okamoto et al. 2008, Rakatzi et al. 2004, Winzell et al. 2004, Yamauchi et al. 2003b) in der Literatur eruieren lassen. Neuere Erkenntnisse zeigen zudem auf, dass Adiponectin möglicherweise einen protektiven Effekt auf die β -Zell Masse hat (Butler et al. 2003, Rakatzi et al. 2004, Wijesakara et al. 2010, Lin et al. 2009) sowie an der Regulation des Energiehaushaltes auf zentraler Ebene beteiligt ist (Kim et al. 2007, Kubota et al. 2007, Qi et al. 2004), wobei die nachfolgenden Kapitel einen Literaturüberblick über die verschiedenen potentiellen Angriffspunkte von Adiponectin geben.

1.5.1 Adiponectin- Einfluss auf die Insulinresistenz

Wichtige Hinweise kommen von Studien an Mäusen, die durch ein Fehlen von Adiponectin gekennzeichnet sind: so zeigte die Arbeitsgruppe um Matzuzawa, dass homozygote Adiponectin-knockout (ko)-Mäuse unter einer Diät mit einem hohen Fett- und Glukoseanteil eine schwere Insulinresistenz entwickelten, wobei es nach Substitution des fehlenden Fettgewebshormones zu einer signifikanten Verbesserung der Insulinsensitivität kam (Maeda et al. 2002). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem der Arbeitsgruppe um Scherer, in dessen Studie homozygote Adiponectin-ko-Mäuse unter einer hochfetthaltigen Diät eine gestörte Glukosetoleranz (OGTT) entwickelten (Nawrocki et al. 2006).

Die o.g. Ergebnisse stehen partiell im Einklang mit dem der Arbeitsgruppe um Kadowaki und Noda, wobei hier heterozygote adiponectindefiziente Mäuse (60 %ige Reduktion des Adiponectinspiegels im Vergleich zum WT) eine milde Insulinresistenz und homozygote Adiponectin-ko-Mäuse eine moderate Insulinresistenz aufwiesen. Partiiell aufgrund dessen, dass hier keine spezielle hochkalorische Diät erforderlich wurde, um eine diabetische Stoffwechsellage zu erzielen (Kubota et al. 2002). Die Arbeitsgruppe um Chan et al. hingegen konnte keinen Unterschied in Bezug auf die Insulinsensitivität zwischen dem WT und homozygoten Adiponectin-ko-Mäusen sowohl unter normaler Ernährung, als auch unter hochfetthaltiger Diät, eruieren. Diese Unterschiede könnten eventuell durch einen unterschiedlichen genetischen Background zustande kommen (Ma et al. 2002).

Interessante Daten stammen auch von Mäusen mit transgener Überexpression: diese wiesen im Vergleich zum WT eine 3-fach höhere Konzentration des zirkulierenden Adiponectins auf. Unter einer hochfetthaltigen Diät zeigten die transgenen Mäuse im Vergleich zum WT eine signifikant verbesserte Insulinsensitivität, was für einen Schutz gegenüber einer diät-induzierten Insulinresistenz spricht (Combs et al. 2004).

Weitere Hinweise kommen von Studien an Adiponectinrezeptor-knockout (ko)-Mäusen. Hier zeigten sowohl AdipoR1/R2-knockout-Mäuse als auch AdipoR1-knockout-Mäuse im Vergleich zum WT eine signifikant gestörte Glukosetoleranz, während AdipoR2-ko-Mäuse eine normale Glukosetoleranz, jedoch erhöhte Plasmainsulinspiegel im Vergleich zum WT aufwiesen, was ein Hinweis für eine bestehende Insulinresistenz ist. Für eine Beteiligung beider Rezeptoren an der Entstehung der Störung der Glukosetoleranz spricht weiterhin, dass AdipoR1/2-double-ko-Mäuse

im Vergleich zu AdipoR1-ko-Mäusen einen höheren Insulinresistenzindex aufwiesen (Yamauchi et al. 2007).

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Studien weitere Hinweise, dass Adiponectin in Hinblick auf dem T2D eine kausale Bedeutung zukommt. Weiterführende Zellkulturexperimente lassen vermuten, dass der protektive Effekt von Adiponectin vermutlich zustand kommt, indem es auf der einen Seite die Signaltransduktion von Insulin über eine Verminderung des Triglyceridgehaltes im Gewebe verbessert (Yamauchi et al. 2001) und auf der anderen Seite die Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel erhöht (Yamauchi et al. 2002) sowie die Glukoneogenese inhibiert (Berg et al. 2001, Yamauchi et al. 2002).

1.5.2 Adiponectin und die β -Zelle

Zudem gibt es Hinweise, dass dem Adiponectin neben einem positiven Einfluss auf die periphere Insulinresistenz auch ein protektiver Effekt auf die pankreatische β -Zelle zukommt.

Um das Zusammenspiel der Zielorgane von Insulin, welches seine Wirkung hauptsächlich über den Skelettmuskel und die Leber entfaltet, in Verbindung mit der pankreatischen β -Zelle zu verstehen, muss man sich klarmachen, das Insulin das Schlüsselhormon für die Regulation des Blutzuckerspiegels ist und ein normaler Blutzuckerspiegel durch die komplexe Interaktion zwischen der Insulinwirkung und Insulinsekretion erreicht wird (Stumvoll et al. 2005). Die gesunde β -Zelle kann sich an Veränderungen der Insulinwirkung adaptieren, wobei die Beziehung beider Komponenten einer hyperbolischen Kurve folgt (Bergmann et al. 1981, Kahn et al. 1993), was bedeutet, dass das Produkt aus der Insulinsensitivität und der β -Zell-Funktion konstant ist (Kahn et al. 1993). Dieser Zusammenhang ist in der folgenden Abbildung (Abb. 3) zum besseren Verständnis noch einmal graphisch dargestellt:

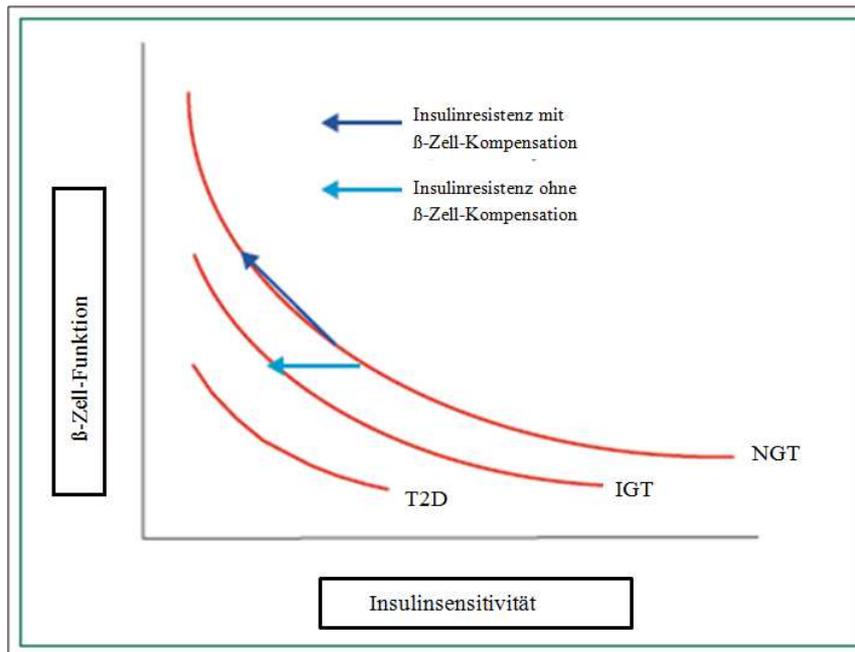


Abb. 3. Hyperbolische Beziehung zwischen der β -Zell-Funktion und der Insulinsensitivität (Abb. adaptiert nach Stumvoll et al. 2005); Erklärung s. Text, NGT: normale, IGT: gestörte Glukosetoleranz, T2D: manifestes T2D

Eine Abweichung von dieser hyperbolischen Kurve, wie es zum Bsp. bei Patienten mit einer gestörten Glukosetoleranz und einem manifesten Diabetes mellitus Typ 2 der Fall ist, tritt auf, wenn die β -Zell-Funktion für einen spezifischen Grad der Insulinsensitivität inadäquat zu niedrig ist, was die Bedeutung der β -Zell-Dysfunktion an der Entstehung des Diabetes mellitus unterstreicht (Stumvoll et al. 2005).

Hier werden neben einer genetischen Komponente verschiedene Mechanismen für die β -Zell-Dysfunktion postuliert: Glukotoxizität, Lipotoxizität, die Ablagerung von Inselamyloid sowie inflammatorische Zytokine (Stumvoll et al. 2005). Neben einer verminderten Funktion der β -Zelle spielt weiterhin eine Reduktion der β -Zell-Masse eine wichtige Rolle (Wajchenberg 2007). So konnten Butler et al., welche humanes Pankreasgewebe untersuchten, eruieren, dass adipöse Probanden mit einer gestörten Nüchternglukose bzw. einem manifesten T2D im Vergleich zu adipösen Probanden ohne eine Störung des Glukosehaushaltes, ein um 40 % bzw. 63 % reduziertes β -Zell-Volumen aufwiesen, wobei weiterführende Untersuchungen ergaben, dass eine erhöhte Apoptoserate ursächlich für diesen Unterschied war (Butler et al. 2003).

In der Tat sprechen tierexperimentelle Studien für einen Einfluss von Adiponectin auf die pankreatische β -Zelle, wobei zur besseren Übersicht zunächst auf die β -Zell-Dysfunktion und anschließend auf den Einfluss von Adiponectin auf die β -Zell-Masse eingegangen wird.

1.5.2.1 Adiponectin und β -Zell-Dysfunktion

Erste Hinweise, dass Adiponectin einen Einfluss auf die Insulinsekretion und somit auf die β -Zelle per se haben könnte, kommen von Studien an Adiponectin-knockout-Mäusen, welche nach Gabe von Glukose im Vergleich zum WT tendenziell geringere Plasmainsulinspiegel aufwiesen (Kubota et al. 2002).

Weitere Experimente, welche an gAd transgenen ob/ob Mäusen durchgeführt wurden, zeigten, dass diese Mäuse im Vergleich zu ob/ob Mäusen im Rahmen eines OGTT unter einer hochfetthaltigen Diät neben einer verbesserten Glukosetoleranz signifikant erhöhte Plasmainsulinspiegel sowie ebenfalls einen höhere Insulinmenge in den präparierten Inselzellen aufwiesen. (Yamauchi et al. 2003b).

Hier konnte die Arbeitsgruppe um Kadowaki einen signifikanten Effekt von Adiponectin auf die Insulinsekretion sowohl in isolierten Inselzellen der Maus als auch in vivo an C57BL/6 Mäusen bei einer Glukosekonzentration von 5,6 mmol/l nachweisen. Weiterführende in vitro Experimente zeigten, dass der Effekt von Adiponectin bedingt war durch eine gesteigerte Exozytose von Insulin und dass dieser bei höheren Glukosekonzentrationen nicht nachweisbar war (Okamoto et al. 2008).

Die Arbeitsgruppe um Häring konnte jedoch an humanen gesunden Inselzellen keinen Einfluss von Adiponectin sowohl auf die basale, als auch auf die glukosestimulierte Insulinsekretion aufzeigen. Weiterhin konnte dieses Ergebnis in vivo (65 gesunde Probanden) bestätigt werden (Staiger et al. 2005).

Winzell et. al hingegen konnten an insulinresistenten Mäusen (C57BL/6J Mäuse unter einer hochfetthaltigen Diät) aufzeigen, dass Adiponectin die Insulinsekretion aus den pankreatischen Inselzellen bei niedrigen Glukosekonzentrationen (2,8 mmol/l) hemmt und sie bei höheren Glukosekonzentrationen (16,7 mmol/l) stimuliert. Demgegenüber ließ sich kein Effekt von Adiponectin auf die Insulinsekretion in der Kontrollgruppe aufzeigen, was auf eine protektive Rolle von Adiponectin im Status der Insulinresistenz hinweisen könnte (Winzell et al. 2004).

Analog hierzu konnten Rakatzi et al. unter normoglykämischen Bedingungen keinen Einfluss von gARCP30 auf die basale Insulinsekretion sowie eine Reduktion der glukoseinduzierten

Insulinfreisetzung in INS-1 Zellen der Ratte eruieren. Jedoch konnte durch die Zugabe von gARCP30, die durch zytokin- oder palmitinsäureinduzierte Suppression der Glukose induzierten Insulinfreisetzung komplett aufgehoben werden, was ein Hinweis für einen protektiven Effekt von Adiponectin auf die zytokin- und fettsäureinduzierte β -Zell-Dysfunktion sein könnte, wie sie im Status der Insulinresistenz vorherrscht (Rakatzi et al. 2004).

Interessante Daten stammen auch von der Arbeitsgruppe um Hou, welche unter glukotoxischen Bedingungen an INS-1 Zellen aufzeigen konnten, das die Inkubation mit Adiponectin die gestörte Insulinsekretion, hervorgerufen durch die hohen Glukosekonzentrationen, signifikant verbesserte. Weiterführende Experimente ergaben, dass die Zellen, welche mit Adiponectin behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollen einen höheren Insulingehalt sowie eine gesteigerte Expression der mRNA von Insulin aufwiesen, was ein Hinweis dafür sein könnte, das Adiponectin die unter glukotoxischen Bedingungen gestörte Insulinsynthese verbessert (Lin et al. 2009).

Gegen einen protektiven Effekt von Adiponectin unter rein glukotoxischen Bedingungen spricht jedoch, das es in der Studie von Wijesakara et al. sowohl unter glukotoxischen, als auch unter normoglykämischen Bedingungen, zu einer gesteigerten Expression des Insulin-Gens in isolierten β -Zellen der Maus kam (Wijesakara et al. 2010).

Zusammenfassend stellt sich die Datenlage recht uneinheitlich dar, möglicherweise bedingt durch Differenzen im Aufbau der Experimente wie z.B. die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturen sowie differierende Glukosekonzentrationen und heterogene Expositionszeiten der Zellen mit Adiponectin. Nichts desto trotz zeigt sich ein Trend für Adiponectin, die glukosestimulierte Insulinsekretion zu steigern, insbesondere unter Bedingungen, wie sie bei T2D-Patienten vorherrschen, i.e. Insulinresistenz, hohe Glukosekonzentrationen sowie ein gestörtes Lipidprofil (Wijesakara et al. 2010).

1.5.2.2 Adiponectin und β -Zell-Masse

Hier konnte die Arbeitsgruppe von Rakatzi et al. in INS-1 Zellen der Ratte aufzeigen, dass die Inkubation mit gARCP 30 die sowohl durch gesättigte Fettsäuren (Palmitinsäure) als auch durch Zytokine (IL-1 β , IFN- γ) induzierte β -Zell- Apoptose dosisabhängig reduzierte (Rakatzi et al. 2004).

Demgegenüber steht die Studie von Staiger et al., welche unter Verwendung von humanen β -Zellen keinen signifikanten Effekt von Adiponectin auf die durch gesättigte FS (Palmitat, Stearat) induzierte Apoptose aufzeigen konnte, möglicherweise bedingt durch die hohe Konzentration der Fettsäuren, die verwendet wurde und deren toxischer Effekt den protektiven Effekt von Adiponectin maskiert hat (Staiger et al. 2005).

Dafür würde auch die Studie von Wijesakara et al sprechen, in der gezeigt werden konnte, dass unter „Hungerbedingungen“, einem anerkannten Modell für die Induktion der Apoptose, MIN6 β -Zellen sowie Einzelzellen der Maus unter Inkubation mit gAd bzw. full-length Adiponectin im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant geringere Apoptoserate aufwiesen (Wijesakara et al. 2010). Dieses Ergebnis konnte in BRIN-BD11 β -Zellen der Ratte jedoch nicht bestätigt werden (Brown et al. 2010).

Weiterhin konnten Lin et al. ebenfalls unter Verwendung von INS-1 Zellen der Ratte einen inhibitorischen Effekt von Adiponectin auf die glukotoxisch induzierte β -Zell-Apoptose nachweisen (Lin et al. 2009).

Zusammenfassend gibt es erste Hinweise dafür, dass Adiponectin einen protektiven Effekt auf die β -Zell-Masse zukommen könnte, im speziellen unter Stoffwechselbedingungen, wie sie beim T2D vorherrschen. Hier bleiben die Ergebnisse zukünftiger Studien abzuwarten.

1.5.3 Adiponectin – ZNS

Mit der Entdeckung der Adipokine sowie der Erforschung des Fettgewebshormones Leptin, welches an der zentralen Regulation des Energiehaushaltes beteiligt ist, rückte in jüngerer Zeit zunehmend Adiponectin als möglicher Regulator des Körpergewichtes auf zentraler Ebene in den Fokus der Wissenschaft.

Das Peptidhormon kommt in einer Konzentration, von 0,1 % (Kusminski et al. 2007) bzw. 0,001% (Kos et al. 2007) der Serumspiegel in der cerebrospinalen humanen Flüssigkeit vor.

Spranger et al. hingegen konnten im humanen Liquor kein Adiponectin detektieren (Spranger et al. 2006). Zum einen könnte diese Diskrepanz durch Serumverunreinigungen in den Studien von Kusminski und Kos erklärt werden. Alternativ könnten die Assays in der Studie von Spranger nicht sensitiv genug gewesen sein, um die niedrigen Spiegel im ZNS zu detektieren (Kos et al. 2007).

Bisher sind, wie bereits in Kapitel 1.4 aufgeführt, 2 Rezeptoren bekannt, über die Adiponectin seine Wirkung entfaltet, namentlich AdipoR1 und AdipoR2. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe um Kumar nachweisen, dass beide Rezeptoren im humanen Hypothalamus expremiert sind, wobei der AdipoR2 vermehrt im paraventriculären Kern vorkommt, einer Region, welche an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt ist (Kos et al. 2007). Im Einklang dazu konnte die Arbeitsgruppe um Ahima im Mausmodell mittels Fos-Immunhistochemie nachweisen, dass der paraventriculäre Kern sowie in weitaus geringerem Ausmaß der Nucleus arcuatus Zielgewebe für Adiponectin darstellen (Qi et al. 2004). Kubota et al. zeigten im Mausmodell weiterhin auf, dass beide Adiponectinrezeptoren in einer Konzentration, die in etwa der Leber entspricht, im Hypothalamus expremiert sind. Weiterhin ließen sich beide Rezeptoren, analog zu der Arbeitsgruppe um Ahima, im paraventriculären Hypothalamus sowie im Nucleus arcuatus, einer Region, welche für die Appetitregulation wichtig ist, nachweisen (Kubota et al. 2007).

Zusammenfassend konnten Adiponectinrezeptoren in Hirnregionen, welche an der Appetitregulation sowie an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt sind, nachgewiesen werden. Mögliche Hinweise die für eine zentrale Beteiligung von Adiponectin an o.g. Regulationssystemen stammen wiederum von Studien an Tieren:

Hier konnten Kubota et al. in Wildtyp-Mäusen aufzeigen, dass 3 h nach Fütterung sowohl die Serumadiponectinspiegel, als auch die Konzentration von Adiponectin in der cerebrospinalen Flüssigkeit signifikant abfiel, weiterhin kam es zu einer verminderten Expression des AdipoR1, nicht jedoch des AdipoR2 im Nucleus arcuatus. Im Hungerzustand hingegen stieg die Konzentration von Adiponectin im Serum und in der cerebrospinalen Flüssigkeit sowie die AdipoR1-Expression im Nucleus arcuatus, was ein Hinweis für eine Beteiligung von Adiponectin an der Appetitregulation sein könnte (Kubota et al. 2007).

Dafür spricht, dass es bei WT-Mäusen 3 h nach der Fütterung und i.v. Gabe von Adiponectin zu einem signifikanten Anstieg der Nahrungsaufnahme kam im Vergleich zu Mäusen, welche ein Placebo erhielten. Weiterführende Untersuchungen ergaben hier, dass dieser Effekt vermutlich über eine zentrale Aktivierung des AdipoR1 mit konsekutiver Aktivierung der AMP-Kinase sowie Acetyl-CoA-Carboxylase zustande kam (Kubota et al. 2007). Hintergrund ist, dass in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte AMP-Kinase-Aktivität die Nahrungszufuhr stimuliert (Hardie 2004, Carling 2005).

Im Einklang hiermit steht die Beobachtung, dass es bei WT-Mäusen nach intracerebroventrikulärer Gabe der hexameren Form von Adiponectin zu einer signifikant gesteigerten Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den Kontrollen kam, wobei es zudem zu einem reduziertem Sauerstoff- und Energieverbrauch kam, was neben einer appetitstimulierenden Wirkung für einen Einfluss auf den Energiehaushalt spricht (Kubota et al. 2007).

Für einen appetitstimulierenden Einfluss sowie einer Beeinflussung des Energiehaushaltes durch Adiponectin spricht ebenfalls, dass Adiponectin-knockout-Mäuse unter einer Diät mit einem hohem Fettanteil im Vergleich zu den Kontrollen signifikant weniger Nahrung zu sich nahmen. Weiterhin wiesen diese Mäuse einen höheren Sauerstoffverbrauch auf und nahmen weniger an Gewicht zu, wobei das viscerale und subcutane Fettgewebe signifikant reduziert waren (Kubota et al. 2007).

Interessante Daten stammen außerdem von der Arbeitsgruppe um Scherer, welche Experimente an Adiponectin-transgenen ob/ob Mäuse durchführten. Diese Mäuse wiesen im Vergleich zu ob/ob Mäusen 2-3 fach höhere zirkulierende Adiponectinspiegel auf, wobei die Verteilung der Multimere ähnlich war (minimal höherer Anteil an der HMW-Form). Diese Mäuse hatten ein signifikant erhöhtes Körpergewicht, wobei dieses bis auf das perikardiale Fettgewebe durch die reine Zunahme des subcutanen Fettgewebes zu erklären war. Zudem kam es unter einer hochfetthaltigen Diät zu einer weiteren konkordanten Gewichtsdiskrepanz.

Weiterführende Untersuchungen ergaben hier, dass die adiponectin-transgenen ob/ob Mäuse im Vergleich zu den ob/ob Mäusen signifikant weniger Nahrung zu sich nahmen sowie einen reduzierten Energieverbrauch aufwiesen (erniedrigte Körpertemperatur, verringerte motorische Aktivität, reduzierter O₂-Verbrauch). Im Einklang hierzu nahmen die Adiponectin-transgenen ob/ob Mäuse im Vergleich zu ob/ob Mäusen unter kalorischer Restriktion signifikant weniger an Gewicht ab, was vermuten lässt, das Adiponectin eine Rolle als „Sättigungs-Hormon“ zukommt (Kim et al. 2007).

Ebenfalls konnte die Arbeitsgruppe um Scherer an Adiponectin-transgenen (2-3 fach erhöhte zirkulierende Adiponectinspiegel) Mäusen zwar nach einem Jahr eine Zunahme des Körpergewichtes beobachten, wobei hier im Vergleich zu den Kontrollen vorrangig eine Expansion des braunen Fettgewebes in der Interscapularregion und im Bereich der Orbita zu verzeichnen war. Diese phänotypischen Veränderungen waren jedoch nicht mit einer

Veränderung des Nahrungsverhaltens oder des Energieverbrauches assoziiert (Combs et al. 2004).

Im Gegensatz dazu nahmen die Mäuse der Arbeitsgruppe um Ahima nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Adiponectin signifikant an Gewicht ab. Hier kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Nahrungsaufnahme, jedoch zu einem erhöhten Energieverbrauch (Qi et al. 2004).

Zusammenfassend gibt es erste Hinweise für einen Einfluss von Adiponectin auf zentraler Ebene, wobei die bisherigen Ergebnisse nicht einheitlich sind, möglicherweise bedingt durch die Verwendung von divergierenden Mausmodellen. Hier bleiben die Resultate zukünftiger Studien abzuwarten.

1.6 Einfluss genetischer Varianten im AdipoQ-Gen auf die zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel und den Typ 2 Diabetes mellitus

Die oben beschriebenen protektiven Effekte von Adiponectin auf den T2D sowie die bereits erwähnte Lokalisation des AdipoQ-Gen in einer Region, die mit dem Typ 2 Diabetes mellitus sowie Parametern des metabolischen Syndroms assoziiert ist, haben die Hypothese aufkommen lassen, dass genetischen Variationen im AdipoQ-Gen eine Bedeutung in Hinblick auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel sowie dem T2D zukommen könnte. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch unterstützt, dass Schätzungen ergeben haben, dass die Variation der Plasmadiponectinspiegel zu einem Anteil von ca. 46-70% durch hereditäre Faktoren bestimmt wird (Comuzzie et al. 2001, Pollin et al. 2005, Vasseur et al. 2002) und es zudem Hinweise gibt, dass genetische Variationen im AdipoQ-Gen selbst an der Modulation der Spiegel beteiligt sein könnten, wobei diese sowohl unter Einbeziehung von epidemiologischen Studien (Heid et al. 2006, Laumen et al. 2009) als auch von funktionellen Experimenten (Bouatia-Naji et al. 2006, Laumen et al. 2009) gewonnen werden konnten.

Eine Reihe von Studien hat mittlerweile Assoziationen von genetischen Variationen im AdipoQ-Gen sowohl mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln als auch mit einem bestehenden T2D bzw. Surrogatparametern des Glukosestoffwechsels gezeigt, wobei sich die Ergebnisse aus

den bereits in Kapitel 1.2.2.1 genannten Gründen oftmals nicht replizieren lassen konnten und es somit die bisherige Datenlage nicht zulässt, klare Schlussfolgerungen zu ziehen (Menzaghi et al. 2007).

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über häufig untersuchte genetische Variationen und deren Lage im AdipoQ- Gen (Abb. adaptiert nach Menzaghi et al. 2007):

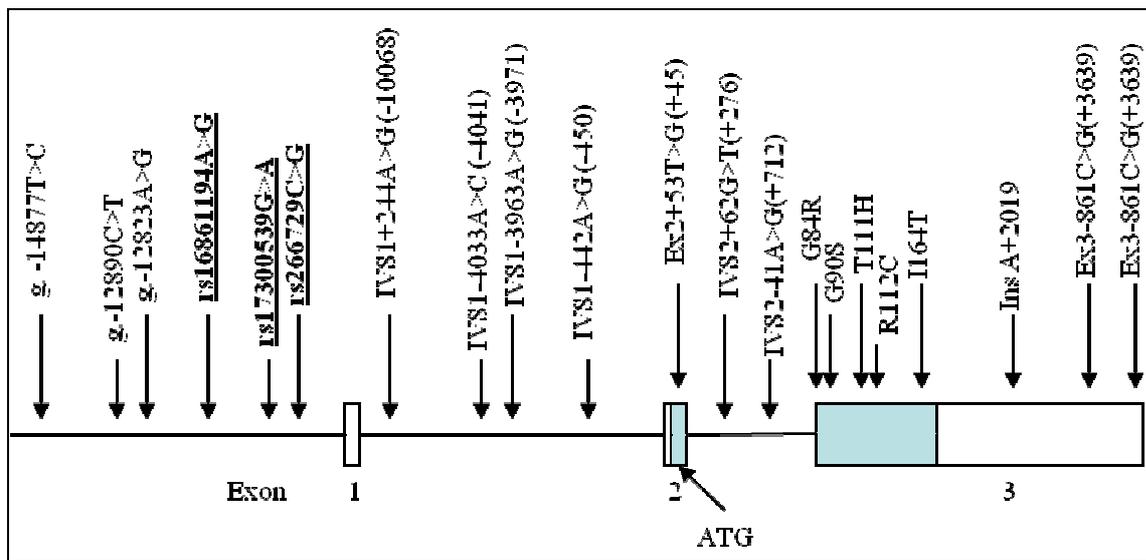


Abb. 4. Schematische Darstellung genetischer Variationen und deren Lage im AdipoQ-Gen (Abb. adaptiert nach Menzaghi et al. 2007) Die Nummern beschreiben die Lage der Varianten relativ zum Adenin des Startcodons ATG. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen sind hervorgehoben (fett und unterstrichen). Blau hervorgehoben sind die Teile des AdipoQ-Gens, welche transkribiert werden.

1.7 Ziele der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten ließ sich ein epidemieartiger Anstieg der Prävalenz der Adipositas und konsekutiv auch der Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 verzeichnen. Und diese Tendenz hält weiter an. Diese Entwicklung hat erhebliche Folgen für jedes einzelne betroffene Individuum und die Therapie ist gleichzeitig eine der großen gesundheitspolitischen sowie ökonomischen Herausforderungen unserer Zeit.

