

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

DISSERTATION

Bedeutung des Insulin Degrading Enzyms
für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Olga Pivovarova

aus Tambov
(Russische Föderation)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. F. H. Pfeiffer
2. Prof. Dr. med. M. Blüher
3. Prof. Dr. med. K. Badenhoop

Datum der Promotion: 16.05.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung der Publikationspromotion	4
1.1. Titel	4
1.2. Autor	4
1.3. Abstract	4
1.4. Einleitung	5
1.5. Zielstellung	5
1.6. Methodik	6
1.7. Ergebnisse	8
1.8. Diskussion	10
1.9. Literaturverzeichnis	14
2. Drei Publikationen als Promotionsleistung	18
2.1. Pivovarova et al. <i>Diabetes Metab Res Rev</i> 2009; 25:156-162	19
2.2. Pivovarova et al. <i>Diabetologia</i> 2009; 52:1656-1664	27
2.3. Rudovich et al. <i>J Mol Med</i> 2009; 87:1145-1151	37
3. Erklärung über den Anteil an den Publikationen	49
4. Lebenslauf	51
5. Liste eigener Publikationen	52
6. Selbständigkeitserklärung	56
7. Danksagung	57

1. ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONSPROMOTION

1.1 TITEL

Bedeutung des Insulin Degrading Enzyms für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

1.2. AUTOR

M.Sc. Olga Pivovarova

1.3. ABSTRACT

Das Insulin Degrading Enzym (IDE) ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym, das für den Insulinabbau verantwortlich ist. Der *IDE*-Knockout bei Mäusen führt zu vermindertem Insulinabbau, Hyperinsulinämie und gestörter Glukosetoleranz. Einige Assoziationsstudien haben das *IDE* als ein Kandidatengen für Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) identifiziert, andere Studien konnten diese Assoziation jedoch nicht bestätigen. In der vorgelegten Arbeit wurde die Bedeutung des IDE für die T2DM-Pathogenese auf verschiedenen Ebenen untersucht. Die Hypothese, dass die aufgrund verschiedener Mechanismen zustande kommenden Störungen der IDE-Funktion zur Entstehung und zum Fortschreiten des T2DM beitragen können, wurde geprüft. In der European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-(EPIC)-Kohorte wurde die Assoziation der *IDE*-Genpolymorphismen mit dem T2DM-Risiko erstmals in einer prospektiven Kohorte bestätigt. In der cross-sectionalen Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam (MeSyBePo)-Kohorte wurden die Effekte der *IDE*-Genpolymorphismen auf alle drei Komponenten des Insulinmetabolismus - Insulinsekretion, Insulinsensitivität und Insulindegradation - nachgewiesen. Ergänzend wurde die Assoziation des in der gleichen Genomregion lokalisierten Gens *HHEX* mit dem T2DM-Risiko und der Insulinsekretionsstörung in der MeSyBePo-Kohorte nachgewiesen.

Die *In-vivo*-Untersuchung der *IDE*-Expression im humanen subkutanen Fettgewebe vor und nach eu- und hyperglykämischen Clamp-Tests hat eine Tendenz zur Steigerung der *IDE*-Expression unter der Insulin- und Glukosewirkung nachgewiesen. In den *In-vitro*-Experimenten mit der humanen Hepatomzelllinie HepG2 wurde die Störung der Regulation der Insulin-induzierten IDE-Aktivität bei hoher Glukosekonzentration festgestellt. Diese Störung wurde nicht durch entsprechende Veränderungen der *IDE*-Genexpression oder *IDE*-Splicing bedingt. Die Hyperglykämie-induzierte Störung der Regulation der IDE-Aktivität kann zur reduzierten hepatischen Insulinextraktion und zur peripheren Hyperinsulinämie bei T2DM führen.

Zusammenfassend wurde das IDE als ein wichtiger Teilnehmer der pathogenetischen Mechanismen des T2DM identifiziert, der ein attraktives Zielmolekül für die T2DM-Behandlung darstellt.

1.4. EINLEITUNG

Das Insulin Degrading Enzym (IDE), oder Insulinase, ist ein Hauptenzym, das für den Insulinabbau verantwortlich ist [1]. IDE ist eine 110 kDa Zink-Metalloproteinase, die in insulinabhängigen und insulinunabhängigen Zellen exprimiert ist, was offensichtlich die Multifunktionalität des Enzyms bestätigt. Das IDE spaltet mehrere Substrate, einschließlich des Amyloid-beta-, IGF-I-, IGF-II- und des ANP-Proteins, und übernimmt auch regulatorische Zellfunktionen für die Proteasomaktivität, Steroidrezeptoren, Fettsäureoxidation in Peroxisomen, Wachstum- und Entwicklung [1].

Der *IDE*-Knockout bei Mäusen führt zu vermindertem Insulinabbau, Hyperinsulinämie, gestörter Glukosetoleranz und Amyloidakkumulation im Gehirn [2]. Andererseits führt die *IDE*-Überexpression zu erhöhtem Insulinabbau und zur Senkung der Effektivität der Insulinstimulation des Insulinsignalwegs [3]. Des Weiteren wurde die Assoziation der *IDE*-Polymorphismen mit dem Typ 2 Diabetes (T2DM)-Risiko in einigen humanen Populationen nachgewiesen [4-6]; jedoch wurde in der Kohorte aus 4206 kaukasischen Individuen keine signifikante Assoziation gezeigt [7]. Die genauen Mechanismen des IDE-Einflusses auf die Entstehung des T2DM sind noch nicht im Detail erforscht.

1.5. ZIELSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung des IDE und seinen möglichen Funktionsstörungen für die T2DM-Pathogenese detailliert zu untersuchen. Einige potentielle Mechanismen des Zusammenhangs zwischen IDE und T2DM wurden in den Assoziationsstudien und in den *In-vivo*- sowie *In-vitro*-Experimenten erforscht. Erstens wurde der Einfluss genetischer Varianten im *IDE*-Gen auf das T2DM-Risiko und Insulin- und Glukosemetabolismus in zwei unabhängigen deutschen Kohorten untersucht [8]. Da das in der gleichen Genomregion lokalisierte Gen des Hematopoietically Expressed Homeobox Proteins (HHEX) ebenfalls als das T2DM-Kandidatengen charakterisiert wurde [9-11], wurden die metabolischen Effekte der *HHEX*-Polymorphismen im Rahmen dieser Assoziationsstudie zusätzlich analysiert [12].

Um den anderen möglichen Mechanismus der T2DM-Pathogenese zu untersuchen, wurde die Hypothese über Insulin- und/oder Glukose-induzierten Funktionsstörungen des IDE geprüft. Dafür wurde die *IDE*-Genexpression im humanen subkutanen Fettgewebe vor und nach eu- und hyperglykämischen Clampuntersuchungen bestimmt [13]. Zudem wurde die Steuerung der IDE-Funktionen durch Insulin und Glukose auf den Transkriptions-, Translations- und Proteinaktivitätsebenen in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 untersucht [13].

1.6. METHODIK

Studienpopulationen

Die Assoziationsstudie der genetischen Varianten in der *HHEX/IDE*-Genomregion wurde in zwei unabhängigen deutschen Kohorten durchgeführt [8, 12]. Die erste Fall-Kohorten-Studie wurde innerhalb der „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition“ (EPIC)-Studie zusammengestellt und schloss 3049 Probanden ein (801 T2DM-Inzidenzfälle und 2248 Nichtfälle) (Tabelle 1 ESM, [8]). In der zweiten, cross-sectionalen Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam (MeSyBePo)-Studie wurden 1026 Probanden genotypisiert, deren Metabolismus mittels oralen Glukosetoleranztests ausführlich charakterisiert wurde. Die Kohorte umfasste 440 Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT), 299 Probanden mit gestörter Glukosetoleranz/gestörter Nüchternglukose (IGT/IFG) and 227 Probanden mit T2DM (Tabelle 2 ESM, [8]). Die Studienprotokolle wurden von den lokalen Ethikkommissionen Brandenburg und Berlin genehmigt. Die schriftliche Zusage aller Probanden wurde vor dem Anfang der Studie eingeholt.

Bewertung des Insulin- und Glukosemetabolismus

Die Bewertung des Insulin- und Glukosemetabolismus in der MESYBEPO-Population wurde mittels der euglykämischen und hyperglykämischen Clampuntersuchungen und des Oralen Glukosetoleranztests (OGTT) durchgeführt [8, 12]. Die biochemische Analyse erfasste die Messungen des Blutzuckerspiegels und der Serumspiegel des Insulins und C-peptids mittels des Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA). Aus biochemischen Parametern wurden die Indizes für die Beurteilung der drei Komponenten des Insulinmetabolismus (Insulinsekretion, Insulinsensitivität and Insulinabbau) kalkuliert. Die Proben des subkutanen Fettgewebes wurden vor und nach 240 min des eu- oder hyperglykämischen Clamp-Tests bei 17 Probanden abgenommen [13].

DNA-Isolierung und Genotypisierung

DNA der Probanden der beiden Studienpopulationen wurde aus den Blutzellen mittels Magnasep Magnetic Beads (Agowa, Germany) isoliert. Die Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) der *HHEX/IDE*-Genomregion (zwölf *IDE*- und zwei *HHEX*-Polymorphismen) wurden aufgrund der Literaturdaten [4-6, 9-11] und aus der NCBI-Datenbank für die Analyse ausgewählt. Die SNP-Genotypisierung wurde mittels des TaqMan-Assays-on-Demand auf dem „TaqMan“ Instrument durchgeführt [8, 12].

Zellkultur

Die Kultur der humanen Hepatomzellen HepG2 erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Rinderserum bei 37 °C in einer 5% CO₂ Atmosphäre [13]. Für die Untersuchung des Insulin- und Glukoseeffektes enthielt das Medium Insulin (0.1 – 200 nM) und eine normoglykämische (5,5 mM) oder hohe (25 mM) Glukosekonzentration.

RNA-Isolierung und Quantitative Echtzeit RT-PCR (QPCR)

Die mRNA-Expression der untersuchten Gene wurde durch eine quantitative Echtzeit RT-PCR (QPCR) mittels eines „TaqMan“ Instruments bestimmt [13]. Dafür wurde die totale RNA mittels des TRIzol-Reagenzes (aus HepG2-Zellen) oder RNeasy Lipid Tissue Mini Kits (aus dem humanen subkutanen Fettgewebe) isoliert. Danach wurde die gesamte zelluläre RNA in cDNA umgeschrieben. Die Detektion der PCR-Amplifikate erfolgte über Fluoreszenzmessung des Farbstoffs SYBR-Green. Zum Design der Oligonucleotide für die QPCR wurde die Software Primer Express™ benutzt.

Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Um das alternative Splicing des *IDE*-Gens zu untersuchen, wurde eine Reverse Transcription PCR (RT-PCR) durchgeführt [13]. Die Nukleotidsequenzen der cDNA, die den kodierenden Bereich des *IDE* überlappen, wurden in einer PCR-Reaktion mittels spezifischer Oligonukleotidprimer amplifiziert, elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und über eine Ethidiumbromid Färbung sichtbar gemacht.

Bestimmung der IDE-Aktivität

Die katalytische Aktivität des IDE im Gesamtzellextrakt, sowie Zytoplasma- und Membranfraktionen der HepG2-Zellen wurden mittels eines „InnoZyme™ Insulysin/IDE Immunocapture Activity Assay Kits“ gemessen [13]. Der Assay beruht auf einer Spaltung des Fluoreszenzenergietransfer(FRET)-Substrats des IDE nach der Inkubation mit den Zellextrakten. Nach der Reaktion wurde die Fluoreszenz der Proben mittels des Plattenreaders gemessen und ausgewertet.

Western Blot

Zum Nachweis der Proteinexpression in HepG2-Zellen wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt [13]. Dafür wurden die Gesamtproteinfraktionen elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einem spezifischen

Antikörper inkubiert. Der Nachweis der spezifischen Bande erfolgte durch Inkubation mit einem Sekundärantikörper und anschließende Detektion mittels Chemolumineszenz.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mittels des Programms SAS 9.1 und SPSS 14 durchgeführt. Die Assoziation zwischen den genetischen Varianten und dem T2DM-Risiko wurde als Relatives Risiko in der EPIC-Population oder Quotenverhältnis (Odds Ratio) in der MESYBEPO-Population beurteilt. Außerdem wurden die Haplotypen in beiden Kohorten analysiert. Für die Assoziationsstudie der metabolischen Parameter wurde die lineare Regressionsanalyse benutzt [8, 12].

1.7. ERGEBNISSE

Einfluss genetischer Varianten in IDE auf das T2DM-Risiko und Insulinmetabolismus

Aufgrund der widersprechenden Ergebnisse der Assoziationsstudien, welche das *IDE*-Gen als ein T2DM-Kandidatengen untersucht hatten [4-7], wurde die Assoziation zwölf genetischer Varianten im *IDE*-Gen mit dem T2DM-Risiko in zwei unabhängigen deutschen Kohorten überprüft. Diese Analyse bestätigte zum ersten Mal die T2DM-Assoziation der SNPs rs1887922 und rs2149632 in der prospektiven EPIC-Kohorte (RR 1.26, $p=0.003$ und RR 1.33, $p<0.0001$ für additives Modell) [8]. Haplotypen, die ein Risiko-Allel von rs2149632 oder beide Risiko-Allele von zwei analysierten *IDE*-SNPs trugen, zeigten auch die starke Assoziation mit dem erhöhten T2DM-Risiko in dieser Kohorte ($p=0.001$ und $p<0.0001$, entsprechend) (Tabelle 1, [8]). Dennoch wurde keine signifikante T2DM-Assoziation in der MeSyBePo-Kohorte gefunden (Tabelle 2, [8]). Die Assoziation von rs2149632 mit der gestörten Glukose-induzierten Insulinsekretion und eine Tendenz zur verminderten Insulinsensitivität für rs1887922 wurden in der Gruppe der nicht-diabetischen Probanden (NGT+IFG/IGT, $n=739$) nachgewiesen (Tabelle 3, [8]). In den NGT-Probanden blieb die Assoziation mit der verminderten Insulinsekretion für rs2149632 signifikant, und die Assoziation von rs1887922 mit einer verminderten hepatischen Insulindegradation wurde zusätzlich beobachtet (Tabelle 3 ESM, [8]). Außerdem wurden noch zwei *IDE*-SNPs, rs2251101 und rs11187007, mit der Insulinsekretion und der *IDE*-Polymorphismus rs551266 mit der Insulindegradation assoziiert (unpublizierte Daten). Dieser Teil der Studie bestätigte die Assoziation der *IDE*-Polymorphismen mit dem T2DM-Risiko in einer prospektiven

deutschen Kohorte und zeigte neue Daten bezüglich der Effekte der *IDE*-Polymorphismen auf den Insulinmetabolismus.

Assoziation der HHEX-Polymorphismen mit T2DM-Risiko und Insulinsekretion

Genomweite Assoziationsstudien fanden eine T2DM-Assoziation von mehreren SNPs in der *HHEX/IDE*-Genomregion 10q23-25 [6, 10]. Die beiden Gene liegen direkt nebeneinander und ihre Polymorphismen weisen ein hohes Linkage Disequilibrium auf ($r^2 = 0.437$ zwischen *IDE*-SNP rs2149632 und *HHEX*-SNP rs7923837; $r^2 = 0.455$ zwischen *IDE*-SNP rs2149632 und *HHEX*-SNP rs1111875). Deshalb wurden zwei Genpolymorphismen des *HHEX*-Gens, rs7923837 und rs1111875, auf die T2DM-Assoziation in der MESYBEPO-Kohorte geprüft [12]. Die signifikante Assoziation zwischen dem *HHEX*-SNP rs7923837 und T2DM-Risiko und eine Tendenz zur T2DM-Assoziation des rs1111875 wurden in der MeSyBePo-Kohorte nachgewiesen (Tabelle 2, [12]). Das Risikoallel des rs7923837 wurde mit verminderter Insulinsekretion und einer reduzierten Insulinantwort nach 30- und 60-Minuten des OGTT assoziiert. Das Risikoallel des rs1111875 zeigte auch eine Assoziation mit verminderter erster Phase der Insulinsekretion und reduziertem insulinogenen Index. Für beide Polymorphismen wurde keine signifikante Korrelation mit der Insulinsensitivität nachgewiesen (Tabelle 3,4, [12]). Außerdem, wurde ein verminderter Insulinabbau bei Heterozygoten für rs1111875 beobachtet. Demgemäß wurden die genetischen Varianten im *HHEX*-Gen mit einer gestörten Insulinsekretion und Änderungen der Insulindegradation, aber nicht mit einer Störung der Insulinsensitivität assoziiert.

Regulation der IDE-Genexpression in humanem subkutanem Fettgewebe

Um die Regulation des *IDE* durch Insulin und Glukose *in vivo* zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression des *IDE*-Genes in Biopsieproben des humanen subkutanen Fettgewebes vor und nach der 240-minütigen Insulin-Infusion unter eu- und hyperglykämischen Clamp-Bedingungen bestimmt. Eine Steigerung der *IDE*-Expression unter der Insulin- und Glukosewirkung wurde nach 240 min des Tests nachgewiesen, welche lediglich nur die Tendenz in Vergleich zu den Kontrollexperimenten aufwies. (Abb. 5, [13]).

Glukose hemmt die Insulin-induzierte Aktivität des IDE in humanen Hepatomzellen

Humane Hepatomzellen HepG2 wurden als ein Leberzellmodell für die Untersuchung der Insulin- und Glukoseeffekte auf die katalytische Aktivität, mRNA- und Proteinexpression des *IDE* benutzt [13].

Die 24-stündige Insulinstimulation erhöhte signifikant die IDE-Aktivität im Medium mit normaler Glukosekonzentration ohne Veränderungen der mRNA- oder Proteinexpression des IDE. Bei der hohen Glukosekonzentration erhöhte Insulin das mRNA-Niveau des IDE ohne Veränderungen der IDE-Aktivität (Abb. 1, 2, [13]). Insofern das alternative Splicing des *IDE*-Gens die Regulation der IDE-Proteinaktivität bedingen könnte, wurden die *IDE*-Splicing-Formen in den HepG2-Zellen untersucht. Keine alternativen Splicing-Formen von unterschiedlicher Länge wurden nach der Insulin- oder Glukosebehandlung nachgewiesen (Abb. 3, [13]). Im Zellkulturmedium mit sowohl normalen als auch hohen Glukosekonzentration, erhöhte Insulin die Expression der katalytisch aktiveren 15a-Isoform des IDE im Verhältnis zu 15b-Isoform (Abb. 4b, [13]).

Demgemäß wurde eine Störung der Regulation der Insulin-induzierten Aktivität des IDE im HepG2-Zellmodell bei der hohen Glukosekonzentration nachgewiesen, die nicht durch entsprechende Veränderungen der *IDE*-Expression oder des *IDE*-Splicings bedingt ist (Abb. 1, 3, 4, [13]).

1.8. DISKUSSION

Studien der *IDE*-Knockout-Mäuse zeigten, dass die Störung der IDE-Funktionen zur Entstehung des T2DM-Phänotyps führen kann [2]. Zwei potentielle pathogenetische Mechanismen solcher Störung der IDE-Funktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht: der Einfluss genetischer Varianten in der *HHEX/IDE*-Genomregion und die mögliche Störung der IDE-Steuerung durch erhöhte Insulin- und Glukosekonzentrationen.

Die erste Hypothese wurde in den Assoziationsstudien geprüft. Diese Arbeit validierte die Assoziation von zwei *IDE*-Polymorphismen mit dem T2DM-Risiko und bestätigte zum ersten Mal diesen Zusammenhang in der prospektiven Fall-Kohorten-Studie. Dagegen wurde keine signifikante T2DM-Assoziation in der MeSyBePo-Kohorte gefunden [8]. Diese Diskrepanz zwischen den zwei untersuchten Kohorten könnte über die relativ geringe Diabetikerzahl in der MeSyBePo-Kohorte erklärt werden.

Jedoch konnten neue Daten über den Einfluss der genetischen Varianten der *IDE* auf alle drei Komponenten des Insulinmetabolismus - Insulinsekretion, Insulinsensitivität und Insulindegradation - in der phänotypisch gut charakterisierten MeSyBePo-Kohorte gezeigt werden [8]. Interessanterweise wurden keine signifikanten Änderungen der glykämischen Parameter gefunden, die von anderen Autoren beschrieben wurden [5].

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Assoziation der drei *IDE*-SNPs mit der Insulinsekretion sowohl in der nicht-diabetischen Subkohorte, als auch in NGT-Individuen nachzuweisen war. Die Assoziation mit dem Insulinabbau wurde nur in der kleinen NGT-Subkohorte gezeigt und erfordert deshalb eine Bestätigung in einer größeren Population. Eine verminderte hepatische Insulindegradation ist ein früher Marker der Störungen des Insulinmetabolismus beim Prädiabetes, Adipositas und Metabolischen Syndrom [14] und kann bei chronischer Exposition die Insulinresistenz erhöhen. Andererseits könnte die reduzierte Insulindegradation die gestörte Insulinsekretion bei den Individuen mit einer T2DM-Veranlagung kompensieren. Interessanterweise wurde das Risiko-Allel des rs1887922 mit einer gesteigerten postprandialen Hyperinsulinämie in einer Studie assoziiert [4], was diese Hypothese indirekt bestätigt. Außerdem wurde eine Tendenz zur verminderten Insulinsensitivität für rs1887922 nachgewiesen [8]. Wenn man berücksichtigt, dass die mittels des Matsuda-Indexes gemessene Insulinsensitivität hauptsächlich die hepatische Insulinsensitivität widerspiegelt [15], unterstützen diese Daten die Bedeutung des hepatischen Insulinmetabolismus für die T2DM-Pathogenese.

Die möglichen Mechanismen des Einflusses der *IDE*-Varianten auf den Insulinmetabolismus bleiben diskutierbar. Erstens könnten die *IDE*-Polymorphismen die embryonale Organogenese der Leber und des Pankreas stören und auf diese Weise die Anomalien der Insulinsekretion und Insulindegradation hervorrufen [16]. Zweitens könnte die Betazell-Sekretion durch verschiedene *IDE*-abhängige Mechanismen wie Amyloidakkumulation [17], Aktivierung des Insulinsignalwegs durch erhöhte intrazelluläre Insulinkonzentrationen und Änderungen des mitochondrialen Metabolismus [18] beeinflusst werden. Da alle in dieser Studie untersuchten *IDE*-SNPs in den nichtkodierenden Regionen des Gens lokalisiert sind, können sie die Proteinsequenz nur indirekt ändern. Dennoch könnten diese Polymorphismen die Genexpression durch die Änderung der Transkription, Splicing oder RNA-Stabilität beeinflussen.

Es ist hypothetisch annehmbar, dass die Gene des gleichen Locus *HHEX* oder *KIF11* die beschriebenen Effekte auf den Insulinmetabolismus wegen dem hohen Linkage Disequilibrium innerhalb der Region bedingen können. Tatsächlich demonstrierten die genomweiten Assoziationsstudien in französischen und englischen Populationen zwei SNPs in 3'-flankierender Region des *HHEX*-Gens (rs7923837 und rs1111875) mit großer Anfälligkeit für T2DM [6, 9]. In dieser Arbeit wurde die Assoziation für diese SNPs in der deutschen MeSyBePo-Kohorte repliziert.

Die genetischen Varianten in *HHEX* wurden in der MeSyBePo-Kohorte mit der verminderten Betazell-Sekretion assoziiert [12], was die publizierten Daten über den Einfluss der *HHEX*-

Polymorphismen auf die verminderte Insulinantwort bei OGTT und intravenöser Glukoseinfusion oder Insulinantwort auf Tolbutamid bestätigt [10, 11, 19]. Die Mechanismen des Einflusses der *HHEX*-SNPs auf die Insulinsekretion bleiben unklar. *HHEX* könnte die Organogenese des Pankreas oder die Betazellfunktionen regulieren [20, 21]. Demgemäß könnten die Träger des *HHEX*-Risiko-Allels eine verminderte Betazellkapazität oder Betazellmasse haben, wobei die vor kurzem gezeigte *HHEX*-Assoziation mit reduziertem Geburtsgewicht [22] diese Hypothese bestätigt. Außerdem wurde in dieser Arbeit die Assoziation von rs1111875 mit vermindertem hepatischen Insulinabbau zum ersten Mal beobachtet.

Laut der Daten unserer Studie, könnten die genetischen Varianten sowohl in *IDE*- als auch in *HHEX*-Lokus zur Störung des Insulinmetabolismus beitragen. Weitere Studien der genetischen Varianten in der *HHEX/IDE*-Region sollten die Frage klären, welches von diesen Genen zur Entstehung des T2DM beitragen kann.

Als ein anderer möglicher Mechanismus der T2DM-Pathogenese könnte die Hyperglykämie bei verschiedenen pathologischen Zuständen zur Störung der Insulindegradation durch *IDE* führen. Belege dafür wurden in den Experimenten mit der Regulation der *IDE*-Funktionen bei unterschiedlichen Insulin und Glukosekonzentrationen beobachtet.

Im HepG2-Leberzellmodell erhöhte Insulin die *IDE*-Aktivität unter der normalen, aber nicht unter der erhöhten Glukosekonzentration [13]. Diese Ergebnisse stellen den ersten Nachweis der Steigerung der *IDE*-Aktivität in HepG2-Zellen nach der Insulinstimulation bei normaler Glukosekonzentration dar. Der Effekt dient offensichtlich zur Ausschaltung der Insulinwirkung: Insulin induziert die Erhöhung der *IDE*-Aktivität, das zur gesteigerten Insulindegradation führt und die Insulinwirkung durch den Insulinsignalweg senkt.

Dennoch wurde keine Regulation der *IDE*-Expression durch Insulin unter der normalen Glukosekonzentration festgestellt. Bei der erhöhten Glukosekonzentration wurden eine Insulin-induzierte Erhöhung der *IDE*-mRNA und eine Tendenz zur Steigerung des *IDE*-Proteins nachgewiesen. Ähnliche Änderungen des *IDE*-mRNA-Niveaus wurden *in vivo* im humanen subkutanen Fettgewebe beobachtet [13]. Demgemäß könnte ein Defizit der *IDE*-Aktivität bei der hohen Glukosekonzentration zur kompensierenden Erhöhung der *IDE*-Expression führen.

Laut unserer Daten kann die Hyperglykämie eine Störung der *IDE*-Aktivität bei T2DM hervorrufen. Diese Hyperglykämie-induzierte Störung kann zur reduzierten hepatischen Insulinextraktion und zur peripheren Hyperinsulinämie führen [23]. Die bisher berichteten Ergebnisse der Analyse der *IDE*-Aktivität in biologischen Flüssigkeiten (Blutzellen, Plasma,

Rückenmarkflüssigkeit etc.) bei diabetischen Patienten sind widersprüchlich [24, 25]. Bei diabetischen Ratten wurde die Senkung der hepatischen Insulindegradation und ihre Wiederherstellung nach der Insulinbehandlung beobachtet [26, 27].

Die in dieser Arbeit beschriebene Regulationsstörung des IDE konnte nicht durch die allosterische Regulation, sowie die entsprechenden Veränderungen der *IDE*-Expression oder *IDE*-Splicing erklärt werden. Dennoch könnte die Regulation des Verhältnisses der katalytisch aktiveren 15a-*IDE*-Isoform zur 15b-Isoform einen Mechanismus der Insulin-induzierten Erhöhung der *IDE*-Aktivität bei normalen Glukosekonzentrationen darstellen. Dagegen fehlt bei hoher Glukosekonzentration eine Regulation der *IDE*-Aktivität trotz erhöhtem 15a/15b-Verhältnis. Deshalb bleibt die Ursache der *IDE*-Störung unbekannt. Unter anderem induziert eine Inkubation der HepG2-Zellen mit erhöhter Glukose die Insulinresistenz [28], die auch zur beschriebenen Regulationsstörung führen kann.

Die IDE-Aktivität kann durch eine Reihe von chemischen Substanzen reguliert werden (Chelatoren, divalente Kationen, Hemmer der Insulinbindung, Thiol-blockierende Agenzien etc.) [1]. In den Zellen können auch freie Fettsäuren [29], Nukleotidtriphosphate [30] und posttranslationale Modifikationen [31] die IDE-Aktivität regulieren. Außerdem könnten die IDE-interagierenden Proteine eine Rolle in der Störung der Regulation der IDE-Aktivität bei den hohen Glukosekonzentrationen spielen. So wurden zwei IDE-bindende Proteine (14 kDa und 6 kDa) in Nagetieren beschrieben, die die Insulin-degradierende Aktivität hemmen, und eines von diesen Proteinen wurde als Ubiquitin identifiziert [32, 33].

Interessanterweise wurde eine reduzierte IDE-Aktivität ohne Änderungen der *IDE*-Expression bei Patienten mit der mit Chromosom 10-gekoppelten Late-Onset Alzheimer-Krankheit gezeigt [34], die möglicherweise durch den funktionalen Defekt der IDE-Aktivität verursacht ist. Es ist gut untersucht, dass T2DM und Hyperinsulinämie das Alzheimer-Risiko im Alter erhöhen. Late-Onset Alzheimer-Krankheit ist auch eine der *IDE*-assoziierten Krankheiten [35]. Deshalb stellt das IDE ein attraktives Zielmolekül für die T2DM- und Alzheimer-Behandlung dar. Die in dieser Arbeit gezeigte Störung der Regulation der IDE-Aktivität durch die hohen Glukosekonzentrationen bestätigt die Wichtigkeit der Entwicklung eines IDE-Aktivators [36].

Zusammenfassend konnte das IDE als wichtiger Teilnehmer der pathogenetischen Mechanismen des T2DM identifiziert werden, der ein attraktives Zielmolekül für die T2DM-Behandlung darstellt. Die weitere Untersuchung der IDE-Interaktionen und Funktionen kann zur Entwicklung effektiver antidiabetischer Arzneimittel beitragen.

1.9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev.* 1998. 19(5):608-624. Review.
2. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003. 100(7):4162-4167.
3. Seta KA, Roth RA (1997) Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 231:167-171
4. Gu HF, Efendic S, Nordman S, Ostenson CG, Brismar K, Brookes AJ, Prince JA. Quantitative trait loci near the insulin-degrading enzyme (IDE) gene contribute to variation in plasma insulin levels. *Diabetes.* 2004. 53(8):2137-2142.
5. Karamohamed S, Demissie S, Volcjak J, Liu C, Heard-Costa N, Liu J, Shoemaker CM, Panhuysen CI, Meigs JB, Wilson P, Atwood LD, Cupples LA, Herbert A. Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes.* 2003. 52(6):1562-1567.
6. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007. 445(7130):881-885.
7. Florez JC, Wiltshire S, Agapakis CM, Burt NP, de Bakker PI, Almgren P, Bengtsson Boström K, Tuomi T, Gaudet D et al (2006) High-density haplotype structure and association testing of the insulin-degrading enzyme (IDE) gene with type 2 diabetes in 4,206 people. *Diabetes* 55:128-135
8. Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, Schulze MB, Boeing H, Pfeiffer AFH. Polymorphisms within insulin degrading enzyme (*IDE*) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med* 2009; 87:1145-1151
9. Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 447:661–678
10. Staiger H, Stancáková A, Zilinskaite J, Vääntinen M, Hansen T, Marini MA, Hammarstedt A, Jansson PA, Sesti G, Smith U et al (2008) A candidate type 2 diabetes polymorphism near

the HHEX locus affects acute glucose-stimulated insulin release in European populations: results from the EUGENE2 study. *Diabetes* 57:514-517

11. Pascoe L, Tura A, Patel SK, Ibrahim IM, Ferrannini E, Zeggini E, et al. Common variants of the novel type 2 diabetes genes CDKAL1 and HHEX/IDE are associated with decreased pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 2007; 56(12): 3101-3104.

12. Pivovarov O, Nikiforova VJ, Pfeiffer AFH, Rudovich N (2009) The influence of genetic variations in HHEX gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 25:156-162.

13. Pivovarov O, Gögebakan O, Pfeiffer AF, Rudovich N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* 2009; 52:1656-1664.

14. Rudovich NN, Rochlitz HJ, Pfeiffer AFHP (2004) Reduced hepatic insulin extraction in response to gastric inhibitory polypeptide compensates for reduced insulin secretion in normal-weight and normal glucose tolerant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53:2359-2365

15. Matsuda M, DeFronzo RA (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22:1462-1470

16. Kuo WL, Montag AG, Rosner MR (1993) Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rats tissues. *Endocrinology* 132:604–611

17. Bennett RG, Hamel FG, Duckworth WC (2003) An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures. *Diabetes* 52:2315-2320

18. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E (2007) Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 282:33583-33592

19. Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A et al. Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects validation and extension of genome-wide association studies. *Diabetes* 2007; 56(12): 3105–3111.

20. Tanaka H, Yamamoto T, Ban T, Satoh S, Tanaka T, Shimoda M, et al. Hex stimulates the hepatocyte nuclear factor 1 α -mediated activation of transcription. *Arch Biochem Biophys* 2005; 442(1): 117–124.

21. Bort R, Martinez-Barbera JP, Beddington RS, Zaret KS. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* 2004; 131(4): 797-806.
22. Hattersly AT, Freathy RM, Bennett AJ et al. Direct evidence to support the fetal insulin hypothesis as the type 2 diabetes risk alleles at the *CDKAL1* and *HHEX-IDE* gene loci reduce birth weight. *Diabetologia* 2008; 51(Suppl 1): 127.
23. Fawcett J, Duckworth WC. Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? *Diabetologia*. 2009 Aug;52(8):1457-60.
24. Standl E, Kolb HJ (1984) Insulin degrading enzyme activity and insulin binding of erythrocytes in normal subjects and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 27:17-22
25. Snehalatha C, Timothy H, Mohan V, Ramachandran A, Viswanathan M (1990) Immunoreactive insulin and insulin degrading enzymes in erythrocytes. A preliminary report. *J Assoc Physicians India* 38:558-561
26. Nikolaev SL, Strelkova MA, Komov VP (2001) Insulin degradation in hepatocytes and erythrocytes of rats in normal condition and in experimental diabetes. *Vopr Med Khim* 47:329-337
27. Hern EP, Shroyer LA, Varandani PT (1987) Insulin-degrading neutral cysteine proteinase activity of adipose tissue and liver of nondiabetic, streptozotocin-diabetic, and insulin-treated diabetic rats. *Arch Biochem Biophys* 254:35-42
28. Zang M, Zuccollo A, Hou X et al. (2004) AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 279:47898-47905
29. Hamel FG, Upward JL, Bennett RG (2003) In vitro inhibition of insulin-degrading enzyme by long-chain fatty acids and their coenzyme A thioesters. *Endocrinology* 144:2404-2408
30. Song ES, Juliano MA, Juliano L, Fried MG, Wagner SL, Hersh LB (2004) ATP effects on insulin-degrading enzyme are mediated primarily through its triphosphate moiety. *J Biol Chem* 279:54216-54220
31. Udrisar DP, Wanderley MI (1992) Fluoride and phosphatidylserine induced inhibition of cytosolic insulin-degrading activity. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 42:183-196

32. Saric T, Muller D, Seitz HJ, Pavelic K (2003) Non-covalent interaction of ubiquitin with insulin-degrading enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 204:11–20
33. Ogawa W, Shii K, Yonezawa K, Baba S, Yokono K (1992) Affinity purification of insulin-degrading enzyme and its endogenous inhibitor from rat liver. *J Biol Chem* 267:1310–1316
34. Kim M, Hersh LB, Leissring MA et al. (2007) Decreased catalytic activity of the insulin-degrading enzyme in chromosome 10-linked Alzheimer disease families. *J Biol Chem* 282:7825-7832
35. Qiu WQ, Folstein MF (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27:190-198
36. Leissring MA, Selkoe DJ (2006) Structural biology: enzyme target to latch on to. *Nature* 443:761-762

2. DREI PUBLIKATIONEN ALS PROMOTIONSLEISTUNG

Pivovarova O, Nikiforova VJ, Pfeiffer AFH, Rudovich N. The influence of genetic variations in HHEX gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25:156-162.

Impact Factor 3.09

Pivovarova O, Gögebakan O, Pfeiffer AF, Rudovich N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* 2009; 52:1656-1664.

Impact Factor 5.82

Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, Schulze MB, Boeing H, Pfeiffer AFH. Polymorphisms within insulin degrading enzyme (*IDE*) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med* 2009; 87:1145-1151.

Impact Factor 4.82

2.1. PUBLIKATION 1

Pivovarova O, Nikiforova VJ, Pfeiffer AFH, Rudovich N. The influence of genetic variations in HHEX gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25:156-162.

2.2. PUBLIKATION 2

Pivovarova O, Gögebakan O, Pfeiffer AF, Rudovich N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* 2009; 52:1656-1664.

2.3. PUBLIKATION 3

Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, Schulze MB, Boeing H, Pfeiffer AFH. Polymorphisms within insulin degrading enzyme (*IDE*) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med* 2009; 87:1145-1151

3. ERKLÄRUNG ÜBER DEN ANTEIL AN DEN PUBLIKATIONEN

Olga Pivovarova hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Pivovarova O, Nikiforova VJ, Pfeiffer AFH, Rudovich N. The influence of genetic variations in HHEX gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25(2):156-162.

65 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Formulierung der wissenschaftlichen Fragestellung: 50%
- Planung der Experimente: 50%
- Durchführung der Experimente: 100% (z.T. mit Unterstützung einer selbst angeleiteten MTA)
- Auswertung und Interpretation der Versuchsergebnisse: 60%
- Schreiben der Publikation: 70%

Publikation 2: Pivovarova O, Gögebakan O, Pfeiffer AF, Rudovich N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* 2009; 52(8):1656-1664.

80 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Formulierung der wissenschaftlichen Fragestellung: 60%
- Planung der Experimente: 80%
- Durchführung der Experimente: 80%
- Auswertung und Interpretation der Versuchsergebnisse: 85%
- Schreiben der Publikation: 95%

Publikation 3: Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, Schulze MB, Boeing H, Pfeiffer AFH. Polymorphisms within insulin degrading enzyme (*IDE*) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med* 2009; 87:1145-1151.

50 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

- Formulierung der wissenschaftlichen Fragestellung: 50%
- Planung der Experimente: 50%
- Durchführung der Experimente: 50% (z.T. mit Unterstützung einer selbst angeleiteten MTA)
- Auswertung und Interpretation der Versuchsergebnisse: 35%
- Schreiben der Publikation: 50%

Prof. Dr. Andreas F.H. Pfeiffer
(betreuender Hochschullehrer)

M.Sc. Olga Pivovarova
(Promovend)

4. LEBENSLAUF

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

5. LISTE EIGENER PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten:

1. Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Fischer-Rosinsky A, Spranger J, Möhlig M, Schulze MB, Boeing H, Pfeiffer AFH. Polymorphisms within insulin degrading enzyme (*IDE*) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes. *J Mol Med* 2009; 87:1145-1151.
2. Rudovich N, Möhlig M, Baerbel O, Pivovarova O, Spranger J, Weickert M, Pfeiffer AFH. Effect of meglitinides on postprandial ghrelin secretion pattern in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2010; 12:57-64.
3. Slominskiĭ PA, Pivovarova OV, Shadrina MI, Artem'eva AV, Pfaipffer FG, Rudovich NN, Agadzhanian SE, Pronin VS, Limborskaia SA. Association of insulinase gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in patients from the Moscow population. *Genetika* 2009; 45:127-131. Russian.
4. Pivovarova O, Gögebakan O, Pfeiffer AF, Rudovich N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* 2009; 52:1656-1664.
5. Pivovarova O, Nikiforova VJ, Pfeiffer AFH, Rudovich N. The influence of genetic variations in HHEX gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25:156-162.
6. Bondar' AT, Fedotchev AI, Pivovarova OV, Larionova AV. Changes in the EEG spectrum and subjective characteristics of the general state after stimulation with variable frequency photic stimuli with two types of organization. *Fiziol Cheloveka* 2004; 30:12-17. Russian.
7. Bondar' AT, Larionova AV, Pivovarova OV, Fedotchev AI. On the reactions of the human nervous system to complex-frequency optical stimulation. *Biofizika* 2004; 49:928-934. Russian.

Kongressbeiträge:

2009

1. Pivovarova O, Willmitzer L, Pfeiffer AFH, Nikiforova VJ, Rudovich N. Regulation of plasma metabolome and subcutaneous adipose transcriptome by insulin in the clamp study. The 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Wien, Österreich, 29.09-02.10.2009. *Diabetologia* 2009 (im Druck)
2. Pivovarova O, Rudovich N, Pfeiffer AFH. The regulation of the activity of human insulin degrading enzyme by insulin and glucose in the HepG2 cell model. 52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Gießen, Deutschland, 4-7.03.2009.
3. Rudovich N, Ernst A, Pivovarova O, Doehner W, Anker S, Morgenthaler NG, Weickert MO, Bergmann A, Pfeiffer AFH. Insulin suppresses atrial natriuretic peptide: A novel link of insulin resistance to hypertension and cardiovascular disease. 52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Gießen, Deutschland, 4-7.03.2009.
4. Pivovarova O, Ernst A, Gögebakan Ö, Bergmann A, Pfeiffer AFH, Rudovich N. Insulin increases the expression of natriuretic peptide clearance receptor in the subcutaneous fat depot in obese subjects: A clamp study. 52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Gießen, Deutschland, 4-7.03.2009.
5. Rudovich N, Ernst A, Pivovarova O, Trabert A, Bergmann A, Pfeiffer AFH. Acarbose: acting on a gut-heart axis ? The 27th International Symposium on Diabetes and Nutrition of the Nutrition Study Group (DNSG) of the EASD, Potsdam, Germany, 25-28.06.2009.

2008

6. Pivovarova O, Rudovich NN, Pfeiffer AFH. Regulation of insulin signalling by insulin degrading enzyme in HepG2 cell line. The 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Rom, Italien, 8–11.09.2008. *Diabetologia* 2008; 51(Suppl1): S249.
7. Rudovich NN, Pivovarova O, Doehner W, Anker SD, Ernst A, Morgenthaler NG, Bergmann A, Pfeiffer AFH. Insulin inhibits secretion of N-terminal-proANP53-90: novel mechanism in obesity associated hypertension. The 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Rom, Italien, 8–11.09.2008. *Diabetologia* 2008; 51(Suppl1): S496.

8. Pivovarova O, Rudovich N, Gögebakan O, Osterhoff M, Pfeiffer AFH. The influence of insulin and glucose on the expression of human insulin degrading enzyme. 43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, München, Deutschland, 30.04–03.05.2008. *Diabetologie & Stoffwechsel* 2008; 3: S14.
9. Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, Osterhof M, Moehlig M, Spranger J, Slominsky P, Boeing H, Schulze M, Pfeiffer AFH. The genetic variation in the IDE (insulin degrading enzyme) gene is associated with impaired insulin metabolism and increased risk of type 2 diabetes. 43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, München, Deutschland, 30.04–03.05.2008. *Diabetologie & Stoffwechsel* 2008; 3: S101.
10. Rudovich NN, Ernst A, Pivovarova O, Doehner W, Anker SD, Morgenthaler NG, Bergmann A, Pfeiffer AFH. Insulinabhängige Suppression der Atriales Natriuretisches Peptid (ANP)- Produktion: ein kausalen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Ernährung zur Hypertonie und CVD-Risiko. Hypertension 2008. The 18th Scientific Meeting of the European Society of Hypertension and the 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Berlin, Deutschland, 14-19.06.2008. *J Hypertens Suppl* 2008; 26(1): pp S1-535.
11. Pivovarova O, Pfeiffer AFH, Rudovich N. The study of association of polymorphisms in *HHEX* gene region with impaired insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group (D&CVD). The 1st Annual Meeting, Turin, Italien, 21-23.11.2008.
12. Olga Pivovarova, Pfeiffer AFH, Rudovich N. The influence of genetic variations in *HHEX* gene on insulin metabolism in the German MESYBEPO cohort. NuGO Week 2008, Potsdam, Deutschland, 2-5.09.2008.

2007

13. Pivovarova O, Rudovich N, Goehring I, Osterhoff M, Pfeiffer AFH. Regulation of the insulin degrading enzyme in hepatocytes in normal and high glucose conditions. The 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Amsterdam, Niederlanden, 18–21.09.2007. *Diabetologia* 2007; 50(Suppl1): S319.
14. Rudovich NN, Pivovarova O, Fisher E, Osterhoff M, Moehlig M, Spranger J, Slominski P, Schulze M, Boeing H, Pfeiffer AFH. The genetic variation in the IDE (insulin degrading enzyme) gene is associated with impaired insulin metabolism and increased risk of

type 2 diabetes. The 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Amsterdam, Niederlanden, 18– 21.09.2007. *Diabetologia* 2007; 50(Suppl1): S75.

2006

15. Pivovarova O, Osterhoff M, Möhlig M, Spranger J, Slominski P, Limborsky S, Pfeiffer AFH, Rudovich N. Haplotypes in the insulin-degrading enzyme gene are associated with enhanced insulin clearance in non-diabetic subjects 41. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Leipzig, Deutschland, 24-26.05.2006. *Diabetologie* 2006; 1: S97-98.

16. Pivovarova OV, Slominsky PA, Shadrina MI, Artem'eva AV, Limborska SA. Analysis of SNP polymorphisms in IDE gene in patients with type 2 diabetes mellitus from Russia. European Conference of Human Genetics, Amsterdam, Niederlanden, 6-9.05.2006. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(Suppl1): S297-298.

17. Pivovarova OV, Slominsky PA, Shadrina MI, Artem'eva AV. Polymorphismen im IDE-Gen und das Risiko des Typ 2 Diabetes in Moskauer Population. 10. Pushchiner Tagung der Nachwuchswissenschaftler "Biologie ist die Wissenschaft des 21. Jahrhunderts", Pushchino, Russische Föderation, 17-21.04.2006. Abstraktbuch. S.40.

6. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Olga Pivovarova, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung des Insulin Degrading Enzyms für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

M.Sc. Olga Pivovarova

7. DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die es erst ermöglicht haben, dass diese Dissertation angefertigt werden konnte.

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Betreuer, Leiter der Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité Campus Benjamin Franklin und der Abteilung Klinische Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung, Prof. Dr. Andreas F. H. Pfeiffer für das interessante Thema, die exzellenten Arbeitsbedingungen und die kritischen Hinweise bei der Erstellung der Arbeit bedanken. Mein Dank geht ebenfalls an Dr. Natalia Rudovich für die hilfreichen Diskussionen und der immer gewährten Unterstützung. Darüber hinaus danke ich beiden für das in mich gesetzte Vertrauen und die Gelegenheit, eigene Vorstellungen verfolgen zu können.

Außerdem danke ich Dr. Martin Osterhoff für seine wissenschaftliche Beratung und wohlwollende Unterstützung bei allen technischen und experimentellen Problemen. Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten der Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité Campus Benjamin Franklin in Berlin und der Abteilung Klinische Ernährung und Epidemiologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke für die allseitige Hilfe und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern, Vladimir und Natalia Pivovarov, und meinem Freund, Evgenij Ramich, für die moralische Unterstützung. Sie haben mir während meiner Promotionszeit immer zur Seite gestanden.