

2 Methodik

2.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die Arbeit untersucht Probanden der Studie „*Metabolisches Syndrom Berlin Potsdam*“ (MeSyBePo-Studie). Durch Anzeigen in regionalen Zeitungen, durch in Apotheken und Arztpraxen verteilte Flyer und durch das Internet wurde auf die Studie aufmerksam gemacht. Alle interessierten Probanden älter als 18 Jahre konnten an der Studie teilnehmen. Die Untersuchungen fanden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke und am Universitätsklinikum „Benjamin Franklin“ in Berlin statt. Neben der individuellen Krankheitsgeschichte wurden die körperliche Aktivität, Ernährungsgewohnheiten sowie anthropometrische und metabolische Parameter erfasst.

Die Studienkohorte setzte sich zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit aus 564 Probanden zusammen. Eine standardisierte Anamnese erfasste frühere Erkrankungen der Teilnehmer und Stoffwechselerkrankungen der Eltern. In der anthropometrischen Untersuchung der Probanden wurden das Gewicht und die Körpergröße erfasst und daraus der Body-Mass-Index errechnet. Des Weiteren wurden der Hüft- und Taillenumfang gemessen und daraus die Waist-to-Hip-Ratio (WHR) gebildet. Der Gesamtkörperfettgehalt wurde mittels Hautfaltenmessung ermittelt. Die körperliche Aktivität und das Ernährungsverhalten über 4 Tage wurden durch Fragebögen erfasst [Gründler 2004]. Zur Bestimmung der Blutfettwerte, der Insulinkonzentration und des HbA1c-Wertes wurden Standardlabormethoden angewandt. Die Plasmaglukose wurde aus kapillärem Vollblut im Rahmen des oralen Glukosetoleranztests (oGTT) bestimmt. Der oGTT wurde bei allen Probanden durchgeführt. 21 Probanden dieser Kohorte stimmten zusätzlich der Durchführung eines euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamptests zu, dem „Goldstandard“ für die Beschreibung der Insulinresistenz. Das metabolische Syndrom wurde nach den NCEP-ATP-III-Kriterien [National Institutes of Health 2001] diagnostiziert. Bei 9 Probanden konnte aufgrund fehlender Parameter kein Rückschluss auf das Vorliegen des metabolischen Syndroms vorgenommen werden. Diese 9 Teilnehmer (1 Mann, 8 Frauen) wurden aus der Studienkohorte ausgeschlossen, so dass die Studiengruppe dann abschließend 555 *Probanden* umfasste.

2.2 Gendiagnostik - Darstellung des Polymorphismus

Die DNA wurde aus Vollblut durch Magnetpartikelbindung (AGOWA, Berlin, Deutschland) extrahiert. Nach Auswahl der benötigten Primer und deren Etablierung wurde die benötigte DNA-Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction; PCR) vervielfältigt. Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgte durch Gelelektrophorese. Das PCR-Amplifikat wurde im

Anschluss aufgereinigt. Entsprechend der *single nucleotide primer-extension* Methode (SNuPE) wurde ein weiterer Primer, der *SNP detection-primer* (S-Primer) an das aufgereinigte Amplifikat angelagert, exakt ein Basenpaar vor dem zu untersuchenden Polymorphismus. Dieser Primer wurde anschließend um genau ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid verlängert, welches dann detektiert wurde. Vor der Detektion war noch ein Aufreinigungsschritt über Sephadexsäulen® (Autoseq-Platten) notwendig. Die Detektion erfolgte nach Zugabe von *loading solution* und *injection marker* am MegaBACE 1000 Sequenzer.

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, von einer DNA-Sequenz eine große Anzahl Kopien zu erstellen. Diese Methode wurde 1983 von Kary Mullis etabliert, wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt [Mullis 1986]. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI designt und bei Promega (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) bestellt.

<i>PPARγ2, SNP detection-primer:</i>	<i>GGG AGA TTC TCC TAT TGA C</i>
<i>PPARγ2, Primer upstream:</i>	<i>ACG GAT TGA TCT TTT GCT AG</i>
<i>PPARγ2, Primer downstream:</i>	<i>TGA TAT GTT TGC AGA CAG TG</i>

Die DNA-Proben wurden in 96er-Multiwellplates behandelt. Für die PCR wurde aus Reinstwasser, PCR-Puffer des Taq-Polymerase-Herstellers, MgCl₂, Primer *upstream*, Primer *downstream* und dNTP ein Mastermix angefertigt. Aufgrund der großen Empfindlichkeit der Taq-Polymerase wurde diese noch nicht zum Mastermix hinzugefügt. Der unten beschriebene 20 µl-Ansatz wurde je nach Probenanzahl vervielfältigt. Auf eine sterile 96er Multiwellplate wurden nach Herstellung des Mastermixes je 2 µl der DNA-Proben vorgelegt. Anschließend wurde dem Mastermix die Taq-Polymerase hinzugefügt und nach kurzem, vorsichtigem Vortexen je 18 µl des nun fertigen Mixes den DNA-Proben sofort hinzupipettiert. Bei diesem Schritt musste mit größter Vorsicht darauf geachtet werden, dass die Proben nicht untereinander kontaminiert wurden. Zur Kontrolle lief die PCR in einem Loch der Multiwellplate ohne DNA und nur mit Reinstwasser, was bei der späteren Gelkontrolle keine Bande ergeben durfte. Die nun fertig vorbereitete Platte wurde kurz anzentrifugiert, mit einem hitzestabilen Deckel versehen und abschließend in den vorgeheizten Mastercycler gestellt. Alle Pipettierschritte fanden auf Eis statt. Die Belegung der Platten mit den Proben und der Reinstwasser-Kontrolle wurde notiert, um eine korrekte Auswertung zu garantieren. Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in 1%igem Agarosegel [Vogelstein 1979]. Verwendet wurden Gelschlitten mit den Maßen 16×16 cm. Es wurden 2 g Agarose mit 200 ml 1×TAE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in der

Mikrowelle erhitzt. Das flüssige Gel wurde dann nach Abkühlung auf ca. 60°C in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Zur Formung von Auftragstaschen wurden zwei 26-er Käbme in das Gel gesetzt, so dass pro Gel 50 Proben plus 2 Leiterproben elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten. Abschließend wurde das Gel mit 100 µl Ethidiumbromid versetzt, was eine spätere Sichtbarmachung der DNA in UV-Licht ermöglichte. Nach Aushärten des Gels wurden die Begrenzungsteile des Gelschlittens und die Käbme vorsichtig entfernt. Der Gelschlitten wurde in die Elektrophoresekammer gestellt und mit 1×TAE-Puffer knapp überschichtet. Vom PCR-Produkt wurden je Probe 3 µl abpipettiert, 0,6 µl 6× *loading dye solution* (MBI Fermentas, Deutschland) hinzugefügt und in die Auftragstaschen hineinpipettiert. Eine 100-Basenpaar-Leiter (MBI Fermentas, Deutschland) diente als Längenstandard bei der anschließenden Elektrophorese. Diese lief bei einer angelegten Spannung von 100 Volt mit einer Dauer von ca. 40 min. Die Auftrennung der verschiedenen DNA-Moleküle während der Elektrophorese beruht u. a. auf der Tatsache, dass die Mobilität auch durch die Molekülgröße bestimmt wird. Die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes war bekannt. Klare Banden während der anschließenden Photodokumentation im Bereich von ca. 180 Basenpaaren sprachen in diesem Fall für eine erfolgreiche PCR (Abb. 2.1).

Tab. 2.1 PCR-Protokoll für einen 20 µl-Ansatz

Reagenzien	Menge
DNA	2 µl
Reinstwasser	12,3 µl
PCR-Puffer 10×(-MgCl ₂)	2 µl
MgCl ₂	2 µl
Primer upstream	0,5 µl
Primer downstream	0,5 µl
dNTP	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Tab. 2.2 PCR-Temperatur-Zeit-Programm für die Amplifizierung im Mastercycler

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	02:00 min
Denaturierung	95°C	01:00 min
Primer-Annealing	62°C	00:40 min
Elongation	72°C	00:40 min
Abschließende Synthese	72°C	10:00 min

Anzahl der Zyklen: 35

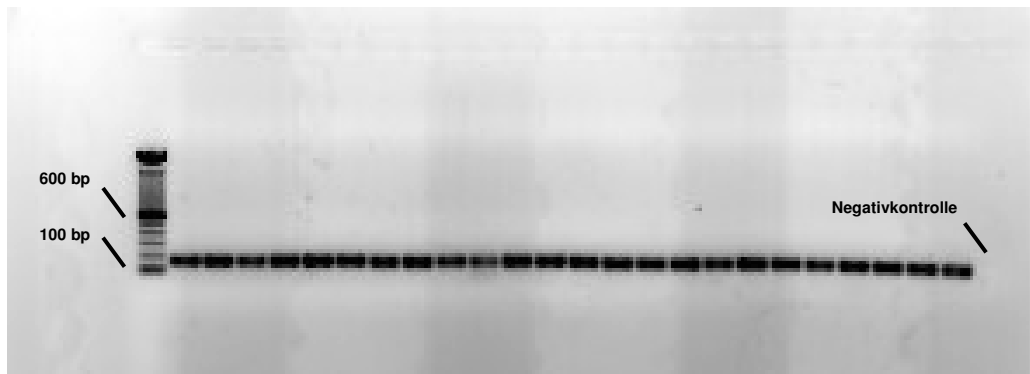


Abb. 2.1 Kontrolle des PCR-Amplifikats: Gelelektrophorese, Photodokumentation

2.2.2 Aufreinigung des PCR-Amplifikats

Nach erfolgreicher PCR erfolgte ein Aufreinigungsschritt, um überschüssige Primer und nicht gebundene Desoxynukleotidtriphosphate zu entfernen. Verwendet wurde hierfür ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, USA), das die hydrolytischen Enzyme Exonuklease-I und Shrimp-Alkaline-Phosphatase enthält. Diese Enzyme sind in der Lage, die überschüssigen Primer und dNTP abzubauen. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurde das PCR-Produkt dem in einer 96er Multiwellplatte aufgetragenen ExoSAP-IT hinzupipettiert, die Platte danach mit einem Foliendeckel verschlossen, anzenrifugiert und abschließend in den vorgeheizten Mastercycler gestellt. Die Pipettiervorgänge erfolgten auf Eis, da sowohl DNA als auch ExoSAP-IT sehr temperaturempfindlich sind.

Tab. 2.3 Protokoll Aufreinigungsschritt des PCR-Amplifikats

Reagenzien	Menge
PCR-Produkt	5 μ l
ExoSAP-IT	2 μ l

Tab. 2.4 Temperatur-Zeit-Programm Aufreinigungsschritt im Mastercycler

Schritt	Temperatur	Dauer
Hydrolyse	37°C	15:00 min
Inaktivierung	80°C	15:00 min

2.2.3 SNP-Sequenzierung

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend in der SNUPE-Reaktion verwendet, um den einzelnen Basenpaar-Polymorphismus darzustellen. Bisher liegen mit dem PCR-Produkt DNA-Fragmente einer Länge von 183 Basenpaar vor, die den Polymorphismus beinhalten. Dieser selbst ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht dargestellt.

Zum besseren Verständnis soll an dieser Stelle kurz auf die Methode der DNA-Sequenzierung eingegangen werden, welche nach 2 Prinzipien durchgeführt werden kann: Nach *Maxam-Gilbert* [Maxam, Gilbert 1980] durch Zerlegung eines DNA-Fragments in unterschiedlich lange DNA-Bruchstücke und nach *Sanger* [Sanger 1977] durch Synthese unterschiedlich langer DNA-Einzelstränge komplementär zu dem vorhandenen DNA-Fragment. Die SNUPE-Methode beruht letztlich auf der Methode von Sanger, welche im folgenden kurz beschrieben wird.

Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren nach Sanger

Ausgangsmaterial für diese Sequenzierreaktion sind einzelsträngige DNA-Fragmente, welche als Matrize für die enzymatische Synthese eines komplementären Stranges dienen. Das Reaktionsgemisch enthält des weiteren Primer, Nukleotidtriphosphate, DNA-Polymerase und fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP). Jedes der 4 Basen-Analoga ist mit einer unterschiedlichen Farbe markiert. Diesen ddNTP fehlt am 2' und am 3' C-Atom eine Hydroxylgruppe, so dass beim Einbau eines solchen Nukleosids die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges abgebrochen wird, da durch das Fehlen der OH-Gruppe am 3'-Ende keine Phosphodiesterbindung mehr ausgebildet werden kann. Aufgrund der geringen Menge der Didesoxyribonukleosidtriphosphate im Reaktionsansatz kommt es im Rahmen der Sequenzierung beim Aufbau des komplementären DNA-Stranges überwiegend zum Einbau von regulären Nukleotidtriphosphaten und nur sehr selten zum Einbau ihrer fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Analoga. Kettenabbrüche erfolgen daher statistisch verteilt über die gesamte Fragmentlänge des Matrizenstranges. Man erhält letztendlich aufgrund der hohen Replikationsrate eine statistische Mischung aller möglichen Kettenlängen neu synthetisierter fluoreszenzmarkierter DNA-Einzelstrang-Fragmente. Diese werden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch Elektrophorese ihrer Molekülgröße entsprechend aufgetrennt.

Bei der automatischen Sequenzierung, hier im MegaBACE 1000 Sequenzer, wird ein Laserstrahl auf eine bestimmte Stelle im Gel fokussiert. Dieser regt die Farbstoffe zur Fluoreszenz an. Die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Farbstoffe liegen bei unterschiedlichen Wellenlängen, so dass nach deren Erfassung durch einen Detektor eine computergestützte Auswertung (hier MegaBACE

Sequence Analyzer Patch 2 Version 3.0, Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland) der Basensequenz möglich ist. Voraussetzung für diese Analyse ist eine Trennschärfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, mit der DNA-Einzelstrangfragmente mit nur einem Nukleotid Längenunterschied anhand der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld voneinander unterschieden werden können.

Single nucleotide primer-extension

Die SNuPE-Reaktion ist im Prinzip eine Sequenzierreaktion nach Sanger, bei der allerdings genau ein weiteres Didesoxynukleotid angehängt wird. Während dieser Reaktion laufen wie bei der PCR wieder die Schritte Denaturierung des Doppelstranges, Primer-Annealing und Elongation ab. Verlängert wurde hier der *SNP detection-primer* (S-Primer), ein Oligonukleotid, dessen Sequenz so gewählt wurde, dass es sich während der Annealingreaktion im Mastercycler komplementär an die DNA-Sequenz, exakt ein Nukleotid vor dem zu untersuchenden Polymorphismus, anlagert. Im Reaktionsansatz befanden sich zudem farbstoffmarkierte 2', 3'-Didesoxynukleotide, an deren 3'-Ende die OH-Gruppe fehlt, so dass nach Taq-Polymerase-vermittelter Bindung dieser Analoga an das 3'-Ende des S-Primers der Einbau weiterer Nukleotide und damit eine weitere Verlängerung verhindert wird. Der S-Primer verlängerte sich damit genau um ein fluoreszenzmarkiertes 2', 3'-Didesoxynukleotid. Dieses ist komplementär zum untersuchten Polymorphismus und kann wie oben beschrieben detektiert werden.

Für die SNuPE-Reaktion wurde das PCR-Produkt als Template eingesetzt und diesem ein Mastermix aus dem SNuPE-Premix (verwendet wurde das MegaBACETM-SNuPETM-Genotyping-Kit der Firma Amersham Biosciences, New York, USA), Reinstwasser und dem S-Primer hinzupipettiert. Der S-Primer wurde mit einer Konzentration von 1 pmol/ μ l eingesetzt. Der Premix ist ein Reaktionsgemisch aus MgCl₂, Puffer, Taq-Polymerase und farbstoffmarkierten Didesoxynukleotiden. Eine Wasserprobe diente wieder als Negativkontrolle, um Verunreinigungen auszuschließen. Die so vorbereitete 96er Multiwellplate wurde mit einem hitzestabilen Deckel verschlossen und in den vorgeheizten Mastercycler gestellt.

Tab. 2.5 *SNuPE-Protokoll für einen 10 μ l-Ansatz*

Reagenzien	Menge
SNuPE-Premix	4 μ l
S-Primer	2 μ l
Reinstwasser	2 μ l
ExoSAP-Produkt	2 μ l

Tab. 2.6 Temperatur-Zeit-Programm SNUPE-Reaktion im Mastercycler

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	96°C	00:10 min
Primer-Annealing	55°C	00:05 min
Elongation	60°C	00:10 min

Anzahl der Zyklen: 25

2.2.4 Aufreinigung des SNUPE-Produkts

Das SNUPE-Produkt wurde vor der Sequenzierung von nicht eingebauten dNTP, Taq-Polymerase, überschüssigen Primern und weiteren Unreinheiten befreit. Dies erfolgte mit dem AutoSeq96-Dye-Terminator-Clean-up-Kit (Amersham Biosciences, New York, USA). Die Autoseq-Platten enthielten 96 SephadexTM-Säulen G-50, welche vor Benutzung auf Zimmertemperatur erwärmt wurden.

2.2.5 Single nucleotide polymorphism-Analyse

Das Autoseq-Produkt wurde mit *loading solution* und *injection marker* (MegaBACETM-DYEnamicTM-ET-Dye-Terminator-Kit, Amersham Biosciences, New York, USA) beladen. Der *injection marker* gibt bei der anschließenden SNP-Detektion der Software den Auswertungsbereich vor und erscheint während der Elektrophorese vor der Probe. Die Proben waren damit für die Analyse im MegaBACE 1000 Sequenzer vorbereitet. Abbildung 2.2 zeigt ein Beispiel der SNP-Diagnostik im MegaBACE 1000 Sequenzer. Dargestellt sind der CC- (Pro/Pro), GC- (Pro/Ala) und GG-Genotyp (Ala/Ala).

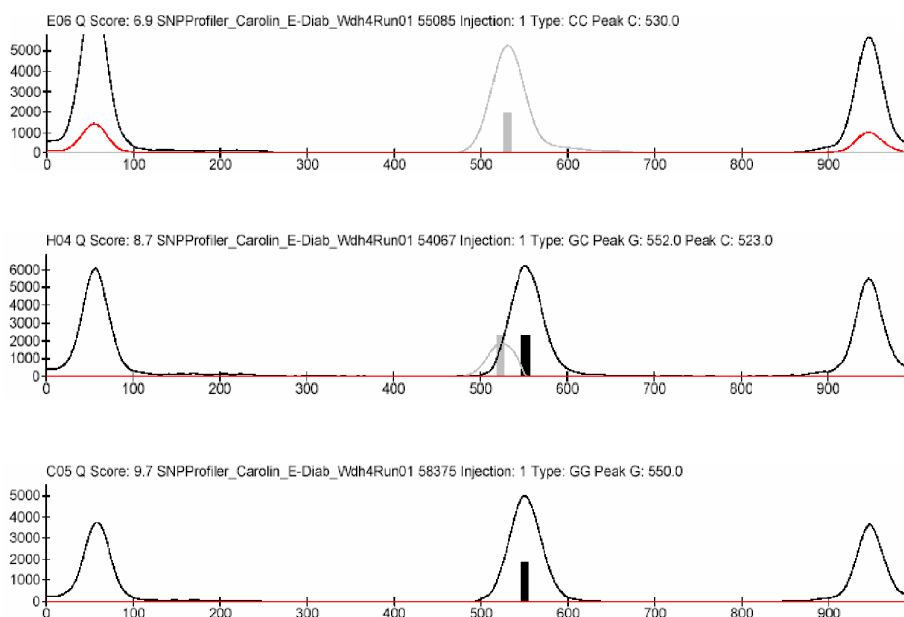


Abb. 2.2 Beispiele der SNP-Diagnostik

2.3 Qualitätssicherung

2.3.1 Sequenzierung des PCR-Amplifikats

Die Basensequenz des PCR-Amplifikats wurde zunächst mit Hilfe der Sangermethode im MegaBACE 1000 Sequenzer überprüft. Um sicherzustellen, dass auch der S-Primer richtig bindet und eine eventuelle Ausbildung von z. B. Haarnadelstrukturen ausgeschlossen werden kann, wurde im Vorfeld zudem überprüft, ob das PCR-Amplifikat auch mit dem S-Primer sequenziert werden kann. Das Arbeitsprotokoll dieser Sequenzierung ist im folgenden kurz dargestellt.

Polymerase-Chain-Reaction

Die PCR erfolgte nach den oben bereits beschriebenen Bedingungen. Als Ausgangsmaterial wurde Test-DNA eingesetzt. Die Kontrolle des Amplifikats erfolgte durch Elektrophorese im LE-Agarose-Gel nach den ebenso oben beschriebenen Bedingungen.

Aufreinigung des PCR-Produkts

Die Aufreinigung von überschüssigen Primern, Nukleotiden und Polymerasen erfolgte durch Auswaschung mit dem High-Pure-PCR-Product-Purification-Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland.

Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wurde das MegaBACETM-DYEnamicTM-ET-Dye-Terminator-Kit der Firma Amersham Biosciences, New York, USA, verwendet. Zuerst wurden drei 500 µl-Eppendorf-Zylinder vorbereitet und beschriftet, danach die beiden PCR-Primer (Primer *upstream* und Primer *downstream*) und der S-Primer in je einen dieser Zylinder gegeben. Dann wurde ein Reaktionsansatz aus Premix DYEnamic und PCR-Produkt zu den 3 Eppendorf-Zylindern hinzugegeben. Der Premix enthielt Thermo-Sequenase-II-DNA-Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate und fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate. Der Reaktionsansatz wurde kurz an zentrifugiert und die 3 Eppendorfgefäße danach in den vorgeheizten Thermocycler gestellt.

Tab. 2.7 Sequenzierreaktion, Protokoll 20 µl-Reaktionsansatz

Reagentien	Menge
Primer (-up,-down, S-Primer) 5 pmol	1 µl
Premix DYEnamic	8 µl
PCR-Produkt (aufgereinigt)	11 µl

Tab. 2.8 Sequenzierreaktion, Programm im Thermocycler

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	96°	02:00 min
Denaturierung	96 °C	00:20 min
Primer-Annealing	50°C	01:00 min
Elongation	60°C	04:00 min

Anzahl der Zyklen: 35

Post reaction clean up

Zu jedem Eppendorf-Zylinder wurden 2 µl Ammoniumacetat und 60 µl 95%iger Alkohol hinzugegeben. Anschließend wurden die 3 Zylinder bei einer Temperatur von 20°C 15 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkraft wurde die DNA als Pellet in den unteren Bereich der Eppendorf-Zylinder gedrückt, die überschüssige Flüssigkeit konnte im oberen Bereich vorsichtig abpipettiert werden. Dieser Vorgang wurde mit 150 µl 70%igem Alkohol wiederholt. Der Zentrifugiervorgang erfolgte wieder bei 20°C, jedoch nur für 10 min. Nachdem die Flüssigkeit wieder vorsichtig im oberen Bereich der 3 Zylinder abpipettiert wurde, ließ man die restliche Flüssigkeit bei geöffneten und vor Kontamination geschützten Zylindern ca. 15-30 min verdunsten.

Analyse der Basensequenz

Zu jedem Eppendorf-Zylinder wurden 10 µl *loading solution* (Loading solution für MegaBACE) hinzugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden im MegaBACE 1000 Sequenzer auf ihre Basensequenz analysiert und computergestützt ausgewertet (MegaBACE Sequence Analyzer Patch 2 Version 3.0, Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland).

2.3.2 Gelelektrophorese mit Photodokumentation

Nachdem vor Durchführung der Versuchsreihen das PCR-Amplifikat einmalig sequenziert worden war (s. oben), erfolgte während der eigentlichen Versuchsreihe eine Kontrolle der PCR qualitativ durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel mit abschließender Photodokumentation und Überprüfung der Länge des erhaltenen Amplifikats. Dieser Arbeitsschritt wurde im Kapitel 2.2.1 „Polymerase-Kettenreaktion“ ausführlicher dargestellt.

2.3.3 Überprüfung auf Kontamination

Die DNA-Proben wurden während der Versuchsreihen auf 96er Multiwellplates verarbeitet. Für sämtliche Syntheseprogramme wurden sterilisierte Platten verwendet. Zudem wurden alle

verwendeten Pipettenspitzen vorher sterilisiert. Während der PCR lief in einem Probentube der Platte eine Negativkontrolle, d. h. statt DNA wurde Reinstwasser eingesetzt, welches mit dem Mastermix versetzt wurde. In der Gelkontrolle der PCR durfte sich hier keine Bande auf dem Photo zeigen, da sonst davon ausgegangen werden musste, dass die Pipettiervorgänge unsauber abgelaufen und die Proben kontaminiert worden sind. In diesem Fall sollte die komplette Platte neu analysiert werden. Die Negativkontrolle wurde auch in der nachfolgenden SNUPE-Reaktion weiterverarbeitet, so dass eine durchgehende Überprüfung auf eventuelle Kontamination während der SNP-Diagnostik gegeben war.

2.3.4 Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung

Jede SNUPE-Kurve wurde von mindestens 2 verschiedenen Personen ausgewertet. Außerdem wurde der *quality score* des SNP-Profiler 1-Programms berücksichtigt. Bei nicht auswertbarem Ergebnis wurde der Versuchsansatz wiederholt.

2.4 Bestimmung der Laborparameter

2.4.1 Insulinkonzentration, HbA1c-Wert und Blutfettwerte

Zur Bestimmung der Blutfettwerte, der Insulinkonzentration und des HbA1c-Wertes wurden Standardlabormethoden angewandt. Die Triglyzeride wurden im COBAS MIRA (Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland) quantitativ im Serum bestimmt. Die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum wurden mithilfe eines enzymatischen Farbtests (NEFA, Wako, Neuss, Deutschland) im COBAS MIRA quantitativ ermittelt. Die Serumkonzentration von Cholesterin wurde im COBAS MIRA durch die „CHOD-PAP“-Methode (ABX Pentra Cholesterol CP, ABX Diagnostics, Göppingen, Deutschland) bestimmt. Die Serumkonzentration von HDL-Cholesterin wurde durch einen colorimetrischen Assay ebenfalls im COBAS MIRA gemessen. Die LDL-Konzentration wurde dann nach der Friedewald-Formel errechnet [Friedewald 1972]:

$$LDL = CHOL - \frac{TG}{2,2} - HDL$$

LDL	=	Low-density lipoproteins	mmol/l
CHOL	=	Cholesterin	mmol/l
TG	=	Triglyzeride	mmol/l
HDL	=	High-density lipoproteins	mmol/l

Die quantitative Bestimmung der Seruminsulinkonzentration erfolgte durch einen *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA, Mercodia Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Schweden) auf dem Pipettierautomaten (Personal Lab, Fa. Adaltis, Freiburg, Deutschland). Der HbA1c-Wert wurde auf

dem „Hi-AUTO A1c Analysensystem HA-8140“ (Menarini Diagnostics, Neuss, Deutschland) gemessen.

2.4.2 Plasmaglukose - Oraler Glukosetoleranztest

Der Blutzucker wurde im kapillären Vollblut im Rahmen des oralen Glukosetoleranztests bestimmt. Die Messung erfolgte nach der Glukoseoxidase-Methode am Analysator „SUPER GL“ (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Deutschland). Die Patienten wurden gebeten, am Vorabend des oGTT ab 22.00 Uhr nichts mehr zu essen und außer Wasser nichts mehr zu trinken. Rauchen war während des gesamten Tests untersagt. Vor Testbeginn wurde den Patienten für die Bestimmung der Nüchterninsulinkonzentration und der freien Fettsäuren Blut abgenommen. Des weiteren wurde der Nüchternblutzuckerwert bestimmt. Die Probanden wurden dann gebeten, innerhalb von 5 min 75g Glukose in 300 ml Wasser (Dextro O. G. T. 300 ml, Fa. Roche, Grenzach-Wylen, Deutschland) zu trinken. Nach 0, 30, 60, 90, 120 und 180 min wurde die Glukosekonzentration im Plasma bestimmt und eine Blutprobe für die Bestimmung der Insulinkonzentration gewonnen. Die Auswertung dieses Blutzuckerbelastungstests erfolgte nach WHO-Kriterien (Tab. 2.9) [WHO 1999]. Aus den Daten des oGTT wurden des weiteren (s. unten) Indizes berechnet, mit denen eine Insulinresistenz bzw. die Insulinsensitivität der Probanden beschrieben werden kann.

Tab. 2.9 Grenzwerte der Plasmaglukose im 75g-oGTT nach WHO-Kriterien

Diagnose	Plasma, venös	Vollblut, kapillär	Zeit oGTT
IFG	110-125 mg/dl (6,1 -6,9 mmol/l)	100-110 mg/dl (5,6 -6,0 mmol/l)	0 min
Diabetes mellitus	≥ 126 mg/dl (≥7,0 mmol/l)	≥ 110 mg/dl (≥6,1 mmol/l)	0 min
IGT	140-199 mg/dl (7,8-11,0 mmol/l)	140-199 mg/dl (7,8-11,0 mmol/l)	120 min
Diabetes mellitus	≥ 200 mg/dl (≥11,1 mmol/l)	≥ 200 mg/dl (≥11,1 mmol/l)	120 min

2.5 Anthropometrie und Blutdruckmessung

Die anthropometrischen Messungen zur Ermittlung von Körpergröße, Gewicht sowie Taillen- und Hüftumfang erfolgten am stehenden, in Unterwäsche bekleideten Probanden.

2.5.1 Körpergröße, Gewicht und BMI

Mit einer Messlatte wurde die Körpergröße auf 1 cm genau abgemessen. Das Gewicht wurde mit einer geeichten, digitalen Waage auf 100 g genau erfasst. Aus Körpergewicht und Körpergröße wurde der Body-Mass-Index (BMI) ermittelt, der wie folgt errechnet wurde:

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

Die nachfolgende Tabelle 2.10 zeigt die Einstufung anhand des BMI in Untergewicht, Normalgewicht und Übergewicht nach den Kriterien der World Health Organization [WHO 2003].

Tab. 2.10 Gewichtseinstufung anhand des BMI nach WHO-Kriterien

Gewichtseinstufung in:	BMI in kg/m ²
Untergewicht	<18,5
Normalgewicht	18,5 bis 24,9
Übergewicht	≥25
<i>leichtes Übergewicht</i>	25 bis 29,9
<i>Adipositas I</i>	30 bis 34,9
<i>Adipositas II</i>	35 bis 39,9
<i>massive Adipositas</i>	≥40

2.5.2 Taillenumfang, Hüftumfang und Waist-to-Hip-Ratio

Der Taillen- und Hüftumfang wurde mit einem Maßband auf 0,1 cm genau abgemessen. Aus den ermittelten Werten konnte daraufhin der Quotient aus Taillenumfang und Hüftumfang, die Waist-to-Hip-Ratio (WHR), gebildet werden.

$$WHR = \frac{\text{Taillenumfang(cm)}}{\text{Hüftumfang(cm)}}$$

2.5.3 Körperfettanteil, Gesamtkörperfett und fettfreie Körpermasse

Die Dickenmessungen der Trizeps-, Bizeps-, Rücken- und Hüfthautfalte erfolgten an der rechten Körperseite des Probanden mit einem Kaliper der Firma Lange (Lange, Cambridge, Maryland, USA). Diese Messungen erfolgten auf 1 mm genau. Aus jeweils 3 aufeinander folgenden Messungen der 4 Hautfalten wurde der Mittelwert gebildet, der dann in die weiteren Berechnungen mit einbezogen wurde.

Mit den folgenden Gleichungen [Durnin, Womersly 1974], [Siri 1993] lässt sich aus den Mittelwerten der Hautfaltenmessung der prozentuale Körperfettanteil und daraus die Gesamtkörperfettmasse in kg (Total body fat, TBF) sowie die fettfreie Körpermasse in kg (Lean body mass, LBM) errechnen.

$$\text{Körperfettanteil (\%)} = \frac{4,95}{D} - 4,5 \times 100\%$$

$$\text{Frauen: } D = \frac{1156,7 - 71,7 \times \log \sum \text{Hautfaldendicke}(\text{Bizeps, Trizeps, Rücken, Hüfte})}{1000}$$

$$\text{Männer: } D = \frac{1176,5 - 74,4 \times \log \sum \text{Hautfaldendicke}(\text{Bizeps, Trizeps, Rücken, Hüfte})}{1000}$$

$$\text{TBF (kg)} = \frac{\text{Körperfettanteil}(\%) \times \text{Körpergewicht}(\text{kg})}{100}$$

$$\text{LBM (kg)} = \text{Körpergewicht}(\text{kg}) - \text{TBF}(\text{kg})$$

2.5.4 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte nach einer ca. 15-minütigen körperlichen Ruhephase am rechten Oberarm beim sitzenden Probanden. Der Blutdruck wurde dabei 3 Mal im Abstand von 5 min gemessen. Aus dem 2. und 3. Messwert wurde der Mittelwert gebildet, welcher den Blutdruck des Probanden am besten widerspiegelte [Schulze 2000].

2.6 Bestimmung der Insulinsensitivität

2.6.1 Clamptest

Die euglykämisch-hyperinsulinämische Clamptechnik ist eine kombinierte Insulin-Glukose-Infusionstechnik, die 1979 zum ersten Mal von DeFronzo und Mitarbeitern [DeFronzo 1979] eingesetzt wurde. Zum Zeitpunkt dieser Studie hatten 21 Teilnehmer der Studiengruppe mit normaler Glukosetoleranz diesem aufwendigen Test zugestimmt. Die Probanden erschienen morgens nüchtern zum Test. Es erfolgte eine kontinuierliche Infusion mit Insulin (40 mU/m² KO, Actrapid, NOVO Nordisk Pharma GmbH, Mainz, Deutschland). Mit einer variablen Glukoseinfusion (10%, B. Braun, Melsungen, Deutschland) wurde der kapilläre Blutzuckerwert zwischen 72 mg/dl und 88 mg/dl konstant gehalten. Ein konstantes Intervall über mehr als 20 min nach Testbeginn wurde als *steady state* angenommen.

Durch die Insulininfusion war nach ca. 30-50 min die hepatische Glukoneogenese gehemmt, so dass die metabolisierte Glukose der exogen zugeführten Glukose entsprach. Ab Erreichen dieses Gleichgewichtszustands entsprach die gesamte infundierte Glukosemenge (exogene Glukoseinfusionsrate) der Menge an Glukose, die in allen Geweben des Körpers utlisiert wurde. Die Glukoseutilisationsrate („M-Wert“) quantifizierte die Insulinsensitivität des Probanden. Je mehr Glukose infundiert werden musste, um so sensitiver reagierte der Proband gegenüber Insulin. Der M-Wert berechnete sich als *mg Glukoseinfusion pro min pro kg Körpergewicht*. Mögliche Störeinflüsse durch eine hypoglykämische Gegenreaktion, eine endogene Insulinreaktion oder Hyperglykämie

werden bei der Clamptechnik ausgeschaltet. Der Clamptest gilt als der „Goldstandard“ zur Berechnung der Insulinresistenz bzw. Insulinsensitivität.

2.6.2 Indizes der Insulinsensitivität

Da nur von 21 Probanden Daten aus dem Clamp vorlagen, wurden in dieser Arbeit ersatzweise Indizes verwendet, welche die Insulinsensitivität beschreiben [Gründler 2004]. Von den unten beschriebenen Indizes korrelierte der von Stumvoll und Kollegen [Stumvoll 2000], [Stumvoll 2001] vorgeschlagene Insulinsensitivitäts-Index $(0,226-0,0031 \times \text{BMI}-0,0000543 \times I_{120}-0,00375 \times G_{90})$, im folgenden $ISI_{2\text{Stumvoll}}$ genannt, am besten mit dem Ergebnis des Clamptests so dass in dieser Arbeit mit diesem Index weitergearbeitet wurde.

Indizes aus Nüchternblutparametern

HOMA-Modell

Das HOMA-Modell (Homeostasis modell assessment) bietet einen einfacher zu bestimmenden Insulinresistenz-Index, der gut mit dem M-Wert aus dem Clamptest korreliert [Matthews 1985]. Hierbei werden zur Bestimmung der Insulinresistenz die Werte für Nüchterninsulin und Nüchternplasmaglukose herangezogen. Ein niedriger Wert steht für eine hohe Insulinsensitivität, hohe Werte eher für eine Insulinresistenz.

Der $HOMA_{IR}$ errechnet sich wie folgt:

$$HOMA_{IR} = \frac{I_0 \times G_0}{22,5}$$

I_0 = Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)
 G_0 = Nüchternglukosekonzentration (mmol/l)

QUICKI-Index

Der QUICKI-Index (Quantitative insulin sensitivity check index) nach Katz [Katz 2000] errechnet sich ebenfalls aus der Nüchternglukose- und der Nüchterninsulinkonzentration.

$$QUICKI = \frac{1}{\log(I_0) + \log(G_0)}$$

I_0 = Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)
 G_0 = Nüchternglukosekonzentration (mmol/l)

QUICKI_{FFA}

Beim QUICKI_{FFA}-Modell wird die Konzentration der freien Fettsäuren in die Berechnung mit einbezogen. Dieser Index wurde im Jahr 2001 von Perseghin eingeführt [Perseghin 2001].

$$QUICKI_{FFA} = \frac{1}{\log(I_0) + \log(G_0) + \log(FFA)}$$

I_0 =Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)
 G_0 =Nüchternglukosekonzentration (mmol/l)
 FFA =Konzentration der freien Fettsäuren (mmol/l)

Index nach McAuley

Beim Insulinresistenz-Index nach McAuley [McAuley 2001] wird die Konzentration der Triglyzeride im Nüchternblut in die Berechnung einbezogen. Der Index berechnet sich wie folgt:

$$IR_{McAuley} = \exp(2,63 - 0,28 \times \ln(I_0) - 0,31 \times \ln(TG))$$

I_0 =Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)
 TG =Nüchterntriglyzeridkonzentration (mmol/l)

Basales Insulin

Für klinische Zwecke ist die Messung der Plasmainsulinkonzentration der einfachste Weg zur Quantifizierung einer Insulinresistenz. Da sich nach einer Mahlzeit die Glukosewerte und mit ihnen die Insulinwerte relativ dynamisch verändern, bestimmt man die Plasmainsulinkonzentration am besten nach einer 8-stündigen nächtlichen Fastenperiode. Die Insulinwerte hängen allerdings nicht nur von der Insulinsensitivität der Gewebe ab, sondern auch von der Sekretionsrate, der Verteilung und dem Abbau des Insulins. Im Prinzip jedoch weisen hohe Plasmainsulinwerte bei normalen Glukosewerten mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Insulinresistenz hin.

Indizes aus den oGTT-Werten

Index nach Matsuda

Der Insulinsensitivitäts-Index nach Matsuda und DeFronzo [Matsuda 1999] schließt die Insulin- und Glukosekonzentrationen zum Zeitpunkt Null des oralen Glukosetoleranztests (Nüchterninsulin und Nüchternglukose) und die Mittelwerte der Konzentrationen zur jeweiligen Zeit t (in dieser Studie Blutabnahmen bei 0, 30, 60, 90, 120 und 180 min) während des Tests in die Berechnungen ein. Dieser Index beschreibt sehr gut die Insulinsensitivität der Gewebe und korreliert eng mit den Daten aus dem euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamptest [Matsuda 1999].

$$ISI_{Matsuda} = \frac{10000}{\sqrt{G_0 \times I_0 \times G_{mean} \times I_{mean}}}$$

I_0 =Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)
 G_0 =Nüchternglukosekonzentration (mmol/l)
 I_{mean} =Mittelwert der Insulinkonzentrationen zur jeweiligen Zeit t des oGTT (mU/l)
 G_{mean} =Mittelwert der Glukosekonzentrationen zur jeweiligen Zeit t des oGTT (mmol/l)

Index nach Cederholm

Beim Insulinsensitivitäts-Index nach Cederholm und Wibell [Cederholm 1990] wird zusätzlich zu den Werten der Insulin- und Glukosekonzentrationen aus dem oGTT das Körpergewicht in die Berechnung mit einbezogen.

$$ISI_{Cederholm} = \frac{75000 + (G_0 - G_{120}) \times 1,15 \times 180 \times 0,19 \times KG}{120 \times \log(I_{mean}) \times G_{mean}}$$

G_{120}	=Glukosekonzentration zum Zeitpunkt der Blutabnahme nach 120 min (mmol/l)
G_0	=Nüchternglukosekonzentration (mmol/l)
I_{mean}	=Mittelwert der Insulinkonzentrationen zur jeweiligen Zeit t des oGTT (mU/l)
G_{mean}	=Mittelwert der Glukosekonzentrationen zur jeweiligen Zeit t des oGTT (mmol/l)
KG	=Körpergewicht (kg)

Indizes nach Stumvoll

In dieser Studie wurden die Insulinsensitivitäts-Indizes ISI_1, ISI_2 und ISI_3 nach Stumvoll verwendet [Stumvoll 2000], [Stumvoll 2001]. Diese berechnen sich wie folgt:

$$ISI_{1,Stumvoll} = 0,156 - 0,000049 \times I_{120} - 0,000321 \times I_0 - 0,00541 \times G_{120}$$

$$ISI_{2,Stumvoll} = 0,226 - 0,0031 \times BMI - 0,0000543 \times I_{120} - 0,00375 \times G_{90}$$

$$ISI_{3,Stumvoll} = 0,157 - 4,576 \times 10^{-5} \times I_{120} - 0,000321 \times I_0 - 0,00541 \times G_{120}$$

I_{120}	=Insulinkonzentration zum Zeitpunkt der Blutabnahme nach 120 min (mU/l)
I_0	=Nüchterninsulinkonzentration (mU/l)
G_{120}	=Glukosekonzentration zum Zeitpunkt der Blutabnahme nach 120 min (mmol/l)
BMI	=Body-Mass-Index (kg/m ²)
G_{90}	=Glukosekonzentration zum Zeitpunkt der Blutabnahme nach 90 min (mmol/l)

2.7 Erfassung des Ernährungsverhaltens der Probanden

Das Ernährungsverhalten der Probanden wurde mithilfe eines 4-Tage-Ernährungsprotokolls (modifiziertes Giessener Ernährungsprotokoll [Hoffmann 1994]) erfasst. Die Probanden sollten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen (Sonntag bis Mittwoch) ihr Ernährungsverhalten dokumentieren und dabei möglichst nicht von ihren Gewohnheiten abweichen. Die Protokolltabellen für den Probanden waren nach Lebensmittelgruppen geordnet (z. B. Brot und Backwaren, Gemüse, Fisch und Meeresfrüchte, etc.). Vorgegeben waren zur leichteren Handhabung Standardportionen (z. B. Buttercremetorte 125g), so dass der tatsächliche Verzehr durch das entsprechende Vielfache (oder auch Bruchteil) eingetragen werden konnte, ohne jedes Lebensmittel auswiegen zu müssen. Die Auswertung der Ernährungsprotokolle wurde aus der Diplomarbeit von Silvia Gründler übernommen [Gründler 2004]. Die Schwierigkeit