Erniedrigte Plasmakonzentrationen von Adiponectin lassen sich sowohl beim Typ-2-Diabetes als auch bei Adipositas finden, wobei der zirkulierende Adiponectinspiegel mittlerweile als prädiktiver Biomarker in Bezug auf den T2D etabliert ist. Zudem impliziert die Datenlage, dass dem Adiponectin eine kausale Rolle in der Pathogenese des T2D zukommt.

Des Weiteren sind genetische Variationen im AdipoQ-Gen, welches sich auf dem Chromosom 3q27 befindet, einer Region, welche im Rahmen von genomweiten Linkageanalysen im europäischen Raum mit dem Typ 2 Diabetes mellitus bzw. Parametern des metabolischen Syndromes in Zusammenhang gebracht wurde, vermutlich direkt an der Modulation der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel beteiligt. Hier konnten bereits zahlreiche Studien Assoziationen zwischen Varianten im AdipoQ-Gen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln und/oder mit dem T2D bzw. Parametern des Glukosestoffwechsels nachweisen. Diese Studien führten jedoch bisher, nicht zuletzt aufgrund des heterogenen Studiendesigns, zu diskrepanten Ergebnissen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung des Stellenwertes der bereits bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen rs266729, rs17300539, rs16861194 in der Promotorregion des AdipoQ-Gens. Die SNPs wurden in 2 unabhängigen europäischen Studienkohorten einer Region (Berlin/Brandenburg) in Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

- 1. Besteht eine Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen und den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln?*
- 2. Besteht eine Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen und dem Diabetes mellitus Typ 2?*

Zur Beantwortung dieser Frage wurde zum einen eine eingebettete Fall-Kontroll-Studie der EPIC-Potsdam-Kohorte (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)

herangezogen, welche sich zum Zeitpunkt der praktischen Arbeit dieser Dissertation aus 187 Typ 2 Diabetikern sowie aus 376 Kontrollen zusammensetzte.

Um die Ergebnisse replizieren zu können, erfolgte die Untersuchung dieser Fragen zusätzlich in der unabhängigen MeSy-BePo-Kohorte* (Metabolisches Syndrom Berlin-Potsdam), die zum Zeitpunkt der Dissertation 2031 Probanden umfasste.

Im Rahmen der MeSy-BePo-Kohorte konnte aufgrund der Diagnosesicherung des T2D durch den OGTT (oraler Glukosetoleranztest) ergänzend die Beantwortung folgender Fragestellungen erfolgen:

- 3. Besteht eine Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen und dem Diabetes mellitus Typ 2 unter Einbeziehung seiner Vorstufen [gestörte Nüchtern glukose (IFG), gestörte Glukosetoleranz (IGT)]?**
- 4. Besteht eine Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen und Indizes des Glukosemetabolismus?**

* Partielle Verwendung der Daten aus : Genetische und metabolische Regulation von Adiponectin: Resultate von *in vitro* und humanen *in vivo* Studien. Uta Elke Wegewitz 2007.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Methoden Probanden

2.1.1 Charakterisierung der EPIC-Potsdam Kohorte

Im Potsdamer Studienteil der European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study (EPIC-Potsdam), wurde eine eingebettete Fall-Kontroll-Studie etabliert, um anhand dieser zu eruieren, welche Faktoren die Entstehung eines Typ 2 Diabetes vorhersagen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob ein oder mehrere Polymorphismen im AdipoQ-Gen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln und/oder dem inzidenten T2D assoziiert sind. Die Potsdamer Kohorte umfasst 27,548 Teilnehmer [Männer (40-64 Jahre) und Frauen (35-64) Jahre], welche in dem Zeitraum zwischen August 1994 und September 1998 rekrutiert worden sind. Die Auswahl der Studienteilnehmer erfolgte nach einem Zufallsverfahren aus den Einwohnermelderegistern von Potsdam und Umgebung, wobei diese via E-mail informiert wurden. Die Teilnehmerrate lag bei 22,7%. Es konnten allerdings auch interessierte Personen, die sich von sich aus gemeldet haben, an der Studie teilnehmen. Die Probanden bekamen 2 selbst auszufüllende Fragebogen zugesandt, wo sie ihre Ernährungs- und Lebensgewohnheiten einschätzen sollten und nahmen an einem PC-gestützten Interview teil. Dieses diente sowohl zur Erfassung ihrer Lebensgewohnheiten als auch zur Erhebung ihrer medizinischen Anamnese. Des Weiteren erfolgten anthropometrische Messungen (Größe, Gewicht, Hüft- und Taillenumfang) sowie eine venöse Blutentnahme. Im Zuge der Nachbeobachtung bekamen die Studienteilnehmer nach 2 Jahren einen Fragebogen zugesandt, mit dessen Hilfe man potentielle Fälle eines neu aufgetretenen T2D identifizierte. Die Teilnehmerrate lag hier bei 96%.

Die Diagnose dieser Stoffwechselerkrankung wurde durch den behandelnden Arzt des Probanden verifiziert, so dass nur Teilnehmer mit einem medizinisch gesicherten Diabetes mellitus Typ 2 in die Studie aufgenommen wurden. Nachdem potentielle Fälle eines Diabetes mellitus Typ 1 via Bestimmung der Autoantikörper GAD 65 und IA-2 ausgeschlossen wurden, ergaben sich 192 Fälle mit einem medizinisch gesicherten T2D. Jedes Individuum wurde anschließend mit 2 Kontrollen aus der Basiskohorte nach Alter und Geschlecht gematcht. Probanden mit fehlenden Angaben, die für die sich anschließende statistische Auswertung notwendig waren, wurden aus der vorliegenden Studie ausgeschlossen, so dass diese letztendlich 187 Fälle und 376 Kontrollen umfasste. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg, Deutschland.

2.1.1.1 Blutentnahme und Labordiagnostik

Bei jedem Probanden erfolgte in der Rekrutierungsphase der Studie eine peripher-venöse Nüchtern-Blutentnahme in Citrat- und EDTA- haltigen Monovetten. Die Analyse der Blutparameter erfolgte in durch Zentrifugation (1000 x g für 10 Minuten bei 4°C) separiertem Serum bzw. EDTA-Plasma, welches bei -80 °C aufbewahrt wurde.

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins (ABX Pentra Cholesterol CP, ABX Diagnostics, Bedfordshire, UK) erfolgte kolorimetrisch (COBAS MIRA, Roche Diagnostics, Mannheim, D). Ebenso erfolgte die Bestimmung des HDL (ABX Pentra HDL Direct CP, ABX Diagnostics, Bedfordshire, UK) sowie der Triglyceride (ABX Pentra Triglycerides CP, ABX Diagnostics, Göppingen, D) nach diesem Verfahren. Die Cholesteroloratio errechnete sich aus dem Quotienten von Gesamtcholesterol und LDL.

Für die Berechnung des LDL kam anschließend die Friedewald-Formel zur Anwendung (Friedewald et al. 1972):

$$\text{Cholesterol} - \text{Ratio} = \frac{\text{Gesamtcholesterin}[\text{mmol} / \text{l}]}{\text{HDL}[\text{mmol} / \text{l}]}$$

$$\text{LDL}[\text{mmol} / \text{l}] = \text{Chol}[\text{mmol} / \text{l}] - \frac{\text{TG}[\text{mmol} / \text{l}]}{2,2} - \text{HDL}[\text{mmol} / \text{l}]$$

Die Bestimmung des Plasmaadiponectinspiegels erfolgte mittels Radio-Immunoassay [Linco Research, USA (Intra-Assay-Variationskoeffizient 0,1-6,2%, Inter-Assay-Variations-koeffizient 5,0%)]. Ebenfalls erfolgte die Bestimmung der Diabetes mellitus Typ 1 assoziierten Autoantikörper GAD 65 und IA-2 mittels Radio-Immunoassay (Medipan Diagnostica, Selchow, D), während für die HbA1c-Bestimmung ein Enzym-Immunoassay (DAKO Diagnostica, Hamburg, D) verwendet wurde.

2.1.1.2 Anthropometrie

Die anthropometrischen Messungen umfassten die Bestimmung der Körpergröße, des Körpergewichtes sowie des Hüft- und Taillenumfanges. Alle Messungen wurden in Unterwäsche und ohne Schuhe durch geschultes Personal vorgenommen.

Körpergröße, Körpergewicht und BMI

Die Erfassung der Körpergröße erfolgte mit einem flexiblen Anthropometer bis auf 0,1 cm genau (GBM Anthropometer, Silber & Hegner, Zürich, CH). Für die Bestimmung des Körpergewichtes wurde eine digitale Waage (Soehnle, Typ 7720/23, Murrhardt, Deutschland), welche auf ± 100 g geeicht war, verwendet. Der BMI wurde folgendermaßen berechnet:

$$BMI [kg / m^2] = \frac{\text{Körpergewicht} [kg]}{\text{Körpergröße} [m^2]}$$

Die in folgender Tabelle dargestellte Klassifizierung des BMI erfolgte anhand der Richtlinien der WHO 2000².

Tab. 1. Klassifizierung des BMI nach den Kriterien der WHO 2000

Gewichtsklassifizierung	BMI (kg/m²)
Untergewicht	< 18,50
Normalgewicht	18,50 – 24,99
Präadipositas ¹	25,00 – 29,99
Adipositas Grad I ¹	30,00 – 34,99
Adipositas Grad II ¹	35,00 – 39,99
Adipositas Grad III ¹	$\geq 40,00$

¹ Übergewicht ≥ 25 kg/m²

Hüft-, Taillenumfang und WHR

Diese Messungen erfolgten in der stehenden Position. Der Hüftumfang wurde an den breitesten Punkten oberhalb der großen Trochanteres majores bestimmt, während der Taillenumfang in der Mitte zwischen dem untersten Rippenansatz und den Spinae iliacae anteriores superiores bestimmt wurde. Beide Messungen wurden streng horizontal mit einem Maßband vorgenommen. Die Waist to Hip Ratio (WHR) wurde folgendermaßen errechnet:

$$WHR = \frac{\text{Taillenumfang} [cm]}{\text{Hüftumfang} [cm]}$$

² Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.

2.1.1.3 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte mit einem oszillometrischen Blutdruckmessgerät [BOSO. Oscillomat® (Bosch & Sohn, Jungingen, Deutschland)], welches auf ± 1 mm Hg geeicht war. Sie erfolgte weiterhin im Sitzen am unbedeckten rechten Arm, welcher sich in Herzhöhe befand sowie nach einer Ruhephase von 15-30 Minuten. Während den Messungen durfte außerdem nicht geredet werden. Es wurden 3 aufeinander folgende Blutdruckmessungen in einem Abstand von 2 Minuten vorgenommen und der Mittelwert aus dem zweiten und dritten gemessenen Wert gebildet.

Dieses Vorgehen liegt darin begründet, dass wenn man nur den zuerst gemessenen Wert berücksichtigt, der mittlere Blutdruck sowie die Prävalenz der Hypertonie überschätzt werden. Zwischen dem 2. und 3. gemessenen Wert bestehen allerdings im Vergleich zu dem 1. und 2. Blutdruckwert nur sehr schmale Differenzen. In Anbetracht der Tatsache jedoch, dass die Reproduzierbarkeit des gemessenen Blutdruckes mit der Zahl der durchgeführten Messungen zunimmt, erscheint es am sinnvollsten, den 2. und 3. Wert gemeinsam zu berücksichtigen (Schulze et al. 2000).

2.1.2 Charakterisierung der MeSy-BePo-Kohorte (Metabolisches Syndrom Berlin-Potsdam)

Die MeSyBePo-Studie wurde im Jahre 2001 initiiert, um Zusammenhänge hinsichtlich genetischer Muster und Phänotypvarianten in Bezug auf das metabolische Syndrom und anderer Adipositas-assoziiierter Erkrankungen zu erforschen, wobei hier der Schwerpunkt auf den T2D sowie Herz-Kreislauf-Erkrankungen gesetzt wurde.

Vom Studiendesign handelt es sich um eine fortlaufende Querschnittsstudie, wobei die Probanden mit einem Mindestalter von 18 Jahren aus dem Raum Berlin und Brandenburg rekrutiert wurden. Hierbei wurde die Bevölkerung in Form von lokalen Zeitungsannoncen, Informationsbroschüren in Apotheken und Arztpraxen sowie über das Internet auf die Studie aufmerksam gemacht.

Zum Zeitpunkt dieser Dissertation waren 2031 Probanden in die Studie eingeschlossen. Am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE) in Potsdam Rehbrücke (Abteilung Klinische Ernährung) sowie an der Charité- Campus Benjamin Franklin (C-CBF) in Berlin (Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin) wurde bei den Probanden eine ausführliche Eigen- sowie Familienanamnese durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte, wie auch im EPIC-Kollektiv, eine venöse Blutentnahme, eine Blutdruckmessung sowie die Erfassung

anthropometrischer Parameter (Größe, Gewicht, Hüft- und Taillenumfang) durch geschultes Personal. Das Vorgehen zur Erfassung der anthropometrischen Daten sowie des Blutdruckes erfolgte analog zum EPIC-Kollektiv (s. Kap. 2.1.1.2 und 2.1.1.3).

Ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) aus kapillärem Vollblut wurde zur Charakterisierung des Glukosemetabolismus durchgeführt. Bei einigen Probanden konnte nach besonderer Einwilligung eine Messung der Insulinsensitivität im euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp vorgenommen werden, was die Validierung der Daten aus dem OGTT ermöglichte. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Landesärztekammern von Berlin und Brandenburg sowie durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

2.1.2.1 Blutentnahme und Bestimmung der Laborparameter

Analog zum EPIC-Kollektiv erfolgte bei den Probanden eine peripher-venöse Blutabnahme sowie die anschließende Zentrifugation und Lagerung unter den bereits in Kapitel 2.1.1.1 genannten Bedingungen. Die Ermittlung folgender Laborparameter erfolgte ebenfalls analog zum EPIC-Kollektiv: Gesamtcholesterin, HDL, TG, LDL.

Die Bestimmung des Adiponektinspiegels im Serum erfolgte mittels ELISA [Biovendor, Nashville, USA (Intra-Assay-Variationskoeffizient 6,4-7%, Inter-Assay-Variationskoeffizient 7,3-8,2%)].

Die Bestimmung des HbA1c erfolgte mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Menari Dignostics, Neuß, D).

2.1.2.2 Oraler Glukosetoleranztest (OGTT) – Durchführung

Im Vergleich zum EPIC-Kollektiv konnte bei den Probanden des MeSy-BePo-Kollektives ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt werden, wodurch eine spezifischere Charakterisierung des Glukosestoffwechsels möglich war.

Bei den Studienteilnehmern wurde nach einer Nahrungskarenzzeit von 10 h zunächst die Nüchternglukose bestimmt, indem 20 µl kapilläres Vollblut aus dem Ohrläppchen entnommen wurden, um anschließend im Analysator „Super GL“ [Dr. Müller, Gerätebau GmbH, Freital, D (Variationskoeffizient < 1,5% (24 Proben))] nach der Glukoseoxidasemethode bestimmt zu werden.

Die Probanden bekamen nun eine 300 ml Trinklösung (Accu-Check® Dextro® O.G.T.) der Firma Roche, Grenzach-Wylen, Deutschland, zu trinken, was einer Menge von 75 g wasserfreier

Glukose entspricht. Der unmittelbare Beginn der Trinkaufnahme wurde als Zeitpunkt 0 definiert, wobei die Probanden zu einer möglichst zügigen Aufnahme (5 Minuten) angehalten wurden. Weitere Blutentnahmen (kapillär, venös) erfolgten nach 30, 60, 90, 120 sowie 180 Minuten, wobei kapilläres Vollblut zur Bestimmung der Blutglukose diente, venöses Vollblut hingegen wurde entnommen, um nach entsprechender Aufbereitung der Proben den Seruminsulinspiegel mittels Elisa [Mercodia AB, Uppsala, Schweden (Intra-Assay-Variationskoeffizient 2,8-4,0%, Inter-Assay-Variationskoeffizient 2,6-3,6%)] zu bestimmen.

Die Auswertung der Daten des OGTT erfolgte bei Initialisierung der Studie im Jahre 2001 nach den Kriterien der WHO von 1999³, welche der folgenden Tabelle (Tab. 2) zu entnehmen sind:

Tab. 2. Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus und seiner Vorstufen nach WHO 1999

Diagnose	Zeitpunkt 0 OGTT ¹		Zeitpunkt 2h OGTT ¹
NGT	< 100 mg/dl		< 140 mg/dl
IFG	≥ 100 mg/dl	oder	< 140 mg/dl
IGT ³	< 110 mg/dl	und	≥ 140 mg/dl
T2D ²	≥ 110 mg/dl	oder	≥ 200 mg/dl

*1: Werte gelten für kapilläres Vollblut, 2: Bestätigung der Diagnose durch Messung an 2 unterschiedlichen Tagen, 3: Diagnose nur bei Vorliegen der Werte für Zeitpunkt 0 und Zeitpunkt 2 h, NGT: normale Glukosetoleranz, IFG: gestörte Nüchternglukose, IGT: gestörte Glukosetoleranz, T2D: manifester T2D

Bei Probanden mit einem bereits diagnostiziertem Diabetes mellitus erfolgte anstelle des OGTT die Bestimmung der Nüchternglukose sowie des Nüchterninsulinspiegels.

Ebenfalls erfolgte, analog zum EPIC-Kollektiv, die Bestimmung der GAD 65 sowie IA-2 Autoantikörper, um Probanden mit einem Diabetes mellitus Typ 1 zu erkennen (s. Kap. 2.1.1.1).

2.1.2.3 Glukosemetabolismus - Indizes

Folgende Indizes ließen sich aus den Messungen der Blutzucker- sowie Insulinspiegel vor und während des OGTT zur Charakterisierung der Insulinsensitivität bzw. Insulinsekretion errechnen:

³ World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, World Health Org. 1999.

Bestimmung der Insulinsensitivität

Beim euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp handelt es sich um den sogenannten „Goldstandard“ zur Bestimmung der Insulinsensitivität, welcher erstmals 1979 von *DeFronzo* und seinen Mitarbeitern beschrieben wurde (DeFronzo et al. 1979). Der mit Hilfe dieser Untersuchung errechenbare M-Wert (die sogenannte Glukoseutilisationsrate) erlaubt eine gute Abschätzung der individuellen Insulinsensitivität und errechnet sich folgendermaßen:

M-Wert = Glukose (mg)/min/kg Körpergewicht

Da es sich hierbei um eine sehr zeit- und kostenintensive Methode handelt, haben *Stumvoll* und seine Arbeitsgruppe mehrere Indizes zur Bestimmung der Insulinsensitivität berechnet, die zum Teil sehr gut mit dem M-Wert korrelieren, jedoch mit Hilfe der praktikableren Methode des OGTT errechnet werden können (Stumvoll et al. 2000). Im Rahmen dieser Dissertation kam folgender Index nach *Stumvoll* zur Anwendung:

$$ISI_S = 0,157 - 4,576 \times 10^{-5} \times Ins_{120} - 0,00519 \times Gluc_{90} - 0,000299 \times Ins_0$$

ISI_S : Insulinsensitivitätsindex nach Stumvoll

$Ins_{0,120}$: Insulin zum Zeitpunkt 0, 120 min

$Gluc_{90}$: Glukose zum Zeitpunkt 90 min (Stumvoll et al. 2000)

Dieser Index wurde gewählt, da in einer Subgruppe von 56 gesunden Probanden aus dem MeSy-BePo-Kollektiv, an denen ein euglykämisch-hyperinsulinämischer Clamp durchgeführt wurde, dieser am besten mit dem M-Wert korrelierte [$r = 0,591$; $p < 0,001$]; (Fischer et al. 2008).

Bestimmung der hepatischen Insulinsensitivität und der β -Zell-Funktion –Homeostasis Model Assessment [HOMA_{IR}]

Beim sogenannten „Homeostasis Model Assessment“ [HOMA_{IR}] handelt es sich um ein im Jahre 1985 von *Matthews* und seiner Arbeitsgruppe entwickeltes mathematisches Modell, um die hepatische Insulinsensitivität und partiell die β -Zellfunktion abzuschätzen.

Hierbei gehen in die Berechnung das Nüchterninsulin sowie die Nüchternplasmaglukose mit ein, wobei *Matthews et al.* bei der Entwicklung dieses Modells annahmen, dass normalgewichtige Probanden unter 35 Jahren eine β -Zellfunktion von 100 % sowie eine Insulinresistenz von 1 aufweisen (*Matthews et al.* 1985):

$$HOMA_{IR} = \frac{I_0}{(22,5e^{-\ln G_0})}$$

I_0 : Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)

G_0 : Nüchternglukosekonzentration (mmol/l)

Die physiologische Basis dieses mathematischen Modells beruht auf dem Prinzip der Rückkopplung zwischen der Leber und der β -Zelle, was im engeren Sinn bedeutet, dass die basale Plasmaglukosekonzentration via insulinabhängiger hepatischer Glukoseproduktion reguliert wird, während der Insulinspiegel abhängig ist von der Antwort der β -Zelle auf die Glukosekonzentration (*Wallace et al.* 2004).

Somit eignet sich der HOMA_{IR} hauptsächlich zur Abschätzung der hepatischen Insulinsensitivität, wobei partiell die β -Zell-Funktion mit erfasst wird (*Matthews et al.* 1985).

Bestimmung der Insulinsekretion

Der hyperglykämische Clamp ist eine etablierte Methode, um die Insulinsekretion abschätzen zu können (*Mitrakou et al.* 1992).

Analog zur Bestimmung der Insulinsensitivität haben *Stumvoll* und seine Mitarbeiter bei 104 Freiwilligen, nicht an T2D erkrankten Probanden, diese aufwendige Untersuchung durchgeführt, wobei diese auch einem OGTT unterzogen wurden (*Stumvoll et al.* 2000). Von den von *Stumvoll* untersuchten Indizes spiegelte das Verhältnis der Fläche unter der Insulinkurve zur Fläche unter der Glukosekurve (AUC_{ins} / AUC_{gluc}) aus den Daten des OGTT am besten die bestimmte Insulin-

sekretion aus dem hyperglykämischen Clamp wieder (s. Tab. 3). Da die Probanden der Kohorte von *Stumvoll* ähnliche Charakteristika wie die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Probanden der MeSy-BePo-Kohorte aufwiesen, (erwachsene Personen, europäische Herkunft) erschien die Anwendung dieses Index sinnvoll.

Tab. 3. Ergebnisse der Ermittlung eines repräsentativen Index für die Insulinsekretion (Tab. adaptiert nach Stumvoll et al. 2000)

	1stPH _{est} OGTT	2ndPH _{est} OGTT	Secr. _{HOMA}	Δ Ins ₃₀	Δ Ins ₃₀ / Gluc ₃₀	Δ Ins ₃₀ / Δ Gluc ₃₀	AUC _{ins} / AUC _{gluc}
1st PH (clamp)	0,78 ¹	0,78 ¹	0,57 ¹	0,63 ¹	0,66 ¹	0,25 ²	0,71 ¹
2nd PH (clamp)	0,79 ¹	0,79 ¹	0,62 ¹	0,59 ¹	0,60 ¹	0,221 ³	0,73 ¹

*einfache lineare Korrelation: ¹ p<0,0005; ² p<0,01; ³ p< 0,05

1st PH (clamp): Summe der Plasmainsulinkonzentration zu den Zeitpunkten 2,5; 5; 7,5 und 10 min. des hyperglykämischen Clamps abzüglich der mittleren basalen Plasmainsulinkonzentration

2nd PH (clamp): durchschnittliche Plasmainsulinkonzentration während der letzten Stunde des hyperglykämischen Clamps nach Erreichen des Insulinplateaus abzüglich der mittleren basalen Plasmainsulinsekretion

2.2 METHODEN – GENOTYPISIERUNG

2.2.1 Darstellung der Polymorphismen – Ein Überblick

Die DNA-Isolation aus Vollblut erfolgte unter Verwendung des AGOWA® mag Maxi DNA Isolation Kit (4x72) in Verbindung mit dem softwaregesteuertem Magnetseparator AGOWA® sep 9600 und einem im Verlauf eingeführten Pipettierroboter (Personal Lab, Fa. Adaltis, Freiburg, D). Diese Form der DNA-Isolation basiert auf dem Prinzip der Magnetseparation, wobei die spezifische Bindung der DNA an bestimmte Magnetpartikel genutzt wird. Im Anschluss daran erfolgte die Auswahl der benötigten Primer mit Hilfe des Softwareprogrammes Vector-NTI (Infor Max, Oxford, UK) sowie nach Etablierung der PCR die Amplifikation der benötigten DNA-Sequenz.

Im Rahmen der Qualitätskontrolle erfolgte der Nachweis des amplifizierten Fragmentes durch Agarosegelelektrophorese, sowie am Beginn einmalig die Analyse der gesamten Basensequenz. Die Darstellung der Polymorphismen rs266729 und rs17300539 erfolgte unter Verwendung der single nucleotide primer-extension (SNuPe)-Methode sowie des MegaBACE 1000 Sequencers (Amersham LIFE science, Freiburg, D).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde bei steigendem Genotypisierungsbedarf die effizientere TaqMan-Technologie angewandt, um den Polymorphismus rs16861194 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte zu detektieren. Zur Anwendung kamen der TaqMan®-Assay oder auch 5'-Nuklease-Allelic-Discrimination-Assay in Verbindung mit dem ABI PRISM 7900 HT

Sequenzdetektionssystem der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Das Design der Primer und Sonden erfolgte unter Verwendung der Software Primer Express Version 2.0. Die Qualitätskontrolle erfolgte unter Verwendung von negativen Kontrollen (Reinstwasser), welche auf jeder 384-wellplate mitgeführt wurden.

2.2.2 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um DNA-Fragmente zu amplifizieren. Sie wird mittlerweile routinemäßig in der molekularen Diagnostik eingesetzt. Aufgrund dessen wird das Prinzip der PCR als bekannt vorausgesetzt und auf eine ausführliche Darstellung im Rahmen dieser Dissertation verzichtet.

2.2.2.1 Durchführung der Polymeraskettenreaktion

Hierbei wurde ein 20 µl PCR-Ansatz verwendet, wobei ein Mastermix bestehend aus Magnesiumchlorid, Primer up, Primer low, dNTPs, Puffer und Reinstwasser angefertigt wurde.

Je nach der Anzahl der Proben wurde der Mastermix multipliziert. Die empfindliche Taq-Polymerase wurde erst ganz zum Schluss hinzupipettiert. Zudem fanden alle Pipettierschritte auf Eis statt. In eine 96er Multiwellplate wurden je 2 µl DNA vorpipettiert, dann wurden 18 µl des Mastermixes hinzupipettiert, die PCR-Platte mit einer hitzestabilen Folie versehen und kurz zentrifugiert, bevor sie in den vorgeheizten Thermocycler gestellt wurde. Der PCR-Ansatz sowie das dazugehörige Thermocyclerprogramm sind Tab. 4 und 5 zu entnehmen.

Im Anschluss daran erfolgte der qualitative Nachweis des amplifizierten PCR-Abschnittes unter Verwendung der Agarosegelelektrophorese, welche im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Tab. 4. 20 µl PCR-Ansatz zur Amplifizierung des rs266729 und rs17300539

Reagenz	Menge in µl
DNA (ca. 20 ng/µl)	3,00
MgCl ₂	1,50
Puffer	2,00
Primer up (10 pmol)	0,75
Primer low (10 pmol)	0,75
dNTP	1,00
Reinstwasser	10,80
Taq-Polymerase	0,20

Tab. 5. Thermocyclerprogramm zur Amplifizierung des rs266729 und rs17300539

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
Initiale Denaturierung	96	120
Denaturierung	96	60
Annealing	59	40
Elongation	72	40
Abschließende Synthese	72	600

Anzahl der Zyklen: 45

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei diese aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern.

Verwendet wurden im Rahmen dieser Arbeit 1%ige Gele. Die gewünschte Menge Agarose wurde mit der entsprechenden Menge 1* TAE Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und gewogen. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt, wobei der durch diesen Vorgang entstandene Wasserdampf durch Zugabe der entsprechenden Menge Reinstwasser ergänzt wurde. Danach erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, um die DNA später im UV-Licht unter Verwendung des LAS-1000 Image Readers von Fuji sichtbar zu machen.

Nachdem die Agaroselösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde sie zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen, in die ein Kamm eingesetzt wurde, um Taschen für die zu applizierenden Proben zu erzeugen.

Nach dem Festwerden des Gels wurden die Gießbarrieren des Gelträgers vorsichtig entfernt, um diesen anschließend in die Elektrophoresekammer zu stellen und mit 1xTAE-Puffer zu überschichten. Danach wurde der Kamm ebenfalls vorsichtig entfernt. Vom PCR-Produkt wurden pro Probe je 4 µl in ein separates Gefäß pipettiert und 0,8 µl 6x loading dye solution hinzugefügt, kurz gevortext und in die durch den Kamm entstandenen Taschen appliziert.

Eine 100 Basenpaarleiter in der jeweils äußersten Tasche, diente als Längenstandard, um die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente einordnen zu können. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte bei einer Spannung von 120 V und einer Laufzeit von ca. 40 min.

Da trotz sauberen Arbeitens eine Kontamination nicht gänzlich auszuschließen ist, lief parallel zu jeder PCR eine Kontrolle, die anstelle von DNA Reinstwasser enthielt. So konnte bei fehlender Bande in der letztgenannten Probe in der sich anschließenden photographischen Dokumentation eine Kontamination mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

2.2.4 Durchführung der Genotypisierung

Die Darstellung der Polymorphismen rs266729 und rs17300539 erfolgte unter Verwendung der single nucleotide primer-extension (S_{Nu}Pe)-Methode, bei der es sich vom Prinzip her um eine abgewandelte Form der Didesoxymethode nach Sanger handelt, wobei im Folgenden beide Methoden zum besseren Verständnis näher erläutert werden.

2.2.4.1 Didesoxymethode nach Sanger und single nucleotide primer-extension (SNUPe)-

Methode

Die Didesoxymethode nach Sanger ist auch als Kettenabbruch-Methode bekannt und wurde von Sanger und seiner Arbeitsgruppe entwickelt und im Jahre 1977 publiziert (Sanger et al. 1977). Sie funktioniert nach dem Prinzip einer linearen PCR, d.h. es wird ein DNA-Abschnitt entlang einer einzelsträngigen DNA-Matrize neu synthetisiert.

Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass neben den dNTPs auch sogenannte ddNTPs im Reaktionsansatz enthalten sind. Diese ddNTPs besitzen im Gegensatz zu den dNTPs keine 3`Hydroxygruppe am Desoxyribosemolekül, welche für die Verlängerung der DNA-Kette durch die DNA-Polymerase notwendig ist.

Wird nun anstelle eines dNTP ein ddNTP in die Kette eingebaut, kann diese nicht weiter verlängert werden, es kommt zu einem so genannten Kettenabbruch. Das Resultat ist, dass DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, wobei das Verhältnis zwischen beiden Nukleosidtriphosphaten die Frequenz des Kettenabbruchs bestimmt. So entstehen statistisch gesehen Kettenabbrüche an jedem Nukleotid über die gesamte Fragmentlänge, so dass eine nachfolgende Basensequenzanalyse möglich ist (Metzker 2005, Sanger et al. 1977).

Die SNUPe-Methode ist eine Form der Minisequenzierung (Sylvänen 1999), wobei im Unterschied zur Didesoxymethode nach Sanger ein spezieller so genannter SNP-detection Primer (S-Primer) verwendet wird, der so konstruiert ist, dass er sich exakt 1 Nukleotid vor dem interessierenden Polymorphismus an die komplementäre DNA anlagert. Weiterhin sind im Reaktionsgemisch nur fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs enthalten, so dass der S-Primer um exakt ein entsprechendes ddNTP verlängert wird, welches mit dem MegaBACE 1000 nach entsprechender Aufreinigung detektiert werden kann.

2.2.4.1.1 Durchführung der SNP-Diagnostik

Bevor die eigentliche SNP-Diagnostik beginnen kann, sind noch einige vorbereitende Schritte notwendig, welche im Folgenden erläutert werden:

2.2.4.1.2 Aufreinigung

Zunächst ist es notwendig, die PCR-Amplifikate aufzureinigen, wobei im Rahmen dieser Dissertation das ExoSAP-IT®-Reagenz (USB Corporation, Cleveland, USA) zur Anwendung kam. Dieses enthält 2 hydrolytische Enzyme in einem speziellen Puffer: Exonuclease I und Shrimp Alkaline Phosphatase. Ersteres baut übriggebliebene Primer sowie einzelsträngige DNA ab, während letzteres überschüssige dNTPs abbaut. Konkret wurden zu 5 µl des PCR-Produktes 2 µl ExoSAP-IT® Reagenz hinzupipettiert, wobei dies auf Eis geschah, um einen Verlust der Enzymaktivität zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Proben kurz anzentrifugiert und in den auf 96°C vorgeheizten Mastercycler gestellt, wo eine Inkubation des Gemisches für 15 Minuten bei 37°C erfolgte.

Daraufhin wurden die Enzyme bei einer Temperatur von 80°C für einen Zeitraum von 15 Minuten inaktiviert. Der Ansatz zur Aufreinigung der PCR sowie das dazugehörige Thermocyclerprogramm sind in Tab. 6 und 7 dargestellt.

Tab. 6. Ansatz zur Aufreinigung des PCR-Produktes
(rs266729 und rs17300539)

Reagenz	Menge in µl
PCR-Produkt	5
ExoSAP-IT®	2

Tab. 7. Thermocyclerprogramm der PCR-Aufreinigung
(rs266729 und rs17300539)

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Inkubation	37	15
Inaktivierung	80	15

2.2.4.1.3 SNuPe-Reaktion

Nach erfolgreicher Aufreinigung der PCR-Amplifikate konnte nun die SNuPe-Reaktion durchgeführt werden, wobei im Rahmen dieser Dissertation das MegaBACE™ SNuPe™ Genotyping-Kit der Firma Amersham Biosciences, NY, USA zur Anwendung kam.

Hierzu wurden auf Trockeneis je 4 µl SNuPe-Premix, 2 µl S-Primer (1 pmol/µl) sowie 4 µl aufgereinigte DNA in eine 96er Multiwellplate pipettiert, mit einer Folie verschlossen, kurz anzentrifugiert und in den auf 96°C vorgeheizten Mastercycler gestellt.

Im Premix sind bereits fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs sowie eine DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid und eine Pufferlösung enthalten. Der PCR-Ansatz sowie das dazugehörige Thermocyclerprogramm sind in Tab. 8 und 9 dargestellt.

Tab. 8. 10 µl PCR-Ansatz für die Minisequenzierung des rs266729 und rs17300539

Reagenz	Menge in µl
SNuPe-Premix	4
S-Primer (1 pmol/µl)	2
PCR-Produkt (aufgereinigt)	4

Tab. 9. SNuPe-Thermocycler-Programm (rs266729 und rs17300539)

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
Denaturierung	96	10
Annealing	55	05
Elongation	60	10

Anzahl der Zyklen: 25

2.2.4.1.4 Aufreinigung des SNuPe-Produktes

Analog zur Aufreinigung der PCR-Amplifikate ist es erforderlich, die SNuPe-Produkte von überschüssigen ddNTPs, S-Primern, der Taq-Polymerase sowie weiteren Unreinheiten zu befreien. Diese Aufreinigung erfolgte mit dem AutoSeq96-Dye-Terminator-Clean-up-Kit (Amersham Biosciences, NY, USA) durch Gelfiltration. Hierbei ist in den AutoSeq96 G-50 Platten bereits in jedem well eine Sephadex™ G-50 Säule enthalten, was eine einfache Handhabung ermöglicht. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4.1.5 SNP-Detektion

Für die SNP-Detektierung wurden zu 5 µl des aufgereinigten SNuPe-Produktes 5 µl Injectionmarker hinzupipettiert. Dieser wurde aus 497,5 µl loading solution und 2,5 µl Injektion marker (MegaBACE™-DYEnamic™-ET-Dye-Terminator-Kit, Amersham Biosciences, New York, USA) hergestellt.

Im Anschluss daran konnte die SNP-Detektion mit dem MegaBACE 1000 unter Verwendung der SNP Profiler Version 1.0 Analysesoftware durchgeführt werden. Die SNP-Analyse beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese: die Proben werden hierbei elektrokinetisch in die mit Polyacrylamid beschichteten Kapillaren injiziert und anschließend entsprechend ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei passieren diese die Detektorregion, wo das Fluoreszieren der ddNTPs die Energie des Argonlasers absorbiert und diese auf die 4 unterschiedlichen Farbstoffmoleküle (R6G, R110, ROX, TAMRA) derselben ddNTP überträgt, welche dann ihrerseits Licht entsprechend ihrer charakteristischen Wellenlänge emittieren. Der Injection marker gibt hierbei dem Softwareprogramm den Auswertungsbereich der Probe vor. So ist es möglich den Genotyp einer Probe softwaregesteuert zu ermitteln. Die folgende Abbildung (Abb. 5) zeigt ein SNP-Elektropherogramm am Bsp. des rs266729.

Dargestellt sind der homozygote Mutant (GG), der Wildtyp (CC) sowie der heterozygote Mutant (GC).

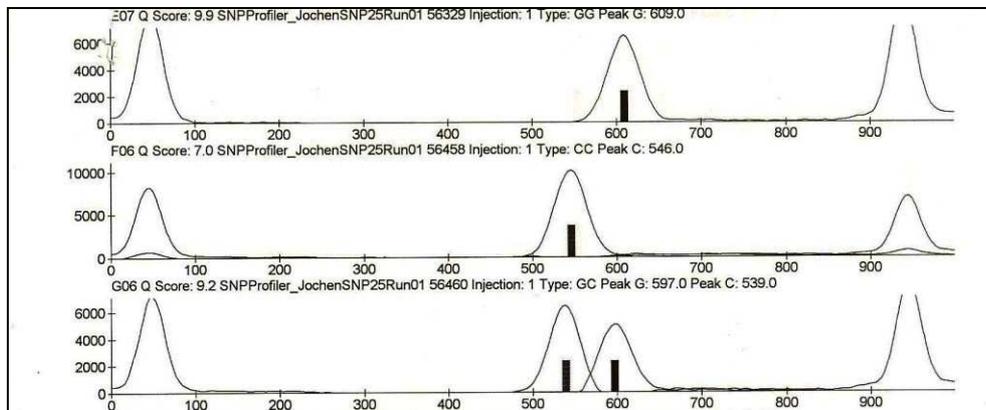


Abb. 5. SNP-Elektropherogramm am Bsp. des rs266729

Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung des Qualitätsscores der Software von 2 unabhängigen Personen.

Des Weiteren erfolgte im Rahmen der Qualitätskontrolle einmalig die Analyse der gesamten Basensequenz unter Verwendung des High-Pure-PCR-Product-Purification-Kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) sowie des MegaBACE™-DYEnamic™-ET-Dye-Terminator-Kit (Amersham Biosciences, NY, USA) unter Verwendung der Software MegaBACE Sequence Analyzer Patch 2, Version 3.0 (Amersham LIFE Science, Freiburg, D), wobei im Rahmen dieser Dissertation nach den Angaben der Hersteller vorgegangen wurde.

2.2.4.2 Real time PCR - TaqMan®-Assay

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit kam zur Genotypisierung des rs16861194 in beiden Kohorten die quantitative real-time-PCR zur Anwendung. Diese Methode erlaubt die direkte Detektion des PCR-Produktes während der exponentiellen Phase der Reaktion und kombiniert somit die Amplifikation und Detektion in nur einem Schritt. Verwendet wurde das ABI PRISM HT Sequenzdetektionssystem der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Hier können die Proben in 384 well- Mikrotiterplatten prozessiert werden, wodurch im Vergleich zum MegaBACE 1000 mit seinen 96 Kapillaren ein deutlich höherer Probendurchsatz möglich ist.

Bei dem hier verwendeten TaqMan®-Assay handelt es sich um ein homogenes PCR- Verfahren, d.h. die aufwendigen vorbereitenden Schritte entfallen, da in der Reaktionsmischung alle für die PCR notwendigen Komponenten enthalten sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Reaktion im Vergleich zur SNuPe- Methode in einem Reaktionsgefäß stattfindet, womit das Risiko einer

Kontamination im Vergleich zu der bisher angewendeten Methode deutlich geringer ist. Es erleichtert zudem die Laborarbeit in einem nicht unerheblichen Umfang, da die aufwendigen Schritte, welche nach der PCR anfallen (Aufreinigung des PCR- Produktes, SNUPe- Reaktion, Aufreinigung des SNUPe- Produktes und Vorbereitung der Proben zur SNP- Analyse) schlicht und einfach entfallen. Im Folgenden folgt zum besseren Verständnis eine Beschreibung des TaqMan-Prinzips.

2.2.4.2.1 Prinzip TaqMan®-Assay

Bei diesem homogenen PCR-Verfahren wird die den SNP umgebende Region (100-150 bp) in Gegenwart zweier PCR-Primer amplifiziert. Des Weiteren kommen 2 spezielle TaqMan-Sonden zum Einsatz: hierbei handelt es sich um Oligonucleotide, von denen eine perfekt komplementär („perfect match“) zur Wildtyp- Sequenz und die andere perfekt komplementär zur SNP-tragenden Sequenz ist. Diese Sonden sind am 5` Ende kovalent an 2 unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gebunden: VIC® [WT] und FAM™ [(6-Carboxyfluorescein) [Mutant]] und werden auch als Reporterfarbstoffe bezeichnet. Am 3` Ende befindet sich der so genannte Quencher (TAMRA™), welcher bei intakten Sonden aufgrund der räumlichen Nähe die Fluoreszenz der Reporterfarbstoffe komplett absorbiert, so dass diese nicht zu detektieren ist. Der Primer lagert sich nach Denaturierung der DNA an den Einzelstrang an (Annealing), wobei dieser mithilfe der Taq-Polymerase komplementär zu diesem ergänzt wird. Wenn sich nun auch die Sonde im Sinne eines „perfect match“ an diesen Einzelstrang angelagert hat, wird diese aufgrund der 5` Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in Einzelnukleotide aufgespalten und somit wird der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt. Dies führt dazu, dass letzterer nicht mehr das Fluoreszenzsignal absorbieren kann, welches nun detektierbar ist.

Dieses Prinzip ist in Abb. 6 zum besseren Verständnis noch einmal graphisch dargestellt.

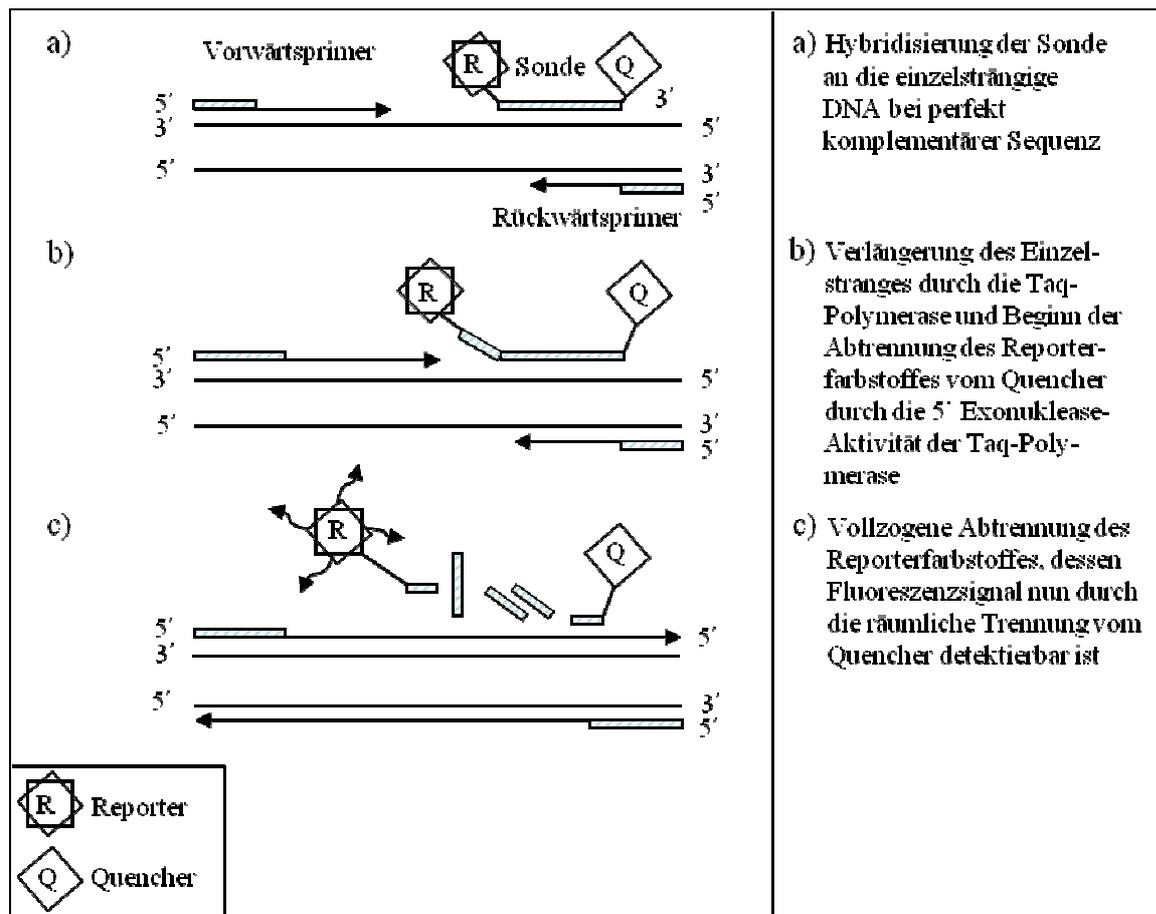


Abb. 6. Funktionsprinzip des TaqMan®-Assays

Es kann aber auch zu einem so genannten „mismatch“ kommen, d.h. die Sonden können sich aufgrund einer anderen Basenfolge nicht an den Einzelstrang anlagern. In diesem Fall bleiben die Sonden intakt und es lässt sich somit kein Fluoreszenzsignal detektieren.

Mit jedem Amplifikationszyklus steigt das Fluoreszenzsignal des Reporters entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes an, wobei dieser Anstieg mit dem ABI PRISM 7900 Sequenzdetektionssystem gemessen werden kann. Somit ist es möglich, den gesamten PCR-Verlauf darzustellen und die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals kann in den verschiedenen Proben unabhängig von ihrer Ausgangskonzentration zu einem Zeitpunkt erfolgen, an dem sich alle in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden. Um den anschließenden Genotyp zu berechnen, ist es hierbei wichtig, dass ein Plateau bezüglich der Fluoreszenz sättigung erreicht wird.

Nach Abschluss der PCR wird in einem sogenannten „Postread“ der absolut fluoreszierende Anteil der beiden Reporterfarbstoffe für jede Probe bestimmt. Die Fluoreszenzdaten wurden mithilfe der Software SDS Version 2.3 prozessiert und als zweidimensionaler Plot dargestellt.

Die Grundlage für diese automatische Allel-Diskriminierung bilden hierbei 3 separate Kalkulationen, wobei im ersten Schritt der Beitrag jedes Fluoreszenzfarbstoffes am gemessenen Fluoreszenzspektrum bestimmt wird. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Normierung der Fluoreszenzsignale basierend auf den Signalen der Kontrollen, welche keine DNA enthielten („no template“). Hierbei erfolgt die Auswertung jeder Probe für beide Allele. Im letzten Schritt werden dann diese allelspezifischen Daten zur Abgrenzung proben-spezifischer Reaktionen verwendet, so dass eine Diskriminierung der entsprechenden Genotypen möglich ist (Livak 1999)

Die folgende Abbildung (Abb. 7) zeigt den zweidimensionalen Diskriminierungsplot des rs16861194:

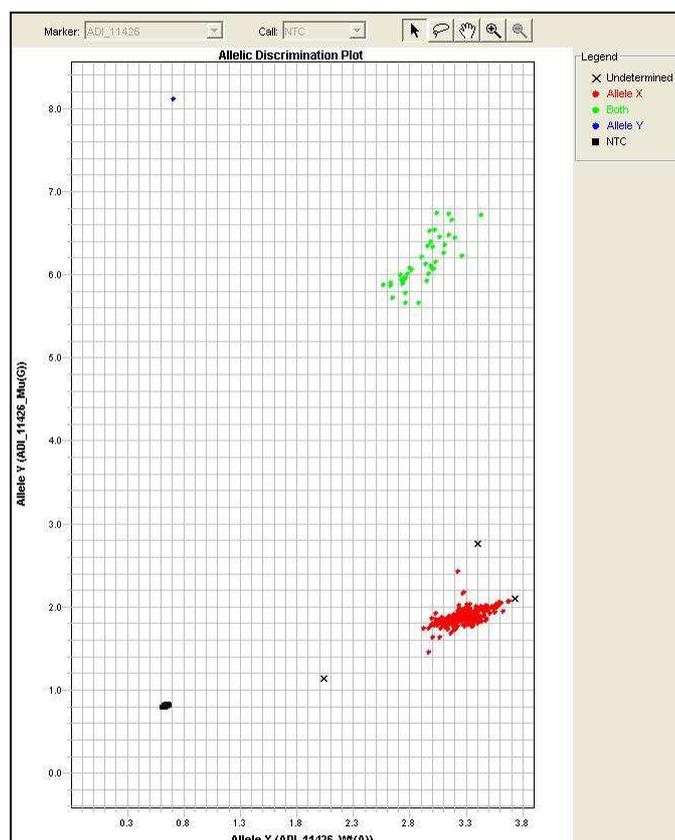


Abb. 7. Zweidimensionaler Diskriminierungsplot des TaqMan®- Genotypisierungssays (rs16861194), Erklärung im Text

Es ergeben sich somit 4 Punktwolken [Wildtyp (AA), homozygoter Mutant (GG), heterozygoter Mutant (AG), NTC (no template control)]. Liegt nun in einer Probe eine Wildtyp-DNA vor, wird nur die Fluoreszenz der VIC-Sonde entlang der X-Achse detektiert, während beim Vorliegen

einer DNA-Probe, welche nur das variante Allel (GG) enthält, nur die Fluoreszenz der FAM-Sonde entlang der Y-Achse detektiert wird. Liegt nun eine DNA-Probe von einem heterozygoten Mutanten vor, binden beide Sonden und die entsprechenden Datenpunkte sind somit auf der resultierenden Winkelhalbierenden lokalisiert.

2.2.4.2.2 Durchführung der TaqMan- Genotypisierung

Es wurde zunächst ein 4 µl Mix-Ansatz, bestehend aus dem TaqMan®-Universal-PCR-Master-Mix, Primer forward, Primer reverse, Sonde VIC®, Sonde FAM™ sowie DNase/RNase freies Wasser angefertigt. Hierbei enthält der TaqMan®-Universal-PCR-Master-Mix, mit Ausnahme der Primer und Sonden, alle für den Assay erforderlichen Komponenten.

In eine 384-wellplate wurden je 1 µl DNA vorpipettiert, daraufhin erfolgte die Zugabe von je 4 µl des hergestellten Mixansatzes sowie der Verschluss der Platte mit einer speziellen optisch durchlässigen Folie. Nach einer kurzen Anzentrifugation konnte nun die Platte in den ABI PRISM 7900 HT gestellt und die PCR gestartet werden. Der PCR- Ansatz sowie das dazugehörige Thermozyklerprogramm sind Tab. 10 und 11 zu entnehmen.

Vor dem Start der eigentlichen PCR war noch eine 10-minütige Inkubationszeit zur Aktivierung der im PCR-Universal-Mastermix enthaltenden Ampli-Taq-Gold™-Polymerase notwendig. Dieses Enzym liegt primär aufgrund eines gebundenen Antikörpers in inaktiver Form vor und wird erst nach abdissoziieren dieses Antikörpers im Sinne eines automatischen „Hot starts“ aktiviert. Dies hat den Vorteil, dass die Anforderungen an das Primer- Design etwas geringer sind, da Primer- Dimere ein geringeres Problem darstellen (Livak 1999).

Tab. 10. 5 µl PCR-Ansatz zur Amplifizierung des rs16861194

Reagenz	Menge in µl
DNA (ca. 2 ng/µl)	1,0
Universal PCR Mastermix	2,5
Primer forward (10 µmol)	0,45
Primer reverse (10 µmol)	0,45
Sonde VIC® (10 µmol)	0,1
Sonde FAM™ (10 µmol)	0,1
DNase/RNase freies Wasser	0,85

Tab. 11. Thermozyklerprogramm zur SNP-Diagnostik des rs16861194

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
Aktivierung der Taq-Polymerase	95	10 min
Denaturierung	92	15
Annealing und Elongation	60	60

Anzahl der Zyklen: 45

Nach Abschluss der PCR wurde der bereits erwähnte Postread zur finalen Detektion der Fluoreszenzsignale vorgenommen, aus dem dann der bereits dargestellte Diskriminierungsplot errechnet werden konnte.

Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurden negative Kontrollen eingesetzt. Diese enthielten anstelle von DNA Reinstwasser und wurden auf jeder 384-wellplate mitgeführt.

2.3 Material

2.3.1 Biochemikalien

DNA-Leiter 100 bp, 25 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA 6x loading-dye-solution	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe, D
ExoSAP-IT®	USB Corporation, Cleveland, USA
MegaBACE™ SNuPe™	
Multiple injection marker	Amersham Biosciences, NY, USA
PCR-Puffer (-MgCl ₂) 10 x	Invitrogen, Karlsruhe, D
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.3.2 Chemikalien

Agarose	BioWhittaker, Rockland, USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, D
Ethanol (95%ig ;70%ig)	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma, Saint Louis, USA
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe, D
TAE-Puffer (50x)	2mol/l Tris-Acetat, 0,5 mol/l EDTA (pH=8)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, D

2.3.3 Verbrauchsmaterial

ABI PRISM™ Optical Adhesive Cover	ABI, Foster City, CA, USA
Accu-Check® Dextro® O.G.-T.	La Roche AG, Grenzach-Wahlen, D
Adhesive Seal Applicator	ABI, Foster City, CA, USA

Biosphere® Filterspitzen (10µl, 100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Combitips plus (0,1 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
DNase/RNase-Free-Deionized water	MP, Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA
Eppendorf Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Microseal F Sealing Foil	Biozym Scientific GmbH, H. Oldendorf, D
Multiply® Deckelkette für 0,2 ml-Kette	Sarstedt, Nümbrecht, D
Multiply® µStrip 0,2 ml-Kette	Sarstedt, Nümbrecht, D
Multiwellplate 96er, PCR-Platte	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
384-well Clear Optical Reaction Plates	ABI, Foster City, CA, USA
Pipettenspitzen; Rundbodentubes (13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.3.4 Kits und Assays zur Genotypisierung

AGOWA® mag Maxi DNA Isolation Kit	AGOWA GmbH, Berlin, D
AutoSeq96-Dye-Terminator-Clean-up-Kit	Amersham Biosciences, NY, USA
High-Pure-PCR-Product-Purification-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
MegaBACE™-DYEnamic™-ET-Dye-Terminator-Kit	Amersham Biosciences, NY, USA
MegaBACE™ SNUPe™ Genotyping-Kit	Amersham Biosciences, NY, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	ABI, Foster City, CA, USA

2.3.5 Laborparameter

ABX Pentra Cholesterol CP	ABX Diagnostics, Bedfordshire, UK
ABX Pentra HDL Direct CP	ABX Diagnostics, Bedfordshire, UK
ABX Pentra Triglycerides CP	ABX Diagnostics, Göppingen, D
Adiponectin RIA	Linco Research, St. Charles, USA
Human Adiponectin ELISA	Biovendor, Nashville, USA
CentAK® anti-GAD65	Medipan Diagnostica, Selchow, D
CentAK® anti-IA2	Medipan Diagnostica, Selchow, D
HbA1c-Enzym-Immunoassay	DAKO Diagnostica, Hamburg, D
HbA1c-HPLC	Menari Diagnostica, Neuß, D
Human Insulin-ELISA	Mercodia AB, Uppsala, Schweden

2.3.6 Geräte zur Phänotypisierung

GBM Anthropometer	Silber & Hegner, Zürich, Schweiz
Personenwaage Typ 7720/23; Typ S10_2720	Soehnle, Murrhardt, Deutschland
Blutdruckmessgerät BOSO.Oscillomat®	Bosch & Sohn, Jungingen, Deutschland
Blutdruckmessgerät Typ HEM 705 CPN	Omron, Kyoto, Japan

2.3.7 Primer und Sonden

Primer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Sonden	ABI, Foster City, CA, USA
Primer-Sonden-Mix	ABI, Foster City, CA, USA

Primer- und Sondensequenzen

Tab. 12. Primersequenzen des rs266729 sowie des rs17300539 (5' to 3')

Primer up (10 pmol/μl)	GTC TTG TTG AAG TTG GTG CTG G
Primer low (10 pmol/μl)	ATA GAG CAC ATC CTC CAC TCT CTG
S-Primer rs266729 (1 pmol/μl)	CAT GTT TTG TTT TTG AAG
S-Primer rs17300539 (1 pmol/μl)	GAA TGT GTG GCT TGC AAG AAC C

Tab. 13. Primer- und Sondensequenzen des rs16861194

forward primer (10 μmol)	GGC ATC CTA AGC CCT TGC T
reverse primer (10 μmol)	GGT TCT TGC AAG CCA CAC ATT
Sonde VIC® (WT) (10 μmol)	CTG ATG AAT TAA ACT ACG
Sonde FAM™ (Mu) (10 μmol)	CTG ATG AAT TAA ATT ACG

2.3.8 Laborgeräte

ABI PRISM 7900 HT	ABI, Foster City, CA, USA
COBAS MIRA	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Gelelektrophoresekammer	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D

Gel Imager Fujifilm LAS-100 CH	Fuji Foto Film Co., Ltd., Tokio, Japan
Gelkammer Blue marine sowie	Serva Electrophoresis GmbH,
Gelkämme	Heidelberg, D
Heizplatte RET basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG,
	Staufen, D
Magnetseparator AGOWA® sep 9600	Agowa GmbH, Berlin, D
Mastercycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg, D
Multifuge 3 SR	Heraeus, Berlin, D
Pipetten (diverse)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierroboter	Personal Lab, Fa. Adalties, Freiburg, D
Sequencer MegaBACE 1000	Amersham Life Science, Freiburg, D
„Super GL“	Dr. Müller, Gerätebau GmbH, Freital, D
Vortex VF 2	IKA® Werke GmbH & Co. KG,
	Staufen, D
Waage LP 5200 P	Sartorius, Göttingen, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D

2.3.9 Software

AIDA 2.11	Raytest, Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, D
Image Reader LAS-1000 Pro V2.1	Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan
MegaBACE Sequence Analyzer Patch 2, Version 3.0	Amersham LIFE science, Freiburg, D
MegaBACE SNP profiler Version 1.0	Amersham LIFE science, Freiburg, D
SDS 2.3	ABI, Foster City, CA, USA
SPSS 16.0 und 18.0	Chicago, USA
Primer Express 2.0	ABI, Foster City, CA, USA
QUANTO Version 1.2.4	(Gaudermann et al. 2006, http://hydra.usc.edu/gxe)
Vector NTI	Infor Max, Oxford, UK

2.4 Analysen

2.4.1 Test Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass sowohl die Allel- als auch die Genotypfrequenzen innerhalb einer Population über Generationen hinweg konstant bleiben, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: hinreichend große Population, zufällige Partnerwahl innerhalb dieser Population (Panmixie), fehlendes Auftreten von Mutationen, natürliche Selektion sowie fehlende Migration (Wigginton et al. 2005).

Für einen Polymorphismus, welcher einen biallelischen Marker darstellt, sei p die Frequenz des A-Allels und q die Frequenz des a-Allels. Somit gilt folgende Gleichung: $p(A) + q(a) = 1$.

Unter der Voraussetzung der Panmixie beträgt dann die Wahrscheinlichkeit, homozygot für das Allel A zu sein p^2 , homozygot für das Allel a zu sein q^2 sowie die Wahrscheinlichkeit heterozygot (Aa) zu sein $2pq$. Diese Beziehung zwischen Allel- und Genotypfrequenzen wird durch die Hardy-Weinberg-Gleichung dargestellt (Rodriguez et al. 2009):

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$$

Abweichungen vom HWE können auf Populationsstratifikationen [z.B. verursacht durch Inzucht oder Unterschiede im genetischen Background] (Schaid et al. 1999) sowie Genotypisierungsfehler zurückzuführen sein (Wigginton et al. 2005).

Auf der anderen Seite jedoch kann eine Abweichung vom HWE in der Fallgruppe auch ein Hinweis für eine bestehende Assoziation sein (Wigginton et al. 2005).

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die Überprüfung der Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes mithilfe einer frei verfügbaren Software (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 5% bei einem Freiheitsgrad von 1 angenommen, wobei die Annahme der Nullhypothese bei einem $(p)\chi^2 < 3,84$ erfolgte (Rodriguez et al. 2009).

Des Weiteren wurden zum Vergleich der im Rahmen dieser Dissertation ermittelten Allelfrequenzen die Daten der im Rahmen des internationalen HapMap-Projektes veröffentlichten Allelfrequenzen als Referenzquelle herangezogen.

2.4.2 Powerkalkulation

Die Power ist ein Maß für die statistische Aussagekraft eines Tests. Mithilfe der Powerkalkulation besteht die Möglichkeit die Größe des Effektes zu erfassen, der mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit in einer Studie nachgewiesen werden kann (Markel 1991).

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die Powerkalkulation mithilfe des Computerprogrammes „QUANTO“ Version 1.2.4 für Windows (Gaudermann et al. 2006, <http://hydra.usc.edu/gxe>). Hierbei wurde eine Power von 80% sowie ein zweiseitiger α -Fehler von 5% angenommen.

Die Kalkulation erfolgte für den rs266729 sowie rs17300539 ausschließlich im dominanten Modell, um eine Fehleinschätzung, bedingt durch die niedrige Frequenz der homozygoten Mutanten, zu vermeiden.

Die folgende Tabelle (Tab. 14) gibt einen Überblick über die abhängigen Faktoren in den jeweiligen Kohorten für den Endpunkt T2D.

Tab. 14. Variierende Parameter der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D in der EPIC-Potsdam und MeSy-BePo-Kohorte.

Kohorte	Endpunkt	Kontroll ¹ (n)	Fall ² (n)	Kontrollen pro Fall	Risiko in der Bevölkerung (%) (King et al. 1998)
EPIC-Potsdam	T2D	376	187	0,50	6,00
MeSy-BePo	T2D	1160	334	3,47	6,00

* 1: normale Glukosetoleranz (NGT), 2: Typ 2 Diabetes mellitus (T2D),
Angabe der Werte als n (absolute Fallzahl) bzw % (relatives Risiko)

2.4.3 Datenanalyse SPSS

Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe des Statistiksoftwareprogramms SPSS für Windows, Version 16.0 und 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Zur Charakterisierung der Studienkohorten wurden die kontinuierlichen Variablen zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Nicht normalverteilte Parameter wurden logarithmiert und anschließend erneut hinsichtlich ihrer Verteilung getestet.

Daraufhin erfolgten Mittelwertsvergleiche normalverteilter Parameter mittels t-Test bzw. für nach Logarithmierung normalverteilter Parameter mittels einfaktorieller ANOVA, um bei 2 zu vergleichenden Stichproben auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen. Analog kam bei nicht normalverteilten Variablen der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Kategoriale Parameter wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. mit dem exakten Test nach Fisher auf signifikante Unterschiede getestet.

Die Berechnungen erfolgten bei allen 3 Promotorpolymorphismen ausschließlich im dominanten Modell, um eine statistische Fehleinschätzung, bedingt durch die niedrige Frequenz der homozygoten Mutanten, zu vermeiden.

Bei Nachweis eines Effektes erfolgten für kontinuierliche Variablen lineare multivariate Regressionsanalysen, um für Confounder (Alter, BMI, Geschlecht) zu adjustieren.

Im Rahmen der MeSy-BePo-Kohorte erfolgte die Analyse der Assoziation des Genotyps mit den zirkulierenden Adiponectinspiegel nur bei Probanden, welche keinen inzidenten T2D aufwiesen, um einen möglichen Einfluss sowohl durch die Erkrankung selbst, als auch durch eine anti-diabetische Medikation ausschließen zu können.

Im Falle einer signifikanten Assoziation der Polymorphismen mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln erfolgte die Berechnung des prozentualen Anteils an der Variabilität der Spiegel im multivariaten linearen Regressionsmodell mit Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI.

Die Analyse kategorialer Daten erfolgte unter Anwendung multivariater logistischer Regressionsanalysen, um analog für Confounder (Alter, BMI, Geschlecht) zu adjustieren.

Ergänzend erfolgte mithilfe der im OGTT gewonnenen Daten in der MeSy-BePo-Kohorte die Entwicklung von 2 Modellen, um auf eine Assoziation der Genotypen unter Einbeziehung der Vorstufen des T2D zu testen. Weiterhin erfolgte die Berechnung von Indizes des Glukosemetabolismus, wobei hier wiederum Probanden mit einem prävalenten T2D aus der Analyse ausgeschlossen wurden, um eine Verfälschung des Ergebnisses, bedingt durch das Vorliegen der Erkrankung, zu vermeiden. Ein zweiseitiges Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ in Verbindung mit einer Korrektur nach Bonferroni wurde als statistisch signifikant angenommen, so dass bei 2 primären Endpunkten (Adiponectin-Spiegel und Diabetes mellitus Typ 2) und 3 untersuchten Polymorphismen der korrigierte p-Wert bei $p_{\text{kor}} = 0,05/6 = 0,008$ lag.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der Powerkalkulation

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Powerkalkulation in graphischer (Abb. 8) und tabellarischer (Tab. 15) Form für den rs266729 sowie rs17300539 sowohl in der EPIC-Potsdam-Kohorte, als auch in der MeSy-BePo-Kohorte für den Endpunkt T2D (dominantes Modell). Auf eine Darstellung des rs16861194 wurde aufgrund ähnlicher Allelfrequenzen im Vergleich zum rs17300539 aus Gründen der Übersichtlichkeit im Rahmen dieser Dissertation verzichtet.

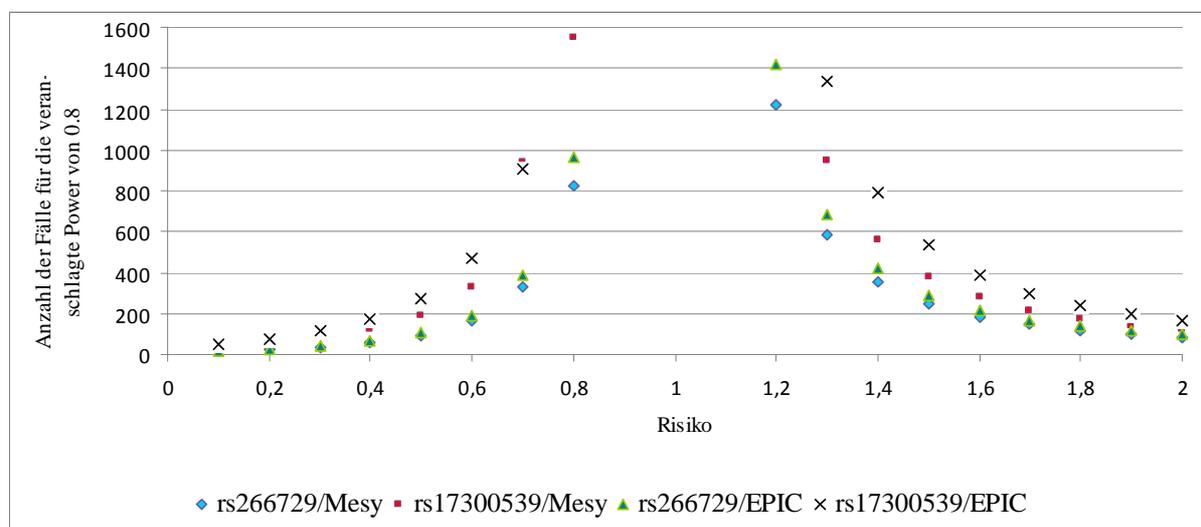


Abb. 8. graphische Darstellung der Ergebnisse der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D in der EPIC-Potsdam und MeSy-BePo-Kohorte für den rs266729 und rs17300539 (Erklärung im Text)

Die Y-Achse beschreibt die Anzahl der notwendigen Fälle für eine veranschlagte Power von 0,8, welche erforderlich sind, um einen möglichen Effekt zu detektieren, wobei die Größe dieses Effektes auf der X-Achse dargestellt ist. Die Powerkalkulation erfolgte im dominanten Modell unter Annahme eines zweiseitigen α -Fehlers von 0,05.

Tab. 15. Ergebnisse der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte für den rs266729 und rs17300539

	rs266729 EPIC-Potsdam	rs266729 MeSy-BePo	rs17300539 EPIC-Potsdam	rs17300539 MeSy-BePo
unteres abschätzbares Risiko	0,60 ¹	0,71 ¹	0,42 ¹	0,62 ¹
oberes abschätzbares Risiko	1,67 ¹	1,39 ¹	1,95 ¹	1,54 ¹

* 1 Angabe der Werte als Odds Ratio, Erklärung im Text

Es wird ersichtlich, dass für den rs266729 in der EPIC-Potsdam-Kohorte bzw. MeSy-BePo-Kohorte ein bestehender Effekt oberhalb einer OR von 0,60 bzw. 0,71 sowie unterhalb einer OR von 1,67 bzw. 1,39 nur mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 80% zu detektieren war.

Ein Effekt des rs17300539 war in der EPIC-Potsdam-Kohorte oberhalb einer OR von 0,42 und unterhalb einer OR von 1,95 ebenfalls nur mit einer Wahrscheinlichkeit unter 80% zu eruieren. In der MeSy-BePo-Kohorte betrug das OR-Intervall hier 0,62-1,54.

3.2 Charakterisierung der EPIC Potsdam-Kohorte

Zum Zeitpunkt dieser Dissertation befanden sich 187 Probanden mit einem inzidenten T2D sowie 376 Kontrollen, gematcht nach Alter und Geschlecht, in der prospektiv eingebetteten Fall-Kontroll-Studie. Die folgende Tabelle (Tab. 16) gibt einen Überblick über ausgewählte klinische und metabolische Charakteristika der Probanden in Abhängigkeit vom Vorhandensein bzw. Fehlen eines inzidenten T2D.

Tab. 16. Charakterisierung der Studienkohorte EPIC-Potsdam stratifiziert nach Fall/Kontroll

Parameter	T2D¹ (n=187)	Kontrollen² (n=376)	p-Wert
Alter (Jahre)	55,6 ± 6,7	55,6 ± 6,7	matching
Geschlecht (mä/w)	110/77	221/155	matching
BMI (kg/m ²)	30,7 ± 3,8	26,7 ± 3,5	< 0,0001
WHR	0,94 ± 0,09	0,89 ± 0,09	< 0,0001
Adiponectin (µg/ml)	5,96 ± 3,50	7,95 ± 4,58	< 0,0001
HbA1c (%)	6,4 ± 2,2	4,7 ± 0,7	< 0,0001
Gesamtcholesterin (mmol/l)	4,82 ± 0,89	4,90 ± 0,90	0,321
HDL (mmol/l)	0,90 ± 0,23	1,06 ± 0,27	< 0,0001
LDL (mmol/l)	3,14 ± 0,75	3,33 ± 0,92	0,388
TG (mmol/l)	2,41 ± 1,93	1,26 ± 0,87	< 0,0001
Alkoholkonsum (g/d)	8,5 ± 28,3	16,1 ± 16,5	0,456
Sport (h/Woche)	0,5 ± 1,1	0,9 ± 1,6	0,007
Blutdruck diastolisch (mmHg)	90,3 ± 11,4	84,9 ± 10,3	<0,001
Blutdruck systolisch (mmHg)	144,3 ± 21,0	132,6 ± 17,1	<0,001
Rauchen aktuell (n/%)	36 (19,3%)	79 (21,0%)	0,626

* 1 = inzidenter T2D; 2 = NGT

Angabe der Werte in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. n (absolute Fallzahl) in % (relative Fallzahl).

Die Berechnung kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem t-Test für normalverteilte Parameter bzw. mithilfe der einfaktoriellen Anova für nach Logarithmierung normalverteilter Parameter. Die Berechnung nicht normal verteilter kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Berechnung kategorialer Parameter erfolgte mit dem chi²-Test.

Es wird ersichtlich, dass die Typ-2-Diabetiker signifikant höhere Werte für die anthropometrischen Parameter (BMI, WHR) sowie höhere systolische und diastolische Blutdruckwerte aufwiesen. Ebenfalls fanden sich erhöhte Triglycerid-Spiegel sowie ein erniedrigtes HDL.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Adiponectinspiegel sowie die sportliche Aktivität in der Kontrollgruppe signifikant erhöht waren.

3.2.1 Häufigkeitsverteilung der Promotorpolymorphismen im AdipoQ-Gen in der EPIC-Potsdam- Kohorte

Die Genotypfrequenzen für diese 3 Promotorpolymorphismen befanden sich in der Fallgruppe im Hardy-Weinberg-Equilibrium [(p)chi² rs266726 = 0,05; (p)chi² rs17300539 = 0,88; (p)chi² rs16861194 = 0,8]. In der Kontrollgruppe ergab sich eine Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit für den rs266726 [(p)chi² = 4,07], nicht jedoch für den rs17300539 [(p)chi² = 0,88] und den rs16861194 [(p)chi² = 2,52]. Die Annahme der Nullhypothese erfolgte bei einem [(p)chi² < 3,84].

Zur besseren Übersicht folgt eine Darstellung der Genotypfrequenzen für die 3 Promotorpolymorphismen in tabellarischer sowie graphischer Form (Abb. 9).

rs266729	Häufigkeit n (%)	rs17300539	Häufigkeit n (%)	rs16861194	Häufigkeit n (%)
CC	308 (54,7)	GG	481 (85,4)	AA	482 (85,6)
CG	207 (36,8)	GA	81 (14,4)	AG	76 (13,5)
GG	48 (8,5)	AA	1 (0,2)	GG	5 (0,9)
Gesamt	563 (100,0)		563 (100,0)		563 (100,0)

Angabe der Werte in n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl).

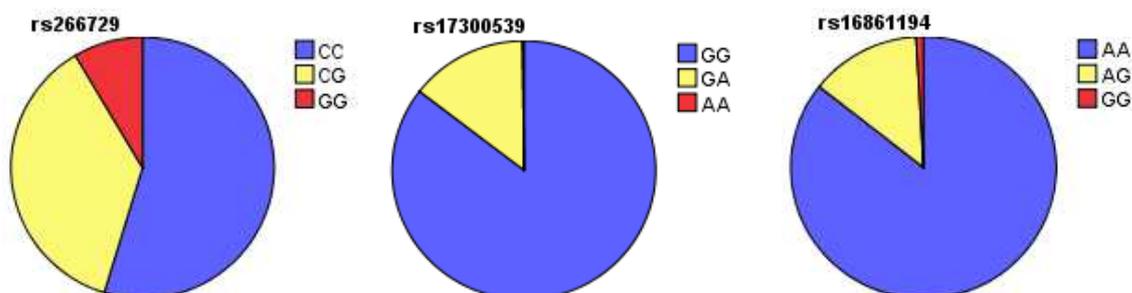


Abb. 9. Tabellarische und graphische Darstellung der Genotypfrequenzen der 3 Promotorpolymorphismen in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte.

3.2.2 Klinische Charakteristika der 3 Promotorpolymorphismen im dominanten Modell

Anschließend wurde untersucht, ob sich die klinischen und metabolischen Charakteristika der Probanden in Abhängigkeit vom Genotyp unterscheiden. Hierbei wurde für alle 3 Einzel-nukleotidpolymorphismen das dominante Modell gewählt, um Verfälschungen, bedingt durch

die niedrige Frequenz der homozygoten Mutanten, zu vermeiden. Konkret bedeutet dies, dass der homozygote Wildtyp dem heterozygoten und homozygoten Mutanten gegenübergestellt wurde. Ein Überblick über die Charakteristika in Abhängigkeit vom Genotyp für den rs266729 findet sich in der folgenden Tabelle (Tab. 17):

Tab. 17. Vergleich von klinischen und metabolischen Charakteristika des Promotorpolymorphismus rs266729 in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte

Parameter	CC	GC/GG	p-Wert
Alter (Jahre)	55,6 ± 6,7	55,7 ± 6,8	0,803
Geschlecht (mä/w)	178/130	153/102	0,596
BMI (kg/m ²)	28,1 ± 4,4	28,0 ± 4,5	0,731
WHR	0,91 ± 0,10	0,91 ± 0,09	0,871
Adiponectin (µg/ml)	7,74 ± 4,45	6,76 ± 4,18	0,008
HbA1c (%)	5,4 ± 1,7	5,2 ± 1,5	0,196
Gesamtcholesterin (mmol/l)	4,88 ± 0,89	4,86 ± 0,92	0,659
HDL (mmol/l)	1,02 ± 0,27	1,00 ± 0,27	0,861
LDL (mmol/l)	3,27 ± 0,93	3,31 ± 0,83	0,830
TG (mmol/l)	1,44 ± 1,06	1,61 ± 1,49	0,509
Sport (h/Woche)	0,8 ± 1,5	0,7 ± 1,5	0,412
Alkoholkonsum (g/d)	17,5 ± 22,1	16,2 ± 19,9	0,242
Blutdruck diastolisch (mmHg)	86,8 ± 10,7	86,7 ± 11,4	0,881
Blutdruck systolisch (mmHg)	136,5 ± 18,4	136,5 ± 20,3	0,981
Rauchen aktuell (n/%)	63 (20,5%)	52 (20,4%)	0,985

Angabe der Werte in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. n (absolute Fallzahl) in % (relative Fallzahl).

Die Berechnung kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem t-Test für normalverteilte Parameter bzw. mithilfe der einfaktoriellen Anova für Logarithmierung normalverteilter Parameter. Die Berechnung nicht normal verteilter kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Berechnung kategorialer Parameter erfolgte mit dem chi²-Test. Alle Berechnungen erfolgten im dominanten Modell.

Es wird ersichtlich, dass Träger des Wildtyps (CC) im Vergleich mit Probanden, welche hetero- bzw. homozygot (CG/GG) für das variante Allel waren, höhere zirkulierende Adiponectinspiegel aufwiesen.

Die übrigen Charakteristika unterschieden sich nicht wesentlich in Abhängigkeit vom Genotyp. Bei den Promotorpolymorphismen rs17300539 und rs16861194 ergaben sich bis auf die zirkulierenden Adiponectinspiegel ebenfalls keine relevanten Unterschiede, so dass an dieser Stelle auf eine ausführliche Darstellung verzichtet wird und nun zur besseren Übersicht eine Darstellung der Assoziationen der 3 Promotorpolymorphismen mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln (dominantes Modell) in tabellarischer (Tab. 18) sowie graphischer (Abb. 10) Form folgt:

Tab. 18. Assoziation der Promotorpolymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte

Einzelnukleotidpolymorphismus	Ohne Adjustierung	Adjustierung für BMI
rs266729 (n)		
Adiponectinspiegel CC (308)	7,74 ± 0,247	7,75 ± 0,242
Adiponectinspiegel CG/GG (255)	6,76 ± 0,271	6,74 ± 0,266
p-Wert	0,008	0,005
rs17300539 (n)		
Adiponectinspiegel GG (479)	7,09 ± 0,198	7,10 ± 0,194
Adiponectinspiegel AG/AA (82)	8,57 ± 0,478	8,52 ± 0,470
p-Wert	0,004	0,005
rs16861194 (n)		
Adiponectinspiegel AA (482)	7,41 ± 0,198	7,41 ± 0,194
Adiponectinspiegel GA/GG (81)	6,57 ± 0,483	6,58 ± 0,474
p-Wert	0,109	0,107

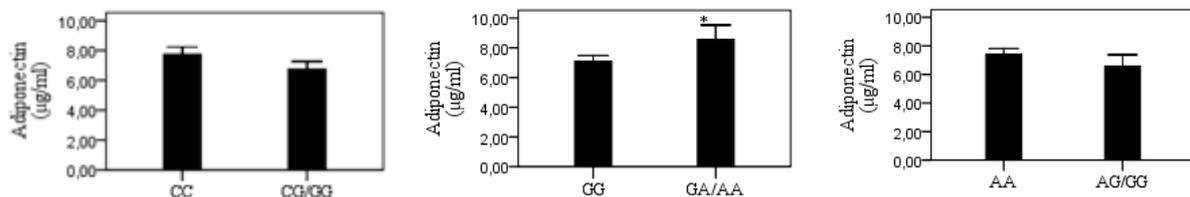
Angabe der Werte in Mittelwert ± Standardfehler bzw. n (absolute Fallzahl).

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression ohne und mit Adjustierung für den BMI

rs266729

rs17300539

rs16861194



*p = 0,005

Abb. 10. Graphische Darstellung der Assoziation der zirkulierenden Adiponectinspiegel mit den 3 Promotorpolymorphismen in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit Adjustierung für den BMI

Es zeigte sich eine signifikante Assoziation des Polymorphismus rs17300539 mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln, wobei sich das Signifikanzniveau nach entsprechender Adjustierung nur geringfügig änderte. Hinsichtlich des rs266729 wiesen Träger des WT (CC) im Vergleich zum hetero-/homozygoten (CG, GG) Mutanten höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel auf, wobei hier anzumerken ist, dass sich der Promotorpolymorphismus rs266729 nicht im HWE befand. In Bezug auf den Promotorpolymorphismus rs16861194 ließ sich keine Assoziation nachweisen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Promotorpolymorphismus rs17300539 mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln assoziiert ist, stellte sich nun die Frage, welchen prozentualen Anteil dieser an der Variabilität der Plasmaadiponectinspiegel hat (Tab. 19):

Tab. 19. Anteil des rs17300539 an der genetischen Variabilität der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel

SNP	Standardisiertes β	Partielle Korrelation	Standardisiertes β x partielle Korr. x 100 (%)	p-Wert
rs17300539	- 0,115	- 0,118	1,36	0,005

Die Berechnung erfolgte im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit Adjustierung für den BMI.

Es zeigte sich, dass die Variabilität des zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegels zu 1,36% durch den Promotorpolymorphismus rs17300539 bestimmt wird.

3.2.3 Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem Diabetes mellitus Typ 2

Interessant war nun die Frage, ob die 3 Promotorpolymorphismen im AdipoQ- Gen mit dem inzidenten T2D assoziiert sind. Ein Überblick über die Ergebnisse findet sich in der folgenden Abbildung (Abb. 11):

SNP		CC n(%)	CG/GG n (%)	p-Wert
rs266729	Fall ¹	102 (54,5)	85 (45,5)	1,000
	Kontroll ²	206 (54,8)	170 (45,2)	
SNP		GG (%)	GA/AA (%)	p-Wert
rs17300539	Fall ¹	163 (84,1)	24 (15,9)	0,448
	Kontroll ²	316 (84,5)	58 (15,5)	
SNP		AA (%)	AG/GG (%)	p-Wert
rs16861194	Fall ¹	164 (87,7)	23 (12,3)	0,373
	Kontroll ²	318 (84,6)	58 (15,4)	

* 1 = inzidenter T2D; 2 = NGT

Angabe der Werte als n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl)

Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des exakten Test nach Fisher

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung des exakten Test nach Fisher (oberer Teil der Abbildung) sowie im logistischen Regressionsmodell mit Adjustierung für den BMI (unterer Teil der Abbildung)

SNP	OR	95%-Konfidenzintervall
rs266729	1,055	0,713 – 1,560
rs17300539	0,830	0,473 – 1,456
rs16861194	0,735	0,415 – 1,301

Angabe der Werte als OR (odds ratio) bzw. 95%- Konfidenzintervall

Die Berechnung erfolgte im logistischen Regressionsmodell mit Adjustierung für den BMI.

Abb. 11. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D stratifiziert nach Fall/Kontroll in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte.

Es wird ersichtlich, dass sowohl vor als auch nach Adjustierung für den BMI keine Assoziation zwischen dem Genotyp der 3 Promotorpolymorphismen und dem inzidenten T2D bestand, wobei hier wiederum anzumerken ist, dass sich der rs 266729 nicht im HWE befand.

3.3 Charakterisierung der MeSy-BePo-Gesamtkohorte

In der fortlaufenden Querschnittsstudie MeSy-BePo waren zum Zeitpunkt der Dissertation 2031 Probanden in die Studie eingeschlossen. Hierunter fanden sich 1160 (56,3%) Probanden mit einer normoglykämischen Stoffwechsellage sowie 334 (16,2%) Patienten mit einem gesicherten T2D. Weitere 537 Probanden wiesen einen gestörten Glukosemetabolismus auf, wobei 147 (7,1%) Probanden eine gestörte Nüchtern glukose (IFG), 295 (14,3%) Studienteilnehmer eine gestörte Glukosetoleranz (IGT) sowie 95 (4,6%) Probanden sowohl eine gestörte Nüchtern glukose als auch eine gestörte Glukosetoleranz (IFG+IGT) aufwiesen (Abb. 12):

	Häufigkeit n (%)
NGT	1160 (56,3)
IFG	147 (7,1)
IGT	295 (14,3)
IFG + IGT	95 (4,6)
T2D	334 (16,2)
Gesamt	2031 (100)

* **NGT**: normale Glukosetoleranz, **IFG**: gestörte Nüchtern glukose, **IGT**: gestörte Glukosetoleranz, **IFG + IGT**: gestörte Nüchtern glukose + gestörte Glukosetoleranz, **T2D**: Typ 2 Diabetes mellitus
Angabe der Werte als n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl)

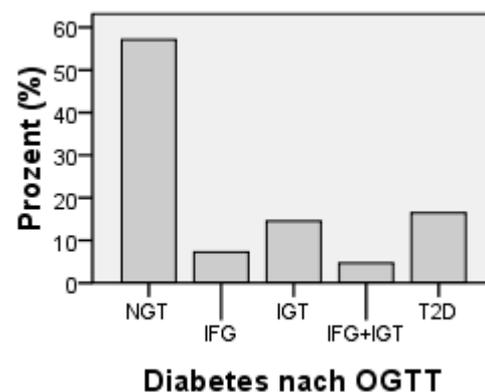


Abb. 12. Charakterisierung der MeSy-BePo-Gesamtkohorte (n=2031) in Abhängigkeit von der glykämischen Stoffwechsellage, basierend auf den Daten des OGTT

Im Folgenden wird analog zum EPIC-Kollektiv eine Charakterisierung der Probanden in Abhängigkeit vom Vorhandensein/Fehlen eines prävalenten T2D vorgenommen, wobei die folgende Tabelle (Tab. 20) einen Überblick über ausgewählte klinische und metabolische Charakteristika gibt:

Tab. 20. Charakterisierung der Studienkohorte MeSy-BePo stratifiziert nach Fall¹/Kontroll²

Parameter	T2D ¹ (n=334)	Kontrollen ² (n=1160)	p-Wert
Alter (Jahre)	60,10 ± 9,99	48,72 ± 13,64	< 0,001
Geschlecht (mä/w)	151/181	368/786	< 0,001
BMI (kg/m ²)	32,13 ± 6,82	28,11 ± 5,61	< 0,001
WHR	0,94 ± 0,09	0,87 ± 0,10	< 0,001
Adiponectin (µg/ml)	11,10 ± 9,48	12,28 ± 5,98	0,071
HbA1c (%)	6,55 ± 3,53	5,37 ± 2,48	< 0,001
Gesamtcholesterin (mmol/l)	5,45 ± 1,13	5,35 ± 1,08	0,096
HDL (mmol/l)	1,31 ± 0,35	1,44 ± 0,35	< 0,001
LDL (mmol/l)	3,29 ± 0,98	3,32 ± 0,93	0,821
TG (mmol/l)	1,89 ± 1,03	1,28 ± 0,70	< 0,001
Blutdruck diastolisch (mmHg)	81,20 ± 11,56	76,81 ± 10,79	< 0,001
Blutdruck systolisch (mmHg)	144,27 ± 20,96	132,60 ± 17,11	< 0,001
Rauchen aktuell (n/%)	23 (6,9%)	147 (12,7%)	0,013

* 1 = T2D; 2 = NGT

Angabe der Werte in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. n (absolute Fallzahl) in % (relative Fallzahl).

Die Berechnung kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem t-Test für normalverteilte Parameter bzw. mithilfe der einfaktoriellen Anova für nach Logarithmierung normalverteilter Parameter. Die Berechnung nicht normal verteilter kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Berechnung kategorialer Parameter erfolgte mit dem chi²-Test.

Es wird ersichtlich, dass die Typ-2-Diabetiker im Vergleich zu den Kontrollen signifikant älter waren und der Anteil der Frauen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Fallgruppe signifikant erhöht war. Weiterhin wiesen die Typ-2-Diabetiker signifikant höhere Werte für die anthropometrischen Parameter (BMI, WHR) sowie höhere systolische und diastolische Blutdruckwerte auf. Ebenfalls ließen sich erhöhte Triglyceridspiegel sowie ein erniedrigtes HDL nachweisen. Des Weiteren zeigte sich, dass die Adiponectinspiegel in der Kontrollgruppe höher waren, wobei sich hier keine statistische Signifikanz verzeichnen ließ.

3.3.1 Häufigkeitsverteilung der Promotorpolymorphismen im AdipoQ- Gen in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte

Die Genotypfrequenzen für die 3 Promotorpolymorphismen befanden sich in der Fallgruppe (prävalenter T2D) im Hardy-Weinberg-Equilibrium [(p)chi² rs266726 = 0,53; (p)chi² rs17300539 = 0,45; (p)chi² rs16861194 = 3,64].

In der Kontrollgruppe (NGT) kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit [(p)chi² rs266726 = 0,32; (p)chi² rs17300539 = 1,24; (p)chi² rs16861194 = 0,92]. Die Annahme der Nullhypothese erfolgte bei einem [(p)chi² < 3,84].

Es folgt, analog zur EPIC-Kohorte, eine Darstellung der Genotypfrequenzen der 3 Promotorpolymorphismen in tabellarischer sowie graphischer (Abb. 13) Form in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.

rs266729	Häufigkeit n (%)	rs17300539	Häufigkeit n (%)	rs16861194	Häufigkeit n (%)
CC	926 (54,2)	GG	1442 (84,1)	AA	1451 (84,1)
CG	673 (39,4)	GA	253 (14,8)	AG	250 (14,6)
GG	111 (6,5)	AA	20 (1,2)	GG	16 (0,9)
Gesamt	1710 (100,0)		1715 (100,0)		1717 (100,0)

Angabe der Werte in n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl).

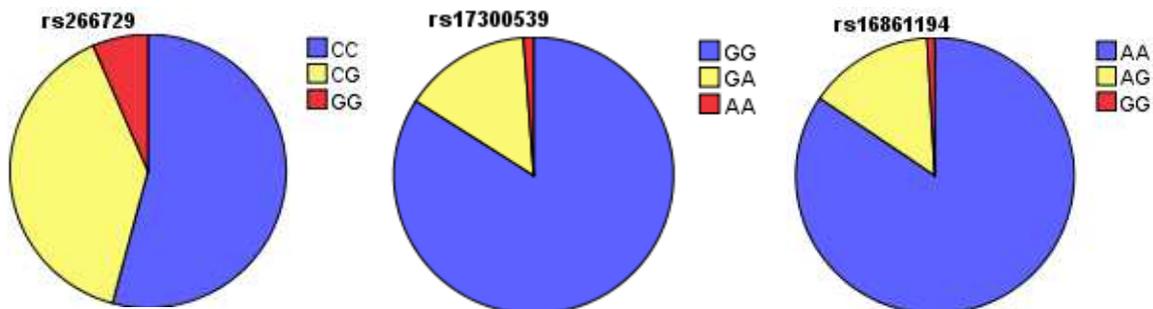


Abb. 13. Tabellarische und graphische Darstellung der Genotypfrequenzen der 3 Promotorpolymorphismen in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.

3.3.2 Klinische Charakteristika der 3 Promotorpolymorphismen im dominanten Modell in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte

Anschließend wurde analog zum EPIC-Kollektiv untersucht, ob sich die klinischen und metabolischen Charakteristika der Probanden in Abhängigkeit vom Genotyp unterscheiden. Hier wurde wiederum für alle 3 Polymorphismen das dominante Modell gewählt, um Verfälschungen, bedingt durch die niedrige Frequenz der homozygoten Mutanten zu vermeiden.

Ein Überblick über die Charakteristika in Abhängigkeit vom Genotyp für den rs266729 findet sich in der folgenden Tabelle (Tab. 21):

Tab. 21. Vergleich von klinischen und metabolischen Charakteristika des Promotorpolymorphismus rs266729 in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte

Parameter	CC	GC/GG	p-Wert
Alter (Jahre)	52,21 ± 13,83	52,82 ± 13,49	0,369
Geschlecht (mä/w)	287/631	282/501	0,038
BMI (kg/m ²)	29,19 ± 6,54	29,00 ± 6,15	0,908
WHR	0,89 ± 0,10	0,89 ± 0,10	0,497
Adiponectin (µg/ml)	12,31 ± 6,42	11,44 ± 6,88	0,058
HbA1c (%)	5,57 ± 1,98	5,70 ± 3,17	0,361
Gesamtcholesterin (mmol/l)	5,37 ± 1,05	5,46 ± 1,07	0,142
HDL (mmol/l)	1,41 ± 0,36	1,41 ± 0,35	0,999
LDL (mmol/l)	3,30 ± 0,91	3,39 ± 0,97	0,075
TG (mmol/l)	1,47 ± 0,86	1,45 ± 0,83	0,655
Blutdruck diastolisch (mmHg)	77,58 ± 10,56	77,81 ± 11,16	0,181
Blutdruck systolisch (mmHg)	124,70 ± 17,37	126,32 (17,46	0,055
Rauchen aktuell (n/%)	94 (10,20%)	78 (9,90%)	0,681

Angabe der Werte in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. n (absolute Fallzahl) in % (relative Fallzahl).

Die Berechnung kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem t-Test für normalverteilte Parameter bzw. mithilfe der einfaktoriellen Anova für nach Logarithmierung normalverteilter Parameter. Die Berechnung nicht normal verteilter kontinuierlicher Parameter erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Berechnung kategorialer Parameter erfolgte mit dem chi²-Test. Alle Berechnungen erfolgten im dominanten Modell.

Es wird ersichtlich, dass sich die Adiponectinspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unterscheiden, dies allerdings nur im Trend ($p = 0,058$). Hier muss jedoch festgehalten werden, dass in der Gesamtkohorte auch Diabetespatienten eingeschlossen waren. In der EPIC-Kohorte waren im Vergleich dazu alle Probanden zum Zeitpunkt der Blutabnahme gesund.

Träger des Wildtyps (CC) wiesen hier im Vergleich mit Probanden, welche hetero- bzw. homozygot (CG/GG) für das variante Allel waren, höhere zirkulierende Adiponectinspiegel auf. Die anderen Parameter unterschieden sich beim Promotorpolymorphismus rs266729, wie auch bei den Promotorpolymorphismen rs17300539 und rs16861194 nicht wesentlich, so dass an dieser Stelle auf eine ausführliche Darstellung verzichtet wird und eine Analyse der Assoziationen der 3 Einzelnukleotidpolymorphismen mit den zirkulierenden Adiponectinspiegel folgt (Kapitel 3.3.3).

3.3.3 Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit den Adiponectinspiegeln in allen Probanden ohne einen manifesten Diabetes mellitus Typ 2 des MeSy-BePo-Kollektives

Die statistische Auswertung der Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln erfolgte nur bei Probanden, die keinen manifesten T2D aufwiesen, um einen potentiellen Einfluss, bedingt durch das Vorliegen der Erkrankung zu vermeiden. Hier wurde analog zum EPIC-Kollektiv das dominante Modell gewählt. Im

Folgenden sind die Ergebnisse in tabellarischer (Tab. 22) sowie graphischer (Abb. 14) Form dargestellt.

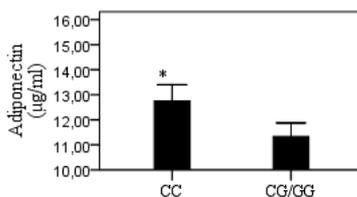
Tab. 22. Assoziation der Promotorpolymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln in Probanden ohne prävalenten T2D in der MeSy-BePo-Kohorte

Einzelnukleotidpolymorphismus	Ohne Adjustierung	Multivariate Adjustierung ¹
rs266729 (n)		
Adiponectinspiegel CC (381)	12,75 ± 0,297	12,57 ± 0,273
Adiponectinspiegel CG/GG (317)	11,34 ± 0,326	11,55 ± 0,299
p-Wert	0,001	0,012
rs17300539 (n)		
Adiponectinspiegel GG (600)	11,80 ± 0,237	11,88 ± 0,217
Adiponectinspiegel AG/AA (98)	14,01 ± 0,585	13,49 ± 0,538
p-Wert	< 0,0001	0,006
rs16861194 (n)		
Adiponectinspiegel AA (579)	12,35 ± 0,242	12,27 ± 0,221
Adiponectinspiegel GA/GG (119)	10,91 ± 0,533	11,28 ± 0,491
p-Wert	0,014	0,066

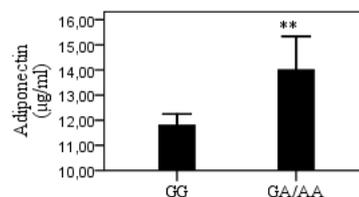
Angabe der Werte in Mittelwert ± Standardfehler bzw. n (absolute Fallzahl).

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression ohne und mit (1) multivariater Adjustierung (Alter, Geschlecht, BMI). Probanden mit einem manifesten T2D wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

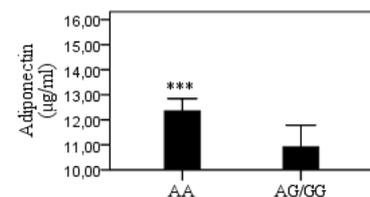
rs266729



rs17300539



rs16861194



* p im Trend = 0,012; **p = 0,006 ; ***p im Trend = 0,066

Abb. 14. Graphische Darstellung der Assoziation der zirkulierenden Adiponectinspiegel mit den 3 Promotorpolymorphismen in der MeSy-BePo-Kohorte (Probanden ohne prävalenten T2D)

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit multivariater Adjustierung (Alter, Geschlecht, BMI). Probanden mit einem manifesten T2D wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Es zeigte sich sowohl vor, als auch nach multivariater Adjustierung (Alter, Geschlecht, BMI) eine signifikante Assoziation des Polymorphismus rs17300539 mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln. Die Promotorpolymorphismen rs266729 und rs16861194 sind nach multivariater Adjustierung im Trend mit den Plasmaadiponectinspiegeln assoziiert (p = 0,012 bzw. p = 0,066).

In Anlehnung zum EPIC-Kollektiv erfolgte die Berechnung des prozentualen Anteils des Promotorpolymorphismus rs17300539 an der Variabilität des zirkulierenden Adiponectinspiegels (Tab. 23):

Tab. 23. Anteil des rs17300539 an der genetischen Variabilität der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel

SNP	Standardisiertes β	Partielle Korrelation	Standardisiertes β x partielle Korr. x 100 (%)	P-Wert
rs17300539	- 0,096	- 0,105	1,01	0,006

Die Berechnung erfolgte im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit multivariater Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI.

Es zeigte sich, dass die Variabilität des zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegels zu 1,01% durch den Promotorpolymorphismus rs17300539 bestimmt wird.

3.3.4 Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem Diabetes mellitus Typ 2 in der MeSy-BePo-Kohorte

Nachdem sich eine Assoziation der Polymorphismen mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln nachweisen ließ, stellt sich nun die Frage, ob sich die Typ-2-Diabetiker hinsichtlich ihres Genotyps von den Probanden mit einer normalen Glukosetoleranz unterscheiden. Ein Überblick über die Ergebnisse findet sich in der folgenden Abbildung (Abb. 15):

SNP		CC n(%)	CG/GG n(%)	p-Wert
rs266729	Fall ¹	160 (54,4)	134 (45,6)	0,688
	Kontroll ²	535 (55,8)	424 (44,2)	
SNP		GG (%)	GA/AA (%)	p-Wert
rs17300539	Fall ¹	249 (84,1)	47 (15,9)	0,854
	Kontroll ²	813 (84,6)	148 (15,4)	
SNP		AA (%)	AG/GG (%)	p-Wert
rs16861194	Fall ¹	244 (81,9)	54 (18,1)	0,171
	Kontroll ²	818 (85,2)	142 (14,8)	

* 1 = manifester T2D; 2 = NGT

Angabe der Werte als n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl)

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung des exakten Test nach Fisher

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung des exakten Test nach Fisher (oberer Teil der Abbildung) sowie im logistischen Regressionsmodell mit multivariater Adjustierung für das Alter, das Geschlecht und den BMI (unterer Teil der Abbildung).

SNP	OR	95%-Konfidenzintervall
rs266729	1,021	0,757 – 1,376
rs17300539	1,121	0,746 – 1,686
rs16861194	1,400	0,937 – 2,092

Angabe der Werte als OR (odds ratio) bzw. 95%- Konfidenzintervall

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der logistischen Regression mit multivariater Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI.

Abb. 15. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D in der MeSy-BePo-Kohorte stratifiziert nach Fall /Kontroll (prävalenter T2D/normale Glukosetoleranz).

Es wird ersichtlich, dass sowohl vor, als auch nach multivariater Adjustierung (Alter, Geschlecht, BMI) keine Assoziation zwischen den Genotypen der 3 Promotorpolymorphismen und einer prävalenten diabetischen Stoffwechsellage bestand.

3.3.5 Assoziation der Promotorpolymorphismen mit dem T2D unter Einbeziehung intermediärer Phänotypen in der MeSy-BePo-Kohorte – 2 Modelle

Nachdem sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Genotypverteilung der 3 Promotorpolymorphismen zwischen gesunden und an T2D erkrankten Probanden ergab, wurde im folgenden mit Hilfe der Daten aus dem OGTT, welche eine bessere Charakterisierung des Glukosemetabolismus ermöglichen, zunächst untersucht, ob eine Assoziation zwischen den Genotypen und dem T2D unter Einbeziehung seiner Vorstufen (IFG, IGT) besteht. Hierzu wurden zwei Modelle entwickelt, in denen zum einen die Kontrollen und die Vorstufen des T2D (IFG, IGT, IGT + IFG) dem manifestem T2D gegenübergestellt worden sind [Modell 1] und zum anderen [Modell 2] die Kontrollen mit dem manifestem T2D und seinen Vorstufen [= Gruppe mit gestörter Glukosetoleranz (IGM)] verglichen wurden. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen das Ergebnis dieser Modellrechnungen:

SNP		CC (%)	CG/GG (%)	p-Wert
rs266729	Kontroll ¹	766 (54,1)	650 (45,9)	0,949
	T2D ²	160 (54,4)	134 (45,6)	
SNP		GG (%)	GA/AA (%)	p-Wert
rs17300539	Kontroll ¹	1193 (84,1)	226 (15,9)	1,000
	T2D ²	249 (84,1)	47 (15,9)	
SNP		AA (%)	AG/GG (%)	p-Wert
rs16861194	Kontroll ¹	1207 (85,1)	212 (14,9)	0,186
	T2D ²	244 (81,9)	54 (18,1)	

* 1 = NGT, IFG, IGT, IGT+ IFG; 2 = manifester T2D

Angabe der Werte als n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl)

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung des exakten Test nach Fisher

SNP	OR	95%-Konfidenzintervall
rs266729	1,022	0,777 – 1,343
rs17300539	0,988	0,680 – 1,435
rs16861194	1,327	0,922 – 1,911

Angabe der Werte als OR (odds ratio) bzw. 95%- Konfidenzintervall

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der logistischen Regression mit multivariater Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI.

MODELL 1

In diesem Modell wurden die Kontrollen (NGT) und die Vorstufen des T2D (IFG, IGT, IGT + IFG) dem manifestem T2D gegenübergestellt, wobei die Berechnungen im dominanten Modell erfolgten.

Die Ergebnisse sind ohne Adjustierung (oberer Teil der Abbildung) sowie mit multivariater Adjustierung für das Alter, das Geschlecht und den BMI (unterer Teil der Abbildung) dargestellt.

Abb. 16. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D unter Einbeziehung seiner Vorstufen [Modell 1] in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.

SNP		CC (%)	CG/GG (%)	p-Wert
rs266729	Kontroll ¹	535 (55,8)	424 (44,2)	0,130
	IGM ²	391 (52,1)	360 (47,9)	
SNP		GG (%)	GA/AA (%)	p-Wert
rs17300539	Kontroll ¹	813 (84,6)	148 (15,4)	0,507
	IGM ²	629 (83,4)	125 (16,6)	
SNP		AA (%)	AG/GG (%)	p-Wert
rs16861194	Kontroll ¹	818 (85,2)	142 (14,8)	0,383
	IGM ²	633 (83,6)	124 (16,4)	

*1 = NGT; 2 = manifester T2D, IFG, IGT, IGT+ IFG

Angabe der Werte als n (absolute Fallzahl) bzw. % (relative Fallzahl)

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung des exakten Test nach Fisher

SNP	OR	95%-Konfidenzintervall
rs266729	1,209	0,978 – 1,496
rs17300539	1,070	0,802 – 1,428
rs16861194	1,247	0,931 – 1,672

Angabe der Werte als OR (odds ratio) bzw. 95%- Konfidenzintervall

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der logistischen Regression mit multivariater Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI.

MODELL 2

In diesem Modell wurden die Kontrollen (NGT) dem manifesten T2D und seinen Vorstufen (IFG, IGT, IGT + IFG) gegenübergestellt [= IGM], wobei die Berechnungen im dominanten Modell erfolgten.

Die Ergebnisse sind ohne Adjustierung (oberer Teil der Abbildung) sowie mit multivariater Adjustierung für das Alter, das Geschlecht und den BMI (unterer Teil der Abbildung) dargestellt.

Abb. 17. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D unter Einbeziehung seiner Vorstufen [Modell 2] in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.

Es wird ersichtlich, dass auch unter Einbeziehung der Vorstufen des T2D keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

Um einen potentiellen Einfluss der Einzelnukleotidpolymorphismen auf die Insulinsensitivität sowie die Insulinsekretion zu eruieren, wird im Folgenden analysiert, ob eine Assoziation mit Indizes des Glukosemetabolismus besteht:

Hierbei kamen als Indizes zur Abschätzung der Insulinsensitivität der ISI_S nach *Stumvoll* (Stumvoll et al. 2000) sowie der $HOMA_{IR}$ nach *Matthews* (Matthews et al. 1985) zur Anwendung. Für die Abschätzung der Insulinsekretion kam die AUC_{ins}/AUC_{gluc} zur Anwendung. In die statistischen Analysen wurden nur Probanden einbezogen, welche keinen prävalenten T2D aufwiesen, da die Indizes bei T2D- Patienten und im speziellen bei unter antidiabetischer Medikation stehenden Probanden nicht reliabel sind (Fischer et al. 2008).

Im Folgenden findet sich eine Übersicht der Ergebnisse in tabellarischer Form (Tab. 24).

Tab. 24 Assoziation der Promotorpolymorphismen mit Indizes des Glukosemetabolismus in der MeSy-BePo-Kohorte

	ISI_S	$HOMA_{IR}$	$AUC_{ins120}/AUC_{gluc120}$	$AUC_{ins180}/AUC_{gluc180}$
rs266729 (n)				
CC(609)	0,083 ± 0,001	1,840 ± 0,043	0,406 ± 0,008	0,386 ± 0,008
CG/GG(507)	0,081 ± 0,001	1,848 ± 0,046	0,397 ± 0,009	0,376 ± 0,009
p-Wert	0,541	0,908	0,455	0,418
rs17300539 (n)				
GG(932)	0,082 ± 0,001	1,851 ± 0,034	0,402 ± 0,007	0,381 ± 0,007
AG/AA(185)	0,082 ± 0,002	1,804 ± 0,078	0,402 ± 0,015	0,382 ± 0,015
p-Wert	0,947	0,576	0,981	0,946
rs16861194 (n)				
AA(960)	0,083 ± 0,001	1,841 ± 0,034	0,402 ± 0,006	0,382 ± 0,006
GA/GG(158)	0,081 ± 0,002	1,858 ± 0,082	0,396 ± 0,016	0,377 ± 0,016
p-Wert	0,346	0,843	0,736	0,752

Angabe der Werte als MW ± Standardfehler bzw. n (Fallzahl).

Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit multivariater Adjustierung für Alter, Geschlecht und BMI. Probanden mit einen prävalenten T2D wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Es zeigte sich, dass weder eine Assoziation zu Indizes, die die Abschätzung der Insulinsensitivität erlauben, noch zu Indizes, die eine Kalkulation der Insulinsekretion ermöglichen, bestand.

Zusammenfassend ließ sich in beiden Kohorten eine Assoziation des Promotorpolymorphismus rs17300539 mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln finden.

Der Promotorpolymorphismus rs16861194 war in beiden Studien nicht signifikant mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert, jedoch wiesen in beiden Kohorten Träger des Wildtyps (AA) im Vergleich zu den hetero-/homozygoten Mutanten tendenziell höhere zirkulierende Adiponectinspiegel auf, wobei hier in der MeSy-BePo-Kohorte mit einem p-Wert von 0,066 ein Trend erkennbar war. Der Polymorphismus rs266729 war in der MeSy-BePo-Kohorte ebenfalls im Trend ($p = 0,012$) mit dem zirkulierenden Adiponectin assoziiert, wobei hier der WT (CC) im dominanten Modell tendenziell höhere Spiegel aufwies. Diese trendmäßige Assoziation konnte in der EPIC-Potsdam-Kohorte nicht repliziert werden.

Es fanden sich jedoch keine Assoziationen der 3 Promotorpolymorphismen in Bezug auf den Endpunkt T2D, seiner Vorstufen (IFG/IGT) oder Indizes der Insulinresistenz /Insulinsekretion, wobei im Rahmen der EPIC-Kohorte in Bezug auf den rs266729 das Ergebnis nicht repliziert werden konnte.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation zeigte sich in zwei unabhängigen Kohorten, dass der Promotorpolymorphismus rs17300539 signifikant mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert ist. Der Promotorpolymorphismus rs16861194 war in beiden Studien nicht signifikant mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert, jedoch fanden sich in beiden Kohorten bei Trägern des Wildtyps (AA) im Vergleich zu Probanden, welche den hetero- bzw. homozygoten Genotyp (GA/GG) aufwiesen tendentiell höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel, wobei in der MeSy-BePo-Kohorte bei einem p-Wert von $p = 0,066$ ein Trend erkennbar war. Ebenfalls liess sich für den Polymorphismus rs266729 in der MeSy-BePo-Kohorte im Trend eine Assoziation mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln aufzeigen ($p = 0,012$), wobei sich dieser in der EPIC-Potsdam-Kohorte nicht replizieren ließ.

Im Vergleich zu gesunden Personen sind die Adiponectinspiegel bei Typ-2-Diabetikern erniedrigt, wobei die Rolle von Adiponectin als prädiktiver Biomarker für den Diabetes mellitus Typ 2 gut etabliert ist. Das AdipoQ-Gen, welches sich auf dem Chromosom 3q27 befindet, liegt zusätzlich in einer genomischen Region, welche mit dem Diabetes mellitus Typ 2 sowie Parametern des metabolischen Syndroms in Zusammenhang gebracht worden ist.

Trotzdem konnte in beiden Kohorten kein Zusammenhang zwischen den untersuchten genetischen Polymorphismen im AdipoQ-Promotor und dem Endpunkt T2D nachgewiesen werden, wobei das Ergebnis für den rs266729 in der EPIC-Potsdam-Kohorte nicht repliziert werden konnte.

Weiterhin ließ sich keine Assoziation in Bezug auf Vorstufen des T2D (IFG/IGT) sowie Indizes der Insulinresistenz/-sekretion (MeSy-BePo-Kohorte) aufzeigen. Dies könnte auf eine unzureichende Power der hier untersuchten Studienkohorten zurückzuführen sein.

4.1 Assoziation der Polymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel

Der Promotorpolymorphismus rs266729 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte

Die Allelfrequenzen für den Promotorpolymorphismus rs266729 kamen in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte in einer Häufigkeit von 0,27 bzw. 0,25 in der Kontrollgruppe sowie mit einer Frequenz von 0,26 in beiden Fallgruppen vor. Somit ergeben sich zwischen den Kohorten keine signifikanten Differenzen. Das Ergebnis ist weiterhin mit den im Rahmen des

internationalen HapMap-Projektes veröffentlichten Allelfrequenzen für die europäische Bevölkerung (0,31) vergleichbar. In der chinesischen und japanischen Bevölkerung werden hier ähnliche Allelfrequenzen angegeben, während in der afrikanischen Bevölkerung der Polymorphismus mit einer Frequenz von 0,09 relativ selten vorkommt (Sherry et al. 2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Es konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass der Promotorpolymorphismus rs266729 in der MeSy-BePo-Kohorte nach multivariater Adjustierung (Alter, Geschlecht, BMI) sowie Korrektur nach Bonferroni im Trend mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln assoziiert ist ($p = 0,012$). In der EPIC-Potsdam-Kohorte fand sich, sowohl vor ($p = 0,008$) als auch nach Adjustierung für den BMI in Verbindung mit einer Korrektur nach Bonferroni ($p = 0,005$), eine signifikante Assoziation mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln, wobei anzumerken ist, dass sich der Promotorpolymorphismus rs266729 nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) befand.

In beiden Kohorten wiesen homo- und heterozygote Mutanten (GG, GC) im Vergleich zum Wildtyp (CC) niedrigere Spiegel auf, wobei das Ergebnis der EPIC-Potsdam-Kohorte aufgrund der Abweichung vom HWE schlussendlich nicht interpretierbar ist. Diese Abweichung ist, dadurch dass Sie in der Kontrollgruppe auftrat, nicht als Hinweis für eine mögliche Assoziation zu werten, sondern eher ein Hinweis auf einen Genotypisierungsfehler (Wigginton et al. 2005) und weniger ein Hinweis auf eine Populationsstratifikation (Schaid et al. 1999), da sich diese Abweichung vom HWE nicht bei allen 3 im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Polymorphismen eruieren ließ. Zusammenfassend wiesen in der MeSy-BePo-Kohorte Probanden, welche den WT aufwiesen im Trend höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel im Vergleich zu Probanden, welche hetero- bzw. homozygot waren, auf.

Die folgende Tabelle (Tab. 25) gibt zunächst einen Überblick über die in der Literatur ermittelten Assoziationen in Bezug auf die zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel, wobei hier nur Studien berücksichtigt wurden, in denen Probanden mit europäischem genetischen Background untersucht wurden:

Tab. 25. Assoziation des Promotorpolymorphismus rs266729 (C>G) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln

Studie	Land	Fallzahl absolut	Spiegelbestimmung bei prävalentem T2D	Assoziation zum zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel	Adjustierung/matching
EPIC-Potsdam	Deutschland	563	nein	CC vs. CG/GG ↑ [HWE nicht gegeben]	BMI, matching: Alter, Geschlecht
MeSy-BePo	Deutschland	698	nein	CC vs. CG/GG ↑ im Trend [p = 0,012]	BMI, Alter, Geschlecht
Fumeron et al. 2004	Frankreich	458	nein	=	matching: BMI, Alter, Geschlecht
Hivert et al. 2008b (prospektiv: 28 a follow up)	Amerika (überwiegend Europäer)	1921	ja	=	BMI, Alter, Alter n. 28a, Geschlecht
Laumen et al. 2009 KORA S4	Deutschland	696	ja (keine antidiab. Med.)	=	BMI, Alter, Geschlecht
Laumen et al. 2009 MONICA/KORA S123	Deutschland	1692	ja (keine antidiab. Med.)	A↑ [rs1648707 anstelle von rs266729, da $D' = 1$ und $r^2 = 0,84$]	BMI, Alter, Geschlecht, survey
Schwarz et al. 2006	Deutschland	550	ja (keine antidiab. Med.)	CC vs. CG ↑	BMI, Alter, Geschlecht
Vasseur et al. 2002	Frankreich	922	ja	C ↑	BMI, Alter, Geschlecht
Vasseur et al. 2005	Frankreich	703	ja (keine antidiab. Med.)	C ↑	BMI, Alter, Geschlecht

* ↑ positive Assoziation, = keine Assoziation, D' : Maß für das Kopplungsungleichgewicht (LD), wobei $D' = 1$ bedeutet, dass ein komplettes Kopplungsungleichgewicht vorliegt, r^2 : Korrelation zwischen dem untersuchten tag-SNP und dem SNP, dessen Effekt durch das bestehende Kopplungsungleichgewicht analysiert werden kann, wobei bei einem r^2 von 1 eine 100 %-ige Ableitung des einen Genotyps von dem anderen möglich ist [perfect proxy], (de Bakker et al. 2005). Ergebnisse die im Rahmen dieser Dissertation ermittelt wurden sind blau hervorgehoben.

Im Vergleich mit der Literatur war die im Rahmen dieser Dissertation gesehene trendmäßige Assoziation in folgenden publizierten Ergebnissen signifikant: Laumen et al. 2009 [MONICA/KORA S123-Kohorte], Schwarz et al. 2006, Vasseur et al. 2002; 2005.

Weder eine signifikante noch trendmäßige Assoziation zeigte sich in folgenden Publikationen: Fumeron et al. 2004, Hivert et al. 2008b, Laumen et al. 2009 [KORA S4-Kohorte].

Dies kann unterschiedliche Gründe haben: zum einen könnte die Studiengröße und die daraus resultierende Power eine Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse sein. So ist die Studie von Fumeron et al. 2004, welche keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und den zirkulierenden Adiponectinspiegeln aufzeigen konnte, mit 458 Probanden im Vergleich zu den anderen Studien mit Abstand die kleinste.

Auf der anderen Seite wurde in der KORA S4-Kohorte mit 696 Probanden, einer Studie, die in Bezug auf die Größe mit der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Studien vergleichbar ist, weder eine signifikante noch eine Assoziation im Trend gefunden (Laumen et al. 2009), möglicherweise bedingt dadurch, dass hier Probanden mit einem T2D in die Analyse mit einbezogen worden sind. Dies könnte einen Einfluss auf das Ergebnis haben, zumal T2D-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zumeist niedrigere Plasmaadiponectinspiegel aufweisen (Hotta et al. 2000, Weyer et al. 2001).

Weiterhin war in der mit 1692 Probanden mehr als doppelt so großen MONICA/KORA S123-Kohorte die im Rahmen dieser Dissertation gesehene trendmäßige Assoziation (MeSy-BePo-Kohorte) mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln signifikant (Laumen et al. 2009), was für die bereits erwähnte Erklärung der Studiengröße für die divergenten Ergebnisse spräche, wobei hier ebenfalls Patienten mit einem inzidenten T2D in die Analyse mit einbezogen wurden. Zu beachten ist weiterhin, dass in der letztgenannten Studie bei Vorliegen eines kompletten Kopplungsungleichgewichtes ($D' = 1$) der rs1648707 als „proxy“ für den rs266729 analysiert wurde, wobei hier mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,84$ zwar das in der Literatur akzeptierte Niveau von $r^2 = 0,80$ erreicht wurde, was wiederum jedoch zur Folge hat, dass sich der Genotyp des rs266729 nicht zu 100 % [$r^2 = 1,00$] von dem Genotyp des rs1648707 ableiten lässt (de Bakker et al. 2005). Somit ist ein direkter Vergleich dieser Studie mit der MeSy-Bepo-Kohorte sichtlich erschwert.

Weiterhin hat die Arbeitsgruppe um *Meigs* in einer verhältnismäßig großen Studie (1921 Probanden) T2D-Patienten in die Analyse einbezogen, welche unter antidiabetischer Medikation standen. Unter der Annahme, dass dem Adiponectin eine kausale Bedeutung in der Pathogenese des T2D zukommt, könnte dies die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben (Hivert et al.

2008b) und somit ebenfalls ein Grund für die Diskrepanz des Ergebnisses (keine vs. eine trendmäßige Assoziation) in Bezug auf das Resultat der vorliegenden Arbeit sein.

Diese Vermutung wird weiterhin dadurch unterstützt, dass die Therapie mit Thiazolidinedionen zumeist mit einem Anstieg der Adiponectinspiegel einhergeht (Combs et al. 2002, Yang et al. 2002, Yu et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Studienkollektive insgesamt sehr heterogen sind, was einen direkten Vergleich erschwert, wenn nicht gar unmöglich macht.

Hinweise für die Beteiligung des rs266729 an der Modulation der Spiegel kommen von der Analyse der Promotorregion sowie funktionellen Studien. So konnte die Arbeitsgruppe um Gu vier SP-1 Bindungsstellen im Promotor des AdipoQ- Gens identifizieren, wobei es sich hier um Bindungsstellen für Proteine handelt, welche einen stimulierenden Einfluss auf die Transkription haben (Zhang et al. 2009).

Die Arbeitsgruppe um Gu konnte weiterhin aufzeigen, dass der Polymorphismus rs266729 eine der vier SP-1 Bindungsstellen verändert (Zhang et al. 2009), wobei *in vitro* Untersuchungen ergaben, dass die SP1-Bindungsaffinität während der Adipozytendifferenzierung gesteigert ist und einen stimulierenden Einfluss auf die Promotoraktivität hat (Barth et al. 2002), wobei bei Vorliegen des Polymorphismus im Vergleich zur Wildtyp-Probe die Bindungsaffinität um 25% reduziert war (Bouatia-Naji et al. 2006).

Der Promotorpolymorphismus rs17300539 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte

Die Allelfrequenzen für den Promotorpolymorphismus rs17300539 kamen in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte in einer Häufigkeit von 0,08 in der Kontrollgruppe sowie mit einer Frequenz von 0,06 bzw 0,08 in den Fallgruppen [EPIC-Potsdam- bzw. MeSy-BePo-Kohorte] vor. Auch hier ergeben sich sowohl zwischen den Studien als auch im Vergleich zu den im Rahmen des internationalen HapMap-Projektes (0,083) veröffentlichten Allelfrequenzen für den europäischen Raum keine signifikanten Differenzen. In der chinesischen, japanischen sowie afrikanischen Bevölkerung kommt der Polymorphismus nach den Angaben des HapMap-Projektes nicht vor (Sherry et al. 2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Es konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass sowohl in der EPIC-Kohorte, als auch in der MeSy-BePo- Kohorte homo- und heterozygote Mutanten (AA, AG) im Vergleich

zum Wildtyp (GG) statistisch signifikant höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel aufwiesen.

Es folgt analog zum rs266729 ein tabellarischer Überblick (Tab. 26) über die in der Literatur ermittelten Assoziationen in Bezug auf die zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel:

Tab. 26. Assoziation des Promotorpolymorphismus rs17300539(G>A) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln

Studie	Land	Fallzahl absolut	Spiegelbestimmung bei prävalentem T2D	Assoziation zum zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel	Adjustierung/matching
EPIC-Potsdam	Deutschland	563	nein	AG/AA vs. GG ↑	BMI, matching: Alter, Geschlecht
MeSy-BePo	Deutschland	698	nein	AG/AA vs. GG ↑	BMI, Alter, Geschlecht
Fumeron et al. 2004	Frankreich	458	nein	AG/AA vs. GG ↑	matching: BMI, Alter, Geschlecht
Heid et al. 2006	Österreich	1727	nein	AG/AA vs. GG ↑	Alter, Geschlecht
Hivert et al. 2008b (prospektiv: 28 a follow up)	Amerika (überwiegend Europäer)	1929	ja	A ↑ (add. Modell)	BMI, Alter, Alter nach 28 a, Geschlecht
Laumen et al. 2009 KORA S4	Deutschland	696	ja (keine antidiab. Med.)	A ↑ (add., dom. Modell)	BMI, Alter, Geschlecht
Laumen et al. 2009 MONICA/KORA S123	Deutschland	1692	ja (keine antidiab. Med.)	A ↑ (add., dom. Modell)	BMI, Alter, Geschlecht, survey
Schwarz et al. 2006	Deutschland	550	ja (keine antidiab. Med.)	AG vs. GG ↑	BMI, Alter, Geschlecht
Vasseur et al. 2002	Frankreich	922	ja	A ↑	BMI, Alter, Geschlecht
Vasseur et al. 2005	Frankreich	703	nein (keine antidiab. Med.)	A ↑	BMI, Alter, Geschlecht

* ↑ positive Assoziation. Ergebnisse die im Rahmen dieser Dissertation ermittelt wurden sind blau hervorgehoben

Es zeigt sich eine ausgesprochene Homogenität der Studien (incl. der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Studien) in Bezug auf die Assoziation des Polymorphismus mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel.

Somit konnte das Ergebnis im Rahmen dieser Dissertation in 2 voneinander unabhängigen Kohorten bestätigt werden.

Aufgrund der Homogenität der Ergebnisse könnte man vermuten, dass der rs17300539 an der Modulation der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel beteiligt ist.

In der Tat gibt es erste Hinweise von funktionellen *in vitro* Untersuchungen: so konnte die Arbeitsgruppe um *Philippe Froguel* im Gen-Reporter-Experiment unter Verwendung von COS-7 Zellen nachweisen, dass der Polymorphismus im Vergleich zur basalen Promotoraktivität eine 2,5 fache Steigerung der Transkriptionsaktivität bewirkt (Bouatia-Naji et al. 2006).

Der Promotorpolymorphismus rs16861194 in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte

Der Promotorpolymorphismus rs16861194 kam in beiden Studien mit einer Frequenz von 0,08, jeweils in der Kontrollgruppe vor, während die Allelfrequenz in den Fallgruppen 0,06 bzw. 0,1 [EPIC-Potsdam- bzw. MeSy-BePo-Kohorte] betrug.

Wiederum zeigten sich keine Differenzen, sowohl zwischen den Studien, als auch im Vergleich zu den im Rahmen des internationalen HapMap-Projektes veröffentlichten Allelfrequenzen für den europäischen Raum (0,07). In der afrikanischen Bevölkerung ist der Polymorphismus mit einer Frequenz von 0,32 im Vergleich zu der restlichen Bevölkerung am häufigsten vertreten (Sherry et al. 2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Im Rahmen der EPIC-Potsdam-Kohorte wies der Wildtyp (AA) im Vergleich zum homo- und heterozygoten Mutanten (GG, GA) höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel auf, wobei das Ergebnis jedoch statistisch nicht signifikant war ($p = 0,107$). Auch in der MeSy-BePo-Kohorte wiesen Träger des Wildtyps (AA) im Vergleich zu Probanden, welche homo- und heterozygot für den Polymorphismus (GG, AA) waren, höhere Konzentrationen von Adiponectin im Plasma auf, wobei diese Assoziation sich analog zur EPIC-Kohorte als statistisch nicht signifikant herausstellte, jedoch war hier mit einem p-Wert von 0,066 ein Trend erkennbar.

Es folgt analog ein tabellarischer Überblick (Tab. 27) über die in der Literatur ermittelten Assoziationen in Bezug auf die zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel:

Tab. 27. Assoziation des Promotorpolymorphismus rs16861194 (A>G) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln

Studie	Land	Fallzahl absolut	Spiegelbestimmung bei prävalentem T2D	Assoziation zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel zum	Adjustierung/matching
EPIC-Potsdam	Deutschland	563	nein	=	BMI matching: Alter, Geschlecht
MeSy-BePo	Deutschland	698	nein	AA vs. GA/GG↑ im Trend (p = 0,066)	BMI, Alter, Geschlecht
Hivert et al. 2008b (prospektiv: 28 a follow up)	Amerika (überwiegend Europäer)	1942	ja	=	BMI, Alter, Alter n. 28a, Geschlecht
Laumen et al. 2009 KORA S4	Deutschland	696	ja (keine antidiab. Med.)	=	BMI, Alter, Geschlecht
Laumen et al. 2009 MONICA/KORA S123	Deutschland	1692	ja (keine antidiab. Med.)	A↑ (add., dom. Modell)	BMI, Alter, Geschlecht, survey
Vasseur et al. 2002	Frankreich	922	ja	=	BMI, Alter, Geschlecht

*↑ positive Assoziation, = keine Assoziation. Ergebnisse die im Rahmen dieser Dissertation ermittelt wurden sind blau hervorgehoben

Es zeigt sich im Vergleich mit der Literatur, dass die Assoziation des Polymorphismus rs16861194 mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln bisher zu kontroversen Ergebnissen führte. So konnte im europäischen Raum die Arbeitsgruppe um *Hans Hauner* [KORA S4-Kohorte] sowie die Arbeitsgruppe um *Philippe Froguel* analog zu der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Studien keine signifikante Assoziation nachweisen (Laumen et al. 2009, Vasseur et al. 2002).

Jedoch wiesen in der KORA S4-Kohorte, welche 696 Probanden umfasste, wie auch in der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Kohorten, welche mit 563 (EPIC-Potsdam) bzw. 698 Probanden (MeSy-BePo) eine vergleichbare Studiengröße aufweisen, Träger des Wildtyps im Vergleich zum hetero- und homozygoten Mutanten tendenziell höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel auf (Laumen et al. 2009).

Diese Assoziation war weiterhin in der größeren Monica-S123-Kohorte mit 1692 Probanden statistisch signifikant (Laumen et al. 2009). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der Einfluss des rs16861194 auf die zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel im Vergleich zu dem rs17300539 sehr klein ist und somit die Power der Studien (einige Hundert Fälle und Kontrollen) zu gering ist, um diese Assoziation zu detektieren.

Andererseits ließ sich in der Framingham-offspring-Studie [FOS] mit 1942 Probanden keine statistische Signifikanz ($p = 0,53$) verzeichnen (Hivert et al. 2008b).

Hier könnte wiederum die Tatsache, dass Probanden unter antidiabetischer Medikation in die Studie eingeschlossen wurden, zu einer Beeinflussung des Ergebnisses geführt haben (Hivert et al. 2008b). Ein potentieller Einfluss, bedingt durch die antidiabetische Medikation konnte hingegen in der Monica-S123-Kohorte ausgeschlossen werden, wobei hier mit einem p-Wert von 0,002 (Laumen et al. 2009) eine ausreichende statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte (Wilkening et al. 2009). Auf der anderen Seite wurde in der Monica-S123-Kohorte ein potentieller Bias, bedingt durch das Vorliegen eines T2D nicht ausgeschlossen.

Hinweise, die für eine Beteiligung des rs16861194 an der Modulation der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel sprechen, stammen von funktionellen Studien:

so konnte die Arbeitsgruppe um *Hans Hauner* im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen unter Verwendung von 3T3L1-Zellen (Mausadipozyten) und Promotorkonstrukten, welche alle die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Promotorpolymorphismen enthielten, aufzeigen, dass das MMM-Konstrukt (WT-Allel: rs16861194_ rs17300539_ rs266729) im Vergleich mit dem mMM-Konstrukt [m = minor-Allel (Polymorphismus)] am Tag 8 der Adipozytendifferenzierung eine 3-fach höhere Promotoraktivität aufwies. Zudem wiesen diejenigen Promotor-

konstrukte, welche das m-Allel des rs16861194 enthielten im Vergleich zum MMM-Konstrukt bereits eine gestörte basale Promotoraktivität in Präadipozyten auf (Laumen et al. 2009).

Weiterführende Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass der APM1-Genpromotor (AdiPose Most abundant gene transcript 1) in den Promotorkonstrukten mit dem m-Allel des rs16861194 nicht durch Rosiglitazone induzierbar war, jedoch waren diejenigen Promotorkonstrukte, welche das Wildtyp-Allel enthielten durch Rosiglitazone induzierbar, wobei hier je nach Promotorkonstrukt eine 2-5 fache Induktion des APM1-Genpromotors im Vergleich zu den Kontrollen aufgezeigt werden konnte. Somit könnte das Ansprechen des Menschen auf eine Therapie mit Thiazolidinedionen sich möglicherweise je nach Kombination dieser Haplotypen unterscheiden und somit den AdipoQ- Promotorpolymorphismen eine Bedeutung in Hinblick auf eine verbesserte individuelle Therapie zukommen (Laumen et al. 2009).

Zusammenfassend unterstützen die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse eine Reihe von mittlerweile publizierten Daten. Insbesondere bei Kohorten, die einen prävalenten Diabetes nicht ausgeschlossen haben, zeigte sich keine einheitliche Assoziation zwischen Polymorphismen und Adiponectinspiegeln. Künftige Studien sollten eine ausreichende Power haben, um Haplotypenkombinationen analysieren zu können.

4.2 Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem Typ 2 Diabetes, seiner Vorstufen (IFG/IGT) und Indizes des Glukosemetabolismus

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass in der EPIC-Potsdam-Kohorte die Promotorpolymorphismen rs17300539 und rs16861194 nicht mit dem T2D assoziiert sind. Analog hierzu konnte auch in der MeSy-BePo-Kohorte keine Assoziation nachgewiesen werden. In Bezug auf den rs266729 konnte in beiden Kohorten ebenfalls keine Assoziation aufgezeigt werden, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass dieser Polymorphismus sich in der EPIC-Potsdam-Kohorte nicht im HWE befand.

In Ergänzung zum Endpunkt T2D konnten in der MeSy-BePo-Kohorte keine Assoziationen der 3 Promotorpolymorphismen in Bezug auf die Vorstufen des Diabetes mellitus Typ 2 sowie den Indizes des Glukosemetabolismus nachgewiesen werden.

Die folgende Tabelle (Tab. 28) gibt einen Überblick über die in der Literatur ermittelten Assoziationen in Bezug auf den T2D incl. seiner Vorstufen sowie Indizes des Glukosemetabolismus, wobei hier analog nur Studien berücksichtigt wurden, in denen Probanden mit europäischem genetischen Background untersucht wurden.

Tab. 28. Assoziation der Promotorpolymorphismen rs266729, rs17300539 sowie des rs16861194 zum T2D, seiner Vorstufen sowie Indizes des Glukosemetabolismus

Studie	Land	Kontroll ¹ / Fall ^{2,3}	Assoziationen des rs266729 zum T2D, seiner Vorstufen + Indizes des Glukosemetabolismus	Assoziationen des rs17300539 zum T2D, seiner Vorstufen + Indizes des Glukosemetabolismus	Assoziationen des rs16861194 zum T2D, seiner Vorstufen + Indizes des Glukosemetabolismus	Adjustierung/matching
EPIC-Potsdam (prosp.: 2a follow up)	Deutschland	387/176	= T2D [HWE nicht gegeben]	= T2D	= T2D	BMI, matching: Alter, Geschlecht
MeSy-BePo	Deutschland	959/294	= T2D; = ISI _S ⁴ ; = HOMA _{IR} ⁴ ; = AUC _{ins} /AUC _{gluc} [120 bzw.180 min.] ⁴ [HWE nicht gegeben]	= T2D; = ISI _S ⁴ ; = HOMA _{IR} ⁴ ; = AUC _{ins} /AUC _{gluc} [120 bzw.180 min.] ⁴	= T2D; = ISI _S ⁴ ; = HOMA _{IR} ⁴ ; = AUC _{ins} /AUC _{gluc} [120 bzw.180 min.] ⁴	BMI, Alter, Geschlecht
Fumeron et al. 2004 (prosp.: 3a follow up)	Frankreich	4510/229 [IFG + T2D]	= (IFG /T2D vs. NGT)	AG/AA vs. GG ↑(T2D/IFG vs. NGT)	nicht getestet	BMI, Alter, Geschlecht, WHR, Insulin, Glukose, Veränderung KG+WHR
Hivert et al. 2008b (prosp.: 28 a follow up)	Amerika (größtenteils Europäer)	2225/244	= T2D; = HOMA _{IR} ; = [ISI(0,120)]	= T2D; = HOMA _{IR} ; = [ISI(0,120)]	= T2D; = HOMA _{IR} ; = [ISI(0,120)]	BMI, Alter, Alter n. 28a, Geschlecht
Schwarz et al. 2006	Deutschland	254/76	= T2D	= T2D	nicht getestet	nicht adjustiert
Vasseur et al. 2002	Frankreich	691/620	G↑ T2D; = HOMA _{IR} ; = HOMA-S	= T2D; = HOMA _{IR} ; = HOMA-S	= T2D; = HOMA _{IR} ; = HOMA-S	nicht adjustiert
Vasseur et al. 2005	Frankreich	270/231	= T2D	= T2D	nicht getestet	nicht adjustiert
Gu et al. 2004	Schweden	486/103 [IGT: 314]	G ↑ T2D vs. NGT ; = HOMA _{IR} (NGT + IGT)	= T2D vs. IGT = T2D vs. NGT	G ↑ T2D vs. NGT ; = HOMA _{IR} (NGT + IGT)	HOMA _{IR} : BMI

* 1: NGT, 2: manifester T2D, wobei Abweichungen in eckigen Klammern angegeben sind. 3: Die Fallzahlen (Kontroll, Fall)beziehen sich auf den rs266729, für die jeweiligen anderen Polymorphismen kam es zu geringen Abweichungen der analysierten Probanden, wobei diese so gering waren, dass auf eine ausführliche Darstellung im Rahmen dieser Dissertation verzichtet wird. 4: Analyse bei Probanden, welche keinen prävalenten T2D aufwiesen (n = 1116), ↑: positive Assoziation, =: keine Assoziation. Ergebnisse, welche im Rahmen dieser Dissertation ermittelt wurden, sind blau hervorgehoben.

Zunächst fällt auf, dass die Studien an sich sehr heterogen sind. So differieren zum einen die Fallzahlen beträchtlich und zum anderen werden unterschiedliche Indizes des Glukosemetabolismus in die Analyse mit einbezogen. Des Weiteren wurden jeweils unterschiedliche Modelle analysiert: so wurden z.B. in der DESIR-Studie Probanden mit einer gestörten Nüchternglukose (IFG) und einem inzidenten T2D mit der Gruppe der normoglykämischen Probanden verglichen (Fumeron et al. 2004). Die Korrektur für potentielle Confounder erfolgte ebenfalls auf eine unterschiedliche Art und Weise.

Aufgrund dieser Unterschiede ist ein Vergleich der Studien prinzipiell schwierig. Jedoch fällt trotz der Heterogenität der Studien im Gesamtbild auf, dass die Assoziationen in Bezug auf den T2D spärlich sind.

Einzelne Studien zeigten nichtsdestotrotz positive Assoziationen. So konnte in Bezug auf den rs266729 die Arbeitsgruppe um *Suad Efendic* und *Philippe Froguel* eine Assoziation zum inzidenten T2D nachweisen. Hierbei stellte das G-Allel das Risikoallel da (Gu et al. 2004, Vasseur et al. 2002). Der Polymorphismus rs17300539 war lediglich in der DESIR-Studie mit dem T2D und einer gestörten Nüchternglukose assoziiert, wobei hier der AA/AG-Genotyp mit einem erhöhten Risiko assoziiert war (Fumeron et al. 2004). Der rs16861194 ist der von den 3 Promotorpolymorphismen bisher am wenigsten untersuchte. Hier konnte lediglich die Arbeitsgruppe um *Suad Efendic* eine Assoziation zum T2D nachweisen, wobei das G-Allel das Risikoallel darstellte (Gu et al. 2004).

Des Weiteren konnte keine Arbeitsgruppe, analog zu den Ergebnissen der im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse, eine Assoziation zu Indizes des Glukosemetabolismus für alle 3 Einzelnukleotidpolymorphismen nachweisen.

Mögliche Gründe für das Fehlen einer robusten Assoziation von den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Polymorphismen mit Parametern des Glukosemetabolismus sowie dem T2D können vielfältig sein.

Zum einen kann es natürlich gar keinen Zusammenhang geben. Auffallend ist allerdings die doch verhältnismäßig robuste Assoziation mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln, welche selber wiederum sehr reproduzierbar mit einem modifizierten Diabetesrisiko assoziiert werden konnten. Theoretisch könnte es sich also auch um falsch-negative Ergebnisse handeln, beispielsweise aufgrund einer zu geringen Power der einzelnen Studien. Die Ergebnisse könnten auch auf das Faktum zurückzuführen sein, dass es sich beim T2D um ein Krankheitsbild handelt,

dass durch viele genetische und Umweltfaktoren sowie deren Interaktionen bedingt ist (Ridderstrale et al. 2009), so dass die Beteiligungen der Einzelnukleotidpolymorphismen im AdipoQ- Gen schwierig zu erfassen sind, wenn diese Umweltfaktoren nicht berücksichtigt werden.

Als ein Beispiel sei hier der Polymorphismus rs17300539 genannt, welcher im Rahmen dieser Dissertation die stärkste Assoziation mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln aufwies. So erklärt der rs17300539 zu 1,36% [EPIC-Potsdam-Kohorte] bzw. 1,01% [MeSy-BePo-Subkohorte] die Variabilität der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel.

Nimmt man weiterhin an, dass die Steigerung des Adiponectinspiegels um 1,0 µg/ml das Diabetesrisiko um 8,1 % reduziert [EPIC-Potsdam-Kohorte] (Spranger et al. 2003), ist es schon möglich, dass zum T2D eine Assoziation besteht und zudem auch nicht verwunderlich, dass diese bisher in den meisten Studien nicht gesehen werden konnte, da die Power der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Studien und ebenso die der meisten anderen publizierten Studien nicht ausreichend ist, um diesen verhältnismäßig kleinen Effekt zu detektieren. Für diese Annahme spricht auch, dass der Effekt in den Initialstudien oftmals überschätzt wird, während nachfolgende Studien den Effekt dann häufig nicht bestätigen können (Hirschhorn et al. 2002).

Ein weiterer Aspekt ist die Berücksichtigung von Interaktionen innerhalb eines Genes, Gen-Gen-Interaktionen sowie von Gen-Umwelt-Interaktionen.

So konnte z.B. die Arbeitsgruppe um *Philippe Froguel* nachweisen, dass der G_G (rs266729_rs17300539) Haplotyp (HT) mit dem T2D assoziiert ist, nicht jedoch mit dem HOMA-IR sowie dem HOMA-S, möglicherweise bedingt dadurch, dass die Indizes in der Gesamtkohorte bestimmt wurden (Vasseur et al. 2002). Diese Assoziation konnte jedoch in der DESIR- Studie nicht bestätigt werden, möglicherweise bedingt dadurch, dass ein anderer Phänotyp [IFG/T2D vs. NGT] untersucht wurde (Fumeron et al. 2004). Die Arbeitsgruppe um *Philippe Froguel* konnte weiterhin nachweisen, dass der G_G HT sowohl positiv mit dem T2D als auch negativ mit dem HOMA-S assoziiert war. Diese Assoziation war jedoch vom Grad der Adipositas abhängig, was konkret bedeutet, dass bei Probanden, welche einen BMI < 30 kg/m² aufwiesen, diese Assoziation nicht signifikant war (Vasseur et al. 2005).

Kritisch anzumerken ist jedoch, dass diese Haplotypenanalysen (HT-Analysen) in sehr kleinen Kohorten erfolgten und daher mit Vorsicht zu interpretieren sind. Dies ist auch der Grund, warum im Rahmen dieser Dissertation bewusst auf eine HT-Analyse verzichtet wurde.

Da neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren eine entscheidende Bedeutung an der Entstehung des T2D zuzuschreiben sind, erscheint es sinnvoll, diese in der Analyse mit zu berücksichtigen. Bisher gibt es nur wenige Studien die diesen Aspekt partiell mit einbeziehen (Cauchi et al. 2008, Vasseur et al. 2005, Wang et al. 2009), wobei aktuelle europäische Initiativen diese Fragestellungen an ausreichend große prospektive Kohorten adressieren.

Die Arbeitsgruppe um *Zhang* konnte in einem chinesischen Kollektiv aufzeigen, dass der Polymorphismus rs266729 in Abhängigkeit vom Grad der Adipositas, welche vor allem durch die überwiegend sitzende Tätigkeit sowie einem Überangebot an Nahrungsmitteln mit hoher Energiedichte bedingt ist (Ridderstrale et al. 2009, Rolla et al. 2009), mit dem T2D assoziiert ist. Hierbei wiesen adipöse T2D-Probanden im Vergleich zu normalgewichtigen T2D-Probanden signifikant häufiger den GG-Genotyp auf (Wang et al. 2009). Ein ähnliches Ergebnis ließ sich auch im europäischen Raum aufzeigen: hierbei waren T2D-Probanden mit einem BMI ≥ 30 kg/m² im Vergleich zu T2D-Probanden mit einem BMI < 30 kg/m² häufiger hetero- bzw. homozygot für den rs266729 (Cauchi et al. 2008). Im Rahmen dieser Dissertation wurde auf die Analyse einer möglichen Effektmodifikation, sowohl durch den BMI, als auch durch das Alter sowie das Geschlecht aufgrund des Ergebnisses der Powerkalkulation bewusst verzichtet.

Zudem erscheint es sinnvoll, neben der Adipositas weitere Umweltfaktoren, wie z.B. das Ernährungsmuster, in die Analyse mit einzubeziehen.

So konnte z.B. die Arbeitsgruppe um *Ordovás* in einer spanischen Studie aufzeigen, dass gesunde Männer (n=59), welche den Wildtyp des rs266729 aufwiesen, nach einer 28 tätigen kohlenhydratreichen Diät bzw. einer Diät mit einem hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (FS) im Vergleich zu einer Diät mit einem hohen Anteil an gesättigten FS eine signifikant höhere Insulinsensitivität aufwiesen, als Männer welche homo- bzw. heterozygot für den rs266729 waren (Pérez-Martínez et al. 2008). Somit könnte sich das Ansprechen auf eine Ernährungsumstellung auch bei T2D-Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp unterscheiden, was zum einen eine individuellere Therapie ermöglichen würde und zum anderen könnte es möglich sein, bei Menschen mit einem erhöhten Risiko für einen T2D eine gezieltere Prophylaxe durchzuführen.

Vom Grundsatz her eignen sich zur Untersuchung von Gen-Umwelt-Interaktionen v.a. Studien mit einem prospektiven Design, wie z.B. die EPIC-Potsdam-Kohorte, da hier im Vergleich zu Querschnittsstudien ein wesentlicher Bias wegfällt: T2D-Patienten haben bereits Anleitungen

erhalten, wie sie ihren Lebensstil verändern sollen, um ihren Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen (Grarup et al. 2007). Auf diese Analyse wurde jedoch analog zur Haplotypenanalyse im Rahmen dieser Dissertation verzichtet, da dies mit einem entsprechenden Verlust der ohnehin bereits geringen Power verbunden gewesen wäre.

4.3 Stärken und Limitationen

Die wohl größte Stärke der hier präsentierten Ergebnisse ist in der Tatsache zu sehen, dass die Ergebnisse (mit Ausnahme des rs266729), welche in der EPIC-Potsdam-Kohorte gewonnen werden konnten, in der unabhängigen MeSy-BePo-Kohorte repliziert wurden, wobei hier eine ähnliche Effektgröße sowie statistische Signifikanz in Bezug auf die zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel zu verzeichnen war. Somit ist es unwahrscheinlich, dass es sich trotz der grenzwertigen Power der Studienkollektive um falsch-positive Ergebnisse handelt.

Die Erfassung klinischer bzw. laborchemischer Parameter erfolgte in beiden Kohorten unter Verwendung von standardisierten Protokollen bzw. Assays mit einer hohen Präzision. Des Weiteren erfolgte die Charakterisierung des Phänotyps in beiden Kohorten anhand der Kriterien der WHO aus dem Jahre 1999, was die Vergleichbarkeit der Studien untereinander ermöglicht.

Die Probanden beider Kohorten (sowohl Fälle als auch Kontrollen) stammen aus derselben Population und es besteht kein Grund zur Annahme, dass der genetische Background sich in Hinblick auf die Ethnie in beiden Kohorten unterscheidet, da die letzte große Immigration im 17. Jahrhundert zu verzeichnen war, als viele Hugenotten aus Frankreich flüchteten (Klipstein-Grobusch et al. 2006).

Die Stärke der EPIC-Potsdam-Kohorte liegt im prospektiven Studiendesign begründet, d.h. ein Einfluss einer schon vorhandenen Erkrankung auf die Adiponectinspiegel ist ausgeschlossen. Damit fällt ein wesentlicher Bias weg: T2D-Patienten haben bereits Anleitungen erhalten, wie sie ihren Lebensstil verändern sollen, um ihren Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen (Grarup et al. 2007), was wiederum das Ergebnis beeinflussen könnte.

Eine Schwäche der EPIC-Potsdam Kohorte hingegen ist, dass die Diagnose des T2D auf der Grundlage von Fragebögen, welche den Patienten zugesandt wurden beruhte, wobei allerdings Validierungsstudien gezeigt haben, dass die wahre Situation ausreichend gut wiedergespiegelt

wird (Bush et al. 1989, Midthjell et al. 1992). Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass sich Probanden mit einem bisher nicht diagnostizierten T2D in der Kontrollgruppe befanden.

Hierin liegt gleichzeitig die Stärke der MeSy-BePo-Kohorte: die Diagnose beruhte auf dem OGTT, der es zusätzlich ermöglichte, eine genauere Charakterisierung des Glukosestoffwechsel vorzunehmen.

Ein Nachteil der MeSy-BePo-Kohorte liegt darin, dass die Kontrollen im Vergleich zu den Fällen deutlich jünger waren, d.h. es ist hier nicht auszuschließen, dass diese zu einem späteren Zeitpunkt an einem T2D erkranken werden. Weiterhin befinden sich unter den Kontrollen signifikant mehr Frauen. Hier wiederum ist der Vorteil der EPIC-Kohorte, dass die Patienten mit einem inzidenten T2D (Verifizierung der Diagnose durch den behandelnden Arzt) sowohl in Hinblick auf das Alter, als auch in Hinblick auf das Geschlecht mit jeweils 2 Kontrollen gematcht wurden. Das Geschlecht ist dahingehend wichtig, das die Prävalenz des T2D bei Frauen im Vergleich zu Männern im Alter von 18-79 Jahren um 0,9 % höher ist (Thefeld 1999).

Beide Studien sind weiterhin nicht repräsentativ für die Gesamtbevölkerung, bedingt durch die jeweilige Rekrutierungsprozedur.

Die Teilnahme an einer Studie ist mit einem nicht unerheblichen Zeitaufwand verbunden, was vermuten lässt, das nur Personen an den Studien teilgenommen haben, welche über ausreichend Zeit sowie ein ausgeprägteres Gesundheitsbewusstsein verfügten und somit bereit waren, Zeit in ihre Gesundheit zu investieren.

Die wohl größte Limitation ist die, dass nicht abschliessend beurteilbar ist, ob die untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen selbst für die Effekte verantwortlich sind oder aber andere Varianten, welche im LD (Linkage disequilibrium) mit diesen stehen.

Eine weitere Limitation ist, das sich der Promotorpolymorphismus rs266729 in der EPIC-Potsdam-Kohorte nicht im HWE befand und somit die Ergebnisse schlussendlich nicht zu interpretieren sind.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Dissertation die Gesamtheadiponectinspiegel bestimmt. Hier gibt es Hinweise, dass den posttranslationalen Modifikationen des Adiponectin eine unterschiedliche biologische Aktivität zukommt (Wang et al. 2008), wobei die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Promotorpolymorphismen keinen Einfluss auf die Proteinstruktur

haben sollten (Fumeron et al. 2004). Jedoch könnten diese mit einem oder mehreren seltenen Varianten, die einen Einfluss auf diese haben (Waki et al. 2003) im Kopplungsungleichgewicht stehen (Fumeron et al. 2004).

Und nicht zuletzt sind die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Studien durch ihre geringen Fallzahlen mit einer entsprechend grenzwertigen Power limitiert. Hier hat sich die Genotypisierung in den letzten Jahren revolutioniert, so dass es möglich ist, genetische Assoziationsstudien in einem deutlich größeren Maßstab durchzuführen. Ebenso werden mittlerweile standardmäßig genomweite Genotypisierungen durchgeführt, wodurch bereits eine Vielzahl neuer Kandidatengene identifiziert wurden, die z.B. mit dem T2D assoziiert sind (Park 2011).

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Ausblick

Es zeigte sich, dass der Promotorpolymorphismus rs266729 in der MeSy-BePo-Kohorte im Trend ($p = 0,012$) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln war, wobei hier Träger des Wildtyps (CC) im Vergleich zu Probanden, welche hetero- bzw. homozygot (CG, GG) für den Polymorphismus waren, höhere zirkulierende Adiponectinspiegel aufwiesen. Das Ergebnis ließ sich in der EPIC-Kohorte nicht replizieren.

Der Promotorpolymorphismus rs17300539 war in beiden Kohorten signifikant mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert, wobei hier Träger des Wildtyps (GG) im Vergleich zum hetero- und homozygoten Mutanten (AG+AA) niedrigere Plasmaadiponectinspiegel aufwiesen. Für den Polymorphismus rs16861194 ließ sich in beiden Studien keine Signifikanz verzeichnen, jedoch wiesen in beiden Kohorten Träger des Wildtyps (AA) im Vergleich zu Probanden, welche den hetero- bzw. homozygoten Genotyp (GA + GG) beherbergten, höhere zirkulierende Plasmaadiponectinspiegel auf. Hier war in der MeSy-BePo-Kohorte mit einem p-Wert von 0,066 zudem ein Trend erkennbar.

Der Promotorpolymorphismus rs17300539 war in unseren Kohorten am stärksten mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln assoziiert und bestätigt somit das Ergebnis früherer Studien (Menzaghi et al. 2007).

Die Datenlage des rs266729 sowie rs16861194 stellt sich in der Literatur nach wie vor heterogen dar. Hier ließen sich im Rahmen dieser Dissertation Hinweise für eine Assoziation finden, die jedoch einer Replikation bedürfen. Diese sollte idealerweise in großen, gut charakterisierten Studien erfolgen, was durch die in den letzten Jahren sich rasant entwickelnde Verbesserung der Genotypisierungsmöglichkeiten ökonomisch gesehen möglich ist.

Eine Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D bzw. seiner Vorstufen sowie Indizes des Glukosemetabolismus ließ sich im Rahmen dieser Dissertation nicht nachweisen. In Anbetracht des Ergebnisses der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D kann es jedoch durchaus sein, dass es sich um ein falsch negatives Ergebnis handelt. Hier bleibt abzuwarten, ob sich in Folgestudien mit einer entsprechenden Power diese Vermutung bestätigen lässt.

Weiterhin erscheint es sinnvoll, Umweltfaktoren in die genetischen Analysen mit einzubeziehen, da Gen-Umwelt-Interaktionen in der Pathogenese des multifaktoriell bedingten T2D alles andere als unbedeutend sind. Hierfür eignen sich große Studien mit einem prospektiven Ansatz, wie z.B. die EPIC- Kohorte, welche insgesamt ca. 450.000 Probanden aus 10 verschiedenen europäischen Ländern umfasst.

Einem sehr großen Stellenwert kommen genomweite Assoziationsstudien zu, da hier „neue Gene“ identifiziert werden können, die an der Pathogenese des komplex polygenen T2D beteiligt sind. So konnten kürzlich im Rahmen des MAGIC- Projektes [Meta-Analyses of Glukose and Insulin- related traits Consortium] 10 neue Loci, welche mit Parametern des Glukosemetabolismus assoziiert waren, identifiziert werden, die die Grundlage für weiterführende Studien bilden, um ein besseres Verständnis über den Glukosemetabolismus des Menschen zu erlangen. Diese Ergebnisse könnten dann die Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglichen (Dupuis et al. 2010).

5 LITERATURVERZEICHNIS

Altshuler, D.; Hirschhorn, J.N.; Klannemark, M. et al. (2000). "The Common Ppargamma Pro12ala Polymorphism Is Associated with Decreased Risk of Type 2 Diabetes." Nat Genet **26**(1): 76-80.

Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N. et al. (1999). "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity." Biochem Biophys Res Commun **257**(1): 79-83.

Bacha, F.; Saad, R.; Gungor, N.; Arslanian, S.A. (2004). "Adiponectin in Youth: Relationship to Visceral Adiposity, Insulin Sensitivity, and Beta-Cell Function." Diabetes Care **27**(2): 547-552.

Barth, N.; Langmann, T.; Scholmerich, J.; Schmitz, G.; Schaffler, A. (2002). "Identification of Regulatory Elements in the Human Adipose Most Abundant Gene Transcript-1 (Apm-1) Promoter: Role of Sp1/Sp3 and Tnf-Alpha as Regulatory Pathways." Diabetologia **45**(10): 1425-1433.

Berg, A.H.; Combs, T.P.; Du, X.; Brownlee, M.; Scherer, P.E. (2001). "The Adipocyte-Secreted Protein Acrp30 Enhances Hepatic Insulin Action." Nat Med **7**(8): 947-953.

Bergman, R.N.; Phillips, L.S.; Cobelli, C. (1981). "Physiologic Evaluation of Factors Controlling Glucose Tolerance in Man: Measurement of Insulin Sensitivity and Beta-Cell Glucose Sensitivity from the Response to Intravenous Glucose." J Clin Invest **68**(6): 1456-1467.

Bouatia-Naji, N.; Meyre, D.; Lobbens, S. et al. (2006). "Acadc/Adiponectin Polymorphisms Are Associated with Severe Childhood and Adult Obesity." Diabetes **55**(2): 545-550.

Brown, J.E.; Conner, A.C.; Digby, J.E. et al. (2010). "Regulation of Beta-Cell Viability and Gene Expression by Distinct Agonist Fragments of Adiponectin." Peptides **31**(5): 944-949.

Bush, T.L.; Miller, S.R.; Golden, A.L.; Hale, W.E. (1989). "Self-Report and Medical Record Report Agreement of Selected Medical Conditions in the Elderly." Am J Public Health **79**(11): 1554-1556.

Butler, A.E.; Janson, J.; Bonner-Weir, S. et al. (2003). "Beta-Cell Deficit and Increased Beta-Cell Apoptosis in Humans with Type 2 Diabetes." Diabetes **52**(1): 102-110.

Carling, D. (2005). "Amp-Activated Protein Kinase: Balancing the Scales." Biochimie **87**(1): 87-91.

Cauchi, S.; Nead, K.T.; Choquet, H. et al. (2008). "The Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes May Be Modulated by Obesity Status: Implications for Association Studies." BMC Med Genet **9**: 45.

Chanock, S.J.; Manolio, T.; Boehnke, M. et al. (2007). "Replicating Genotype-Phenotype Associations." Nature **447**(7145): 655-660.

Civitarese, A.E.; Jenkinson, C.P.; Richardson, D. et al. (2004). "Adiponectin Receptors Gene Expression and Insulin Sensitivity in Non-Diabetic Mexican Americans with or without a Family History of Type 2 Diabetes." Diabetologia **47**(5): 816-820.

Cnop, M.; Havel, P.J.; Utzschneider, K.M. et al. (2003). "Relationship of Adiponectin to Body Fat Distribution, Insulin Sensitivity and Plasma Lipoproteins: Evidence for Independent Roles of Age and Sex." Diabetologia **46**(4): 459-469.

Combs, T.P.; Pajvani, U.B.; Berg, A.H. et al. (2004). "A Transgenic Mouse with a Deletion in the Collagenous Domain of Adiponectin Displays Elevated Circulating Adiponectin and Improved Insulin Sensitivity." Endocrinology **145**(1): 367-383.

Combs, T.P.; Wagner, J.A.; Berger, J. et al. (2002). "Induction of Adipocyte Complement-Related Protein of 30 Kilodaltons by Ppargamma Agonists: A Potential Mechanism of Insulin Sensitization." Endocrinology **143**(3): 998-1007.

Comuzzie, A.G.; Funahashi, T.; Sonnenberg, G. et al. (2001). "The Genetic Basis of Plasma Variation in Adiponectin, a Global Endophenotype for Obesity and the Metabolic Syndrome." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4321-4325.

Cook, J.R.; Semple, R.K. (2010). "Hypoadiponectinemia--Cause or Consequence of Human "Insulin Resistance"?" J Clin Endocrinol Metab **95**(4): 1544-1554.

de Bakker, P.I.; Yelensky, R.; Pe'er, I. et al. (2005). "Efficiency and Power in Genetic Association Studies." Nat Genet **37**(11): 1217-1223.

de Vooght, K.M.; van Wijk, R.; van Solinge, W.W. (2009). "Management of Gene Promoter Mutations in Molecular Diagnostics." Clin Chem **55**(4): 698-708.

DeFronzo, R.A.; Tobin, J.D.; Andres, R. (1979). "Glucose Clamp Technique: A Method for Quantifying Insulin Secretion and Resistance." Am J Physiol **237**(3): E214-223.

Doria, A.; Patti, M.E.; Kahn, C.R. (2008). "The Emerging Genetic Architecture of Type 2 Diabetes." Cell Metab **8**(3): 186-200.

Dupuis, J.; Langenberg, C.; Prokopenko, I. et al. (2010). "New Genetic Loci Implicated in Fasting Glucose Homeostasis and Their Impact on Type 2 Diabetes Risk." Nat Genet **42**(2): 105-116.

Fischer, A.; Fisher, E.; Mohlig, M. et al. (2008). "Kcnj11 E23k Affects Diabetes Risk and Is Associated with the Disposition Index: Results of Two Independent German Cohorts." Diabetes Care **31**(1): 87-89.

Friedewald, W.T.; Levy, R.I.; Fredrickson, D.S. (1972). "Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, without Use of the Preparative Ultracentrifuge." Clin Chem **18**(6): 499-502.

Frizzell, N.; Rajesh, M.; Jepson, M.J. et al. (2009). "Succination of Thiol Groups in Adipose Tissue Proteins in Diabetes: Succination Inhibits Polymerization and Secretion of Adiponectin." J Biol Chem **284**(38): 25772-25781.

Fruebis, J.; Tsao, T.S.; Javorschi, S. et al. (2001). "Proteolytic Cleavage Product of 30-Kda Adipocyte Complement-Related Protein Increases Fatty Acid Oxidation in Muscle and Causes Weight Loss in Mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 2005-2010.

Fryer, L.G.; Parbu-Patel, A.; Carling, D. (2002). "The Anti-Diabetic Drugs Rosiglitazone and Metformin Stimulate Amp-Activated Protein Kinase through Distinct Signaling Pathways." J Biol Chem **277**(28): 25226-25232.

Fumeron, F.; Aubert, R.; Siddiq, A. et al. (2004). "Adiponectin Gene Polymorphisms and Adiponectin Levels Are Independently Associated with the Development of Hyperglycemia During a 3-Year Period: The Epidemiologic Data on the Insulin Resistance Syndrome Prospective Study." Diabetes **53**(4): 1150-1157.

Gable, D.R.; Hurel, S.J.; Humphries, S.E. (2006). "Adiponectin and Its Gene Variants as Risk Factors for Insulin Resistance, the Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease." Atherosclerosis **188**(2): 231-244.

Gauderman, W.J.; Morrison, J.M. (2006). "Quanto 1.1: A Computer Program for Power and Sample Size Calculations for Genetic-Epidemiology Studies."; <http://hydra.usc.edu/gxe>

Grarup, N.; Andersen, G. (2007). "Gene-Environment Interactions in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes and Metabolism." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(4): 420-426.

Gu, H.F. (2009). "Biomarkers of Adiponectin: Plasma Protein Variation and Genomic DNA Polymorphisms." Biomark Insights **4**: 123-133.

Gu, H.F.; Abulaiti, A.; Ostenson, C.G. et al. (2004). "Single Nucleotide Polymorphisms in the Proximal Promoter Region of the Adiponectin (Apm1) Gene Are Associated with Type 2 Diabetes in Swedish Caucasians." Diabetes **53 Suppl 1**: S31-35.

Guo, Y.; Jamison, D.C. (2005). "The Distribution of Snps in Human Gene Regulatory Regions." BMC Genomics **6**: 140.

Hanley, A.J.; Bowden, D.; Wagenknecht, L.E. et al. (2007). "Associations of Adiponectin with Body Fat Distribution and Insulin Sensitivity in Nondiabetic Hispanics and African-Americans." J Clin Endocrinol Metab **92**(7): 2665-2671.

Hardie, D.G. (2004). "The Amp-Activated Protein Kinase Pathway--New Players Upstream and Downstream." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5479-5487.

Heid, I.M.; Wagner, S.A.; Gohlke, H. et al. (2006). "Genetic Architecture of the Apm1 Gene and Its Influence on Adiponectin Plasma Levels and Parameters of the Metabolic Syndrome in 1,727 Healthy Caucasians." Diabetes **55**(2): 375-384.

Hirschhorn, J.N.; Lohmueller, K.; Byrne, E.; Hirschhorn, K. (2002). "A Comprehensive Review of Genetic Association Studies." Genet Med **4**(2): 45-61.

Hivert, M.F.; Sullivan, L.M.; Fox, C.S. et al. (2008a). "Associations of Adiponectin, Resistin, and Tumor Necrosis Factor-Alpha with Insulin Resistance." J Clin Endocrinol Metab **93**(8): 3165-3172.

Hivert, M.F.; Manning, A.K.; McAteer, J.B. et al. (2008b). "Common Variants in the Adiponectin Gene (Adipoq) Associated with Plasma Adiponectin Levels, Type 2 Diabetes, and Diabetes-Related Quantitative Traits: The Framingham Offspring Study." Diabetes **57**(12): 3353-3359.

Hotta, K.; Funahashi, T.; Arita, Y. et al. (2000). "Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(6): 1595-1599.

Hu, E.; Liang, P.; Spiegelman, B.M. (1996). "Adipoq Is a Novel Adipose-Specific Gene Dysregulated in Obesity." J Biol Chem **271**(18): 10697-10703.

Hug, C.; Wang, J.; Ahmad, N.S. et al. (2004). "T-Cadherin Is a Receptor for Hexameric and High-Molecular-Weight Forms of Acrp30/Adiponectin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10308-10313.

Jorgensen, T.J.; Ruczinski, I.; Kessing, B. et al. (2009). "Hypothesis-Driven Candidate Gene Association Studies: Practical Design and Analytical Considerations." Am J Epidemiol **170**(8): 986-993.

Kahn, S.E.; Prigeon, R.L.; McCulloch, D.K. et al. (1993). "Quantification of the Relationship between Insulin Sensitivity and Beta-Cell Function in Human Subjects. Evidence for a Hyperbolic Function." Diabetes **42**(11): 1663-1672.

Kaprio, J.; Tuomilehto, J.; Koskenvuo, M. et al. (1992). "Concordance for Type 1 (Insulin-Dependent) and Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus in a Population-Based Cohort of Twins in Finland." Diabetologia **35**(11): 1060-1067.

Kaser, S.; Moschen, A.; Cayon, A. et al. (2005). "Adiponectin and Its Receptors in Non-Alcoholic Steatohepatitis." Gut **54**(1): 117-121.

Kharroubi, I.; Rasschaert, J.; Eizirik, D.L.; Cnop, M. (2003). "Expression of Adiponectin Receptors in Pancreatic Beta Cells." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1118-1122.

Kim, J.Y.; van de Wall, E.; Laplante, M. et al. (2007). "Obesity-Associated Improvements in Metabolic Profile through Expansion of Adipose Tissue." J Clin Invest **117**(9): 2621-2637.

King, H.; Rewers, M. (1993). "Global Estimates for Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Adults. Who Ad Hoc Diabetes Reporting Group." Diabetes Care **16**(1): 157-177.

King, H.; Aubert, R.E.; Herman, W.H. (1998). "Global Burden of Diabetes, 1995-2025: Prevalence, Numerical Estimates, and Projections." Diabetes Care **21**(9): 1414-1431.

Kissebah, A.H.; Sonnenberg, G.E.; Myklebust, J. et al. (2000). "Quantitative Trait Loci on Chromosomes 3 and 17 Influence Phenotypes of the Metabolic Syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14478-14483.

Kita, A.; Yamasaki, H.; Kuwahara, H. et al. (2005). "Identification of the Promoter Region Required for Human Adiponectin Gene Transcription: Association with Ccaat/Enhancer Binding Protein-Beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 484-490.

Klipstein-Grobusch, K.; Mohlig, M.; Spranger, J. et al. (2006). "Interleukin-6 G.-174g>C Promoter Polymorphism Is Associated with Obesity in the Epic-Potsdam Study." Obesity (Silver Spring) **14**(1): 14-18.

Knowler, W.C.; Williams, R.C.; Pettitt, D.J.; Steinberg, A.G. (1988). "Gm3;5,13,14 and Type 2 Diabetes Mellitus: An Association in American Indians with Genetic Admixture." Am J Hum Genet **43**(4): 520-526.

Köbberling, J.; Tillil, H. "Empirical Risk Figures for First-Degree Relatives of Non-Insulin Dependent Diabetes." In: Köbberling, J.; Tattersal, R. Eds. *The Genetics of Diabetes Mellitus*. London: London Academy Press (1982): 201–209.

Kos, K.; Harte, A.L.; da Silva, N.F. et al. (2007). "Adiponectin and Resistin in Human Cerebrospinal Fluid and Expression of Adiponectin Receptors in the Human Hypothalamus." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1129-1136.

Kubota, N.; Terauchi, Y.; Yamauchi, T. et al. (2002). "Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation." J Biol Chem **277**(29): 25863-25866.

Kubota, N.; Yano, W.; Kubota, T. et al. (2007). "Adiponectin Stimulates Amp-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake." Cell Metab **6**(1): 55-68.

Kusminski, C.M.; McTernan, P.G.; Schraw, T. et al. (2007). "Adiponectin Complexes in Human Cerebrospinal Fluid: Distinct Complex Distribution from Serum." Diabetologia **50**(3): 634-642.

Kwon, J.M.; Goate, A.M. (2000). "The Candidate Gene Approach." Alcohol Res Health **24**(3): 164-168.

Laumen, H.; Saningong, A.D.; Heid, I.M. et al. (2009). "Functional Characterization of Promoter Variants of the Adiponectin Gene Complemented by Epidemiological Data." Diabetes **58**(4): 984-991.

Li, S.; Shin, H.J.; Ding, E.L.; van Dam, R.M. (2009). "Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." JAMA **302**(2): 179-188.

- Lin, P.; Chen, L.; Li, D. et al. (2009). "Adiponectin Reduces Glucotoxicity-Induced Apoptosis of Ins-1 Rat Insulin-Secreting Cells on a Microfluidic Chip." Tohoku J Exp Med **217**(1): 59-65.
- Lindsay, R.S.; Funahashi, T.; Hanson, R.L. et al. (2002). "Adiponectin and Development of Type 2 Diabetes in the Pima Indian Population." Lancet **360**(9326): 57-58.
- Livak, K.J. (1999). "Allelic Discrimination Using Fluorogenic Probes and the 5' Nuclease Assay." Genet Anal **14**(5-6): 143-149.
- Ma, K.; Cabrero, A.; Saha, P.K. et al. (2002). "Increased Beta -Oxidation but No Insulin Resistance or Glucose Intolerance in Mice Lacking Adiponectin." J Biol Chem **277**(38): 34658-34661.
- Maeda, K.; Okubo, K.; Shimomura, I. et al. (1996). "Cdna Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-Like Factor, Apm1 (Adipose Most Abundant Gene Transcript 1)." Biochem Biophys Res Commun **221**(2): 286-289.
- Maeda, N.; Shimomura, I.; Kishida, K. et al. (2002). "Diet-Induced Insulin Resistance in Mice Lacking Adiponectin/Acrp30." Nat Med **8**(7): 731-737.
- Markel, M.D. (1991). "The Power of a Statistical Test. What Does Insignificance Mean?" Vet Surg **20**(3): 209-214.
- Maston, G.A.; Evans, S.K.; Green, M.R. (2006). "Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome." Annu Rev Genomics Hum Genet **7**: 29-59.
- Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S. et al. (1985). "Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Beta-Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man." Diabetologia **28**(7): 412-419.
- Menzaghi, C.; Trischitta, V.; Doria, A. (2007). "Genetic Influences of Adiponectin on Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease." Diabetes **56**(5): 1198-1209.

- Metzker, M.L. (2005). "Emerging Technologies in DNA Sequencing." Genome Res **15**(12): 1767-1776.
- Midthjell, K.; Holmen, J.; Bjorndal, A.; Lund-Larsen, G. (1992). "Is Questionnaire Information Valid in the Study of a Chronic Disease Such as Diabetes? The Nord-Trondelag Diabetes Study." J Epidemiol Community Health **46**(5): 537-542.
- Mitrakou, A.; Vuorinen-Markkola, H.; Raptis, G. et al. (1992). "Simultaneous Assessment of Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Using a Hyperglycemia Clamp." J Clin Endocrinol Metab **75**(2): 379-382.
- Nakano, Y.; Tobe, T.; Choi-Miura, N.H.; Mazda, T.; Tomita, M. (1996). "Isolation and Characterization of Gbp28, a Novel Gelatin-Binding Protein Purified from Human Plasma." J Biochem **120**(4): 803-812.
- Nawrocki, A.R.; Rajala, M.W.; Tomas, E. et al. (2006). "Mice Lacking Adiponectin Show Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Reduced Responsiveness to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists." J Biol Chem **281**(5): 2654-2660.
- Newman, B.; Selby, J.V.; King, M.C. et al. (1987). "Concordance for Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus in Male Twins." Diabetologia **30**(10): 763-768.
- Nishida, M.; Funahashi, T.; Shimomura, I. (2007). "Pathophysiological Significance of Adiponectin." Med Mol Morphol **40**(2): 55-67.
- Ober, C.; Aldrich, C.L.; Chervoneva, I. et al. (2003). "Variation in the Hla-G Promoter Region Influences Miscarriage Rates." Am J Hum Genet **72**(6): 1425-1435.
- Okamoto, M.; Ohara-Imaizumi, M.; Kubota, N. et al. (2008). "Adiponectin Induces Insulin Secretion in Vitro and in Vivo at a Low Glucose Concentration." Diabetologia **51**(5): 827-835.
- Park, K.S. (2011). "The Search for Genetic Risk Factors of Type 2 Diabetes Mellitus." Diabetes Metab J **35**(1): 12-22.

Pérez-Martínez, P.; Lopez-Miranda, J.; Cruz-Teno, C. et al. (2008). "Adiponectin Gene Variants Are Associated with Insulin Sensitivity in Response to Dietary Fat Consumption in Caucasian Men." J Nutr **138**(9): 1609-1614.

Pollin, T.I.; Tanner, K.; O'Connell J, R. et al. (2005). "Linkage of Plasma Adiponectin Levels to 3q27 Explained by Association with Variation in the Apm1 Gene." Diabetes **54**(1): 268-274.

Qi, Y.; Takahashi, N.; Hileman, S.M. et al. (2004). "Adiponectin Acts in the Brain to Decrease Body Weight." Nat Med **10**(5): 524-529.

Rakatzi, I.; Mueller, H.; Ritzeler, O.; Tennagels, N.; Eckel, J. (2004). "Adiponectin Counteracts Cytokine- and Fatty Acid-Induced Apoptosis in the Pancreatic Beta-Cell Line Ins-1." Diabetologia **47**(2): 249-258.

Ridderstrale, M.; Groop, L. (2009). "Genetic Dissection of Type 2 Diabetes." Mol Cell Endocrinol **297**(1-2): 10-17.

Rodriguez, S.; Gaunt, T.R.; Day, I.N. (2009). "Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies " Am J Epidemiol **169**(4): 505-514. <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>.

Rolla, A.R. (2009). "Addressing the Need to Tailor Treatment to the Spectrum of Type 2 Diabetes: New Perspectives." Diabetes Technol Ther **11**(5): 267-274.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977). "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.

Schaid, D.J.; Jacobsen, S.J. (1999). "Biased Tests of Association: Comparisons of Allele Frequencies When Departing from Hardy-Weinberg Proportions." Am J Epidemiol **149**(8): 706-711.

Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H.F. (1995). "A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes." J Biol Chem **270**(45): 26746-26749.

Schulze, M.B.; Kroke, A.; Bergmann, M.M.; Boeing, H. (2000). "Differences of Blood Pressure Estimates between Consecutive Measurements on One Occasion: Implications for Inter-Study Comparability of Epidemiologic Studies." Eur J Epidemiol **16**(10): 891-898.

Schwarz, P.E.; Towers, G.W.; Fischer, S. et al. (2006). "Hypoadiponectinemia Is Associated with Progression toward Type 2 Diabetes and Genetic Variation in the Adipoq Gene Promoter." Diabetes Care **29**(7): 1645-1650.

Schwarz, P.E.H.; Bornstein, S.R. (2009). "Genetik Des Diabetes Mellitus - Prädiktive Genetische Tests Werden Kontrovers Diskutiert." Diabetes aktuell **7**(1): 19-25.

Serjeantson, S.W.; Owerbach, D.; Zimmet, P.; Nerup, J.; Thoma, K. (1983). "Genetics of Diabetes in Nauru: Effects of Foreign Admixture, Hla Antigens and the Insulin-Gene-Linked Polymorphism." Diabetologia **25**(1): 13-17.

Shaw, J.E.; Sicree, R.A.; Zimmet, P.Z. (2010). "Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2010 and 2030." Diabetes Res Clin Pract **87**(1): 4-14.

Sherry, S.T.; Ward, M.H.; Kholodov, M. et al. (2001). "Dbsnp: The Ncbi Database of Genetic Variation." Nucleic Acids Res **29**(1): 308-311. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

Shulman, G.I. (2000). "Cellular Mechanisms of Insulin Resistance." J Clin Invest **106**(2): 171-176.

Sookoian, S.; Gianotti, T.F.; Schuman, M.; Pirola, C.J. (2009). "Gene Prioritization Based on Biological Plausibility over Genome Wide Association Studies Renders New Loci Associated with Type 2 Diabetes." Genet Med **11**(5): 338-343.

Spranger, J.; Kroke, A.; Mohlig, M. et al. (2003). "Adiponectin and Protection against Type 2 Diabetes Mellitus." Lancet **361**(9353): 226-228.

Spranger, J.; Verma, S.; Gohring, I. et al. (2006). "Adiponectin Does Not Cross the Blood-Brain Barrier but Modifies Cytokine Expression of Brain Endothelial Cells." Diabetes **55**(1): 141-147.

Staiger, K.; Stefan, N.; Staiger, H. et al. (2005). "Adiponectin Is Functionally Active in Human Islets but Does Not Affect Insulin Secretory Function or Beta-Cell Lipoapoptosis." J Clin Endocrinol Metab **90**(12): 6707-6713.

Stumvoll, M.; Goldstein, B.J.; van Haeften, T.W. (2005). "Type 2 Diabetes: Principles of Pathogenesis and Therapy." Lancet **365**(9467): 1333-1346.

Stumvoll, M.; Mitrakou, A.; Pimenta, W. et al. (2000). "Use of the Oral Glucose Tolerance Test to Assess Insulin Release and Insulin Sensitivity." Diabetes Care **23**(3): 295-301.

Syvänen, A.C. (1999). "From Gels to Chips: "Minisequencing" Primer Extension for Analysis of Point Mutations and Single Nucleotide Polymorphisms." Hum Mutat **13**(1): 1-10.

Tabor, H.K.; Risch, N.J.; Myers, R.M. (2002). "Candidate-Gene Approaches for Studying Complex Genetic Traits: Practical Considerations." Nat Rev Genet **3**(5): 391-397.

Thefeld, W. (1999). "Prävalenz Des Diabetes Mellitus in Der Erwachsenen Bevölkerung Deutschlands." Gesundheitswesen **61**(Sonderheft 2): S85-S89.

Tschritter, O.; Fritsche, A.; Thamer, C. et al. (2003). "Plasma Adiponectin Concentrations Predict Insulin Sensitivity of Both Glucose and Lipid Metabolism." Diabetes **52**(2): 239-243.

Tusié Luna, M.T. (2005). "Genes and Type 2 Diabetes Mellitus." Arch Med Res **36**(3): 210-222.

Vasseur, F.; Helbecque, N.; Lobbens, S. et al. (2005). "Hypoadiponectinaemia and High Risk of Type 2 Diabetes Are Associated with Adiponectin-Encoding (Acad) Gene Promoter Variants in Morbid Obesity: Evidence for a Role of Acad in Diabesity." Diabetologia **48**(5): 892-899.

Vasseur, F.; Helbecque, N.; Dina, C. et al. (2002). "Single-Nucleotide Polymorphism Haplotypes in the Both Proximal Promoter and Exon 3 of the Apm1 Gene Modulate Adipocyte-Secreted Adiponectin Hormone Levels and Contribute to the Genetic Risk for Type 2 Diabetes in French Caucasians." Hum Mol Genet **11**(21): 2607-2614.

Vionnet, N.; Hani, E.H.; Dupont, S. et al. (2000). "Genomewide Search for Type 2 Diabetes-Susceptibility Genes in French Whites: Evidence for a Novel Susceptibility Locus for Early-Onset Diabetes on Chromosome 3q27-Qter and Independent Replication of a Type 2-Diabetes Locus on Chromosome 1q21-Q24." Am J Hum Genet **67**(6): 1470-1480.

Wajchenberg, B.L. (2007). "Beta-Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment." Endocr Rev **28**(2): 187-218.

Waki, H.; Yamauchi, T.; Kamon, J. et al. (2005). "Generation of Globular Fragment of Adiponectin by Leukocyte Elastase Secreted by Monocytic Cell Line Thp-1." Endocrinology **146**(2): 790-796.

Waki, H.; Yamauchi, T.; Kamon, J. et al. (2003). "Impaired Multimerization of Human Adiponectin Mutants Associated with Diabetes. Molecular Structure and Multimer Formation of Adiponectin." J Biol Chem **278**(41): 40352-40363.

Wallace, T.M.; Levy, J.C.; Matthews, D.R. (2004). "Use and Abuse of Homa Modeling." Diabetes Care **27**(6): 1487-1495.

Wang, X.; Zhang, S.; Chen, Y. et al. (2009). "Apm1 Gene Variants -11377c/G and 4545g/C Are Associated Respectively with Obesity and with Non-Obesity in Chinese Type 2 Diabetes." Diabetes Res Clin Pract **84**(3): 205-210.

Wang, Y.; Lam, K.S.; Yau, M.H.; Xu, A. (2008). "Post-Translational Modifications of Adiponectin: Mechanisms and Functional Implications." Biochem J **409**(3): 623-633.

Wang, Y.; Xu, A.; Knight, C.; Xu, L.Y.; Cooper, G.J. (2002). "Hydroxylation and Glycosylation of the Four Conserved Lysine Residues in the Collagenous Domain of Adiponectin. Potential Role in the Modulation of Its Insulin-Sensitizing Activity." J Biol Chem **277**(22): 19521-19529.

Wang, Y.; Lam, K.S.; Chan, L. et al. (2006). "Post-Translational Modifications of the Four Conserved Lysine Residues within the Collagenous Domain of Adiponectin Are Required for the Formation of Its High Molecular Weight Oligomeric Complex." J Biol Chem **281**(24): 16391-16400.

Weyer, C.; Funahashi, T.; Tanaka, S. et al. (2001). "Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 1930-1935.

Wigginton, J.E.; Cutler, D.J.; Abecasis, G.R. (2005). "A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium." Am J Hum Genet **76**(5): 887-893.

Wijesekara, N.; Krishnamurthy, M.; Bhattacharjee, A. et al. (2010). "Adiponectin-Induced Erk and Akt Phosphorylation Protects against Pancreatic Beta Cell Apoptosis and Increases Insulin Gene Expression and Secretion." J Biol Chem **285**(44): 33623-33631.

Wilkening, S.; Chen, B.; Bermejo, J.L.; Canzian, F. (2009). "Is There Still a Need for Candidate Gene Approaches in the Era of Genome-Wide Association Studies?" Genomics **93**(5): 415-419.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y. et al. (2002). "Adiponectin Stimulates Glucose Utilization and Fatty-Acid Oxidation by Activating Amp-Activated Protein Kinase." Nat Med **8**(11): 1288-1295.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Waki, H. et al. (2001). "The Fat-Derived Hormone Adiponectin Reverses Insulin Resistance Associated with Both Lipodystrophy and Obesity." Nat Med **7**(8): 941-946.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Ito, Y. et al. (2003a). "Cloning of Adiponectin Receptors That Mediate Antidiabetic Metabolic Effects." Nature **423**(6941): 762-769.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Waki, H. et al. (2003b). "Globular Adiponectin Protected Ob/Ob Mice from Diabetes and Apoe-Deficient Mice from Atherosclerosis." J Biol Chem **278**(4): 2461-2468.

Yamauchi, T.; Nio, Y.; Maki, T. et al. (2007). "Targeted Disruption of Adipor1 and Adipor2 Causes Abrogation of Adiponectin Binding and Metabolic Actions." Nat Med **13**(3): 332-339.

Yanai, I.; Benjamin, H.; Shmoish, M. et al. (2005). "Genome-Wide Midrange Transcription Profiles Reveal Expression Level Relationships in Human Tissue Specification." Bioinformatics **21**(5): 650-659. <http://www.genecards.org>.

Yang, W.S.; Jeng, C.Y.; Wu, T.J. et al. (2002). "Synthetic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonist, Rosiglitazone, Increases Plasma Levels of Adiponectin in Type 2 Diabetic Patients." Diabetes Care **25**(2): 376-380.

Yesupriya, A.; Evangelou, E.; Kavvoura, F.K. et al. (2008). "Reporting of Human Genome Epidemiology (Huge) Association Studies: An Empirical Assessment." BMC Med Res Methodol **8**: 31.

Yu, J.G.; Javorschi, S.; Hevener, A.L. et al. (2002). "The Effect of Thiazolidinediones on Plasma Adiponectin Levels in Normal, Obese, and Type 2 Diabetic Subjects." Diabetes **51**(10): 2968-2974.

Zhang, D.; Ma, J.; Brismar, K.; Efendic, S.; Gu, H.F. (2009). "A Single Nucleotide Polymorphism Alters the Sequence of Sp1 Binding Site in the Adiponectin Promoter Region and Is Associated with Diabetic Nephropathy among Type 1 Diabetic Patients in the Genetics of Kidneys in Diabetes Study." J Diabetes Complications **23**(4): 265-272.

Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y. et al. (2001). "Role of Amp-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action." J Clin Invest **108**(8): 1167-1174.

Zou, M.H.; Kirkpatrick, S.S.; Davis, B.J. et al. (2004). "Activation of the Amp-Activated Protein Kinase by the Anti-Diabetic Drug Metformin in Vivo. Role of Mitochondrial Reactive Nitrogen Species." J Biol Chem **279**(42): 43940-43951.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Der Promotor und seine Elemente (Abb. adaptiert nach de Vooght et al. 2009)	7
Abb. 2. Schematische Darstellung der Struktur der genomischen DNA, mRNA sowie des Proteins von Adiponectin (Abb. adaptiert nach Gu 2009); Erklärung im Text.....	9
Abb. 3. Hyperbolische Beziehung zwischen der β -Zell-Funktion und der Insulinsensitivität (Abb. adaptiert nach Stumvoll et al. 2005); Erklärung s. Text, NGT: normale, IGT: gestörte Glukosetoleranz, T2D: manifester T2D.....	14
Abb. 4. Schematische Darstellung genetischer Variationen und deren Lage im AdipoQ-Gen (Abb. adaptiert nach Menzaghi et al. 2007) Die Nummern beschreiben die Lage der Varianten relativ zum Adenin des Startkodons ATG. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen sind hervorgehoben (fett und unterstrichen). Blau hervorgehoben sind die Teile des AdipoQ-Gens, welche transkribiert werden.	21
Abb. 5. SNP-Elektropherogramm am Bsp. des rs266729	38
Abb. 6. Funktionsprinzip des TaqMan®-Assays	40
Abb. 7. Zweidimensionaler Diskriminierungsplot des TaqMan®- Genotypisierungsassays (rs16861194), Erklärung im Text.....	41
Abb. 8. graphische Darstellung der Ergebnisse der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D in der EPIC-Potsdam und MeSy-BePo-Kohorte für den rs266729 und rs17300539 (Erklärung im Text).....	50
Abb. 9. Tabellarische und graphische Darstellung der Genotypfrequenzen der 3 Promotorpolymorphismen in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte.	52
Abb. 10. Graphische Darstellung der Assoziation der zirkulierenden Adiponectinspiegel mit den 3 Promotorpolymorphismen in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit Adjustierung für den BMI	54
Abb. 11. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D stratifiziert nach Fall/Kontroll in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte.	55
Abb. 12. Charakterisierung der MeSy-BePo-Gesamtkohorte (n=2031) in Abhängigkeit von der glykämischen Stoffwechsellage, basierend auf den Daten des OGTT	56
Abb. 13. Tabellarische und graphische Darstellung der Genotypfrequenzen der 3 Promotorpolymorphismen in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.	58
Abb. 14. Graphische Darstellung der Assoziation der zirkulierenden Adiponectinspiegel mit den 3 Promotorpolymorphismen in der MeSy-BePo-Subkohorte Die Berechnungen erfolgten im dominanten Modell unter Anwendung der linearen Regression mit multivariater Adjustierung (Alter, Geschlecht, BMI). Probanden mit einem manifesten T2D wurden aus der Analyse ausgeschlossen.	60
Abb. 15. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D in der MeSy-BePo-Kohorte stratifiziert nach Fall /Kontroll (prävalenter T2D/normale Glukosetoleranz).....	62
Abb. 16. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D unter Einbeziehung intermediärer Phänotypen [Modell 1] in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.....	63
Abb. 17. Assoziation der 3 Promotorpolymorphismen mit dem T2D unter Einbeziehung intermediärer Phänotypem [Modell 2] in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte.	64

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1. Klassifizierung des BMI nach den Kriterien der WHO 2000.....	26
Tab. 2. Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus und seiner Vorstufen nach WHO 1999	29
Tab. 3. Ergebnisse der Ermittlung eines repräsentativen Index für die Insulinsekretion (Tab. adaptiert nach Stumvoll et al. 2000).....	32
Tab. 4. 20 µl PCR-Ansatz zur Amplifizierung des rs266729 und rs17300539.....	33
Tab. 5. Thermocyclerprogramm zur Amplifizierung des rs266729 und rs17300539	33
Tab. 6. Ansatz zur Aufreinigung des PCR-Produktes (rs266729 und rs17300539).....	36
Tab. 7. Thermocyclerprogramm der PCR-Aufreinigung (rs266729 und rs17300539).....	36
Tab. 8. 10 µl PCR-Ansatz für die Minisequenzierung des rs266729 und rs17300539	37
Tab. 9. SNUPe-Thermocycler-Programm (rs266729 und rs17300539)	37
Tab. 10. 5 µl PCR-Ansatz zur Amplifizierung des rs16861194	42
Tab. 11. Thermozyklerprogramm zur SNP-Diagnostik des rs16861194.....	42
Tab. 12. Primersequenzen des rs266729 sowie des rs17300539 (5`to 3`).....	45
Tab. 13. Primer- und SONDENSEQUENZEN des rs16861194	45
Tab. 14. Variierende Parameter der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D in der EPIC-Potsdam und MeSy-BePo-Kohorte	48
Tab. 15. Ergebnisse der Powerkalkulation für den Endpunkt T2D in der EPIC-Potsdam- und MeSy-BePo-Kohorte für den rs266729 und rs17300539	50
Tab. 16. Charakterisierung der Studienkohorte EPIC-Potsdam stratifiziert nach Fall/Kontroll.....	51
Tab. 17. Vergleich von klinischen und metabolischen Charakteristika des Promotorpolymorphismus rs266729 in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte.....	53
Tab. 18. Assoziation der Promotorpolymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel in der EPIC-Potsdam-Gesamtkohorte	54
Tab. 19. Anteil des rs17300539 an der genetischen Variabilität der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel	55
Tab. 20. Charakterisierung der Studienkohorte MeSy-BePo stratifiziert nach Fall ¹ /Kontroll ²	57
Tab. 21. Vergleich von klinischen und metabolischen Charakteristika des Promotorpolymorphismus rs266729 in der MeSy-BePo-Gesamtkohorte	59
Tab. 22. Assoziation der Promotorpolymorphismen mit den zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegeln in der MeSy-BePo-Subkohorte	60
Tab. 23. Anteil des rs17300539 an der genetischen Variabilität der zirkulierenden Plasmaadiponectinspiegel.....	61
Tab. 24. Assoziation der Promotorpolymorphismen mit Indizes des Glukosemetabolismus in der MeSy-BePo-Subkohorte.....	64
Tab. 25. Assoziation des Promotorpolymorphismus rs266729 (C>G) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln	68
Tab. 26. Assoziation des Promotorpolymorphismus rs17300539(G>A) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln	72
Tab. 27. Assoziation des Promotorpolymorphismus rs16861194 (A>G) mit den zirkulierenden Adiponectinspiegeln	75
Tab. 28. Assoziation der Promotorpolymorphismen rs266729, rs17300539 sowie des rs16861194 zum T2D, seiner Vorstufen sowie Indizes des Glukosemetabolismus.....	78

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AdipoR1	Adiponectinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponectinrezeptor 2
AdipoQ	Adiponectin
AMP-Kinase	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APM1	AdiPose Most abundant gene transcript 1
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Autoantikörper GAD 65	Antigen: Glutamat-Decarboxylase, Molekulargewicht 65 kDa
Autoantikörper IA-2	Antigen: Tyrosin-Phosphatase 2
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-CBF	Charité- Campus Benjamin Franklin
CD	Cluster of differentiation
CH	Schweiz
D	Deutschland
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DESIR	Epidemiologic Data on the Insulin Resistance Syndrome
DIFE	Deutsches Institut für Ernährungs-forschung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
et al.	et alii (lateinisch: und andere)
FOS	Framingham-offspring-Studie
FS	Fettsäuren
G0	Nüchtern glukose
gAcrp30 (Mausadiponectin)	30-kDa adipocyte complement-related protein, globular head domain
gAd	globuläres Adiponectin
Gluc	Glukose
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GWA	genome wide association study (genomweite Assoziationsstudie)
HapMap	Haplotype Map
HbA1c	glykosyliertes Hämoglobin
HDL	High-density Lipoprotein
HLA	Human Leukocyte Antigen (humanes Leukozytenantigen)
HMW	High Molecular Weight (hohes Molekulargewicht)
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HT	Haplotyp
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
I0	Nüchterninsulin
ISI _s	Insulinsensitivitätsindex nach Stumvoll
IFG	impaired fasting glucose (gestörte Nüchtern glukose)
IGM	impaired glucose metabolism (gestörter Glukosemetabolismus)
IGT	impaired glucose tolerance (gestörte Glukosetoleranz)

incl.	inklusive
Ins	Insulin
IRF-1	Interferon Response factor-1
KG	Körpergewicht
ko	knockout
KORA S4	Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey 4
Korr.	Korrelation
LD	Linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LDL	Low-density Lipoprotein
LMW	Low Molecular Weight (niedriges Molekulargewicht)
mä	männlich
m-Allel	minor-Allel
MAGIC	Meta-Analyses of Glukose and Insulin-related traits Consortium
MeSy-Bepo	Metabolisches Syndrom Berlin-Potsdam
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMW	Medium Molecular Weight, mittleres Molekulargewicht
m-RNA	messenger- Ribonucleinsäure
Mu	Mutant
MW	Mittelwert
n	Fallzahl
n.g.	nicht getestet
NGT	normal glucose tolerance (normale Glukosetoleranz)
NTC	no template control (Negativkontrolle)
NY	New York
OGTT	Oraler Glucosetoleranztest
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)

PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PPAR	peroxisome-proliferator-activated receptor (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor)
prosp.	prospektiv
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
SM	Skelettmuskel
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus
SNuPe	single nucleotide primer-extension
SP-1	stimulatory protein-1
S-Primer	SNP-detection Primer
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TG	Triglyceride
TIK	Transkriptionsinitiationskomplex
TSS	Transkriptionsstartseite
TZD	Thiazolidinedion
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
v.a	vor allem
vs.	versus
w	weiblich
WHO	World Health Organization
WHR	Waist-to-Hip-Ratio
WT	Wildtyp

Einheiten

a	Jahr (lateinisch: annus)
bp	Basenpaare
cm	zentimeter
°C	Grad Celsius
d	Tag
D'	Maß für das Kopplungsungleichwicht
g	gramm
h	Stunde
kb	Kilobyte
kg	Kilogramm
l	Liter
ln	Logarithmus
μ	mikro
m	Milli
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
mmHg	millimeter Quecksilbersäule
n	nano
OR	Odds Ratio
p	pico
pH	pondus Hydrogenii (lateinisch: pondus „Gewicht“; Hydrogenium „Wasserstoff“)
r	Korrelationskoeffizient
U	Unit
V	Volt

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Sheila Melanie Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der genetischen Variabilität im Promotor des AdipoQ-Gens bezüglich zirkulierender Proteinspiegel und ihrer Bedeutung für das Typ 2 Diabetesrisiko“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

11.07.13

Sheila Melanie Müller

10 CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich den Personen danken, ohne die eine Realisierung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt hier Herrn Prof. Spranger, der es mir ermöglicht hat, diese Dissertation fertig zu stellen. Durch ihn habe ich sehr viel gelernt, nicht nur was das fachliche betrifft, sondern auch was das Leben betrifft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Pfeiffer, der es mir möglich machte, das Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Nicht zuletzt sei auch noch Herr Prof. Boeing erwähnt, ohne den die Realisierung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hier bedanke ich mich recht herzlich für die Bereitstellung der DNA-Proben des EPIC-Kollektives.

Sehr großer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Antje-Fischer-Rosinsky, an die ich mich bei Fragen jederzeit wenden konnte und die immer Zeit für Diskussionen gefunden und mir wertvolle Anregungen gegeben hat. Weiterhin bedanke ich mich bei ihr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei meiner besten Freundin Jödis Stolpmann, welche mir Mut und Kraft während der Phase des Schreibens an der Dissertation gegeben hat. Auch möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir bei Fragen zur Textverarbeitung stets eine wertvolle Hilfe war.

Ein Dankeschön gilt auch Rene Mänicke, der immer an mich geglaubt und mir Mut und Kraft während der Phase des Schreibens an der Dissertation gegeben hat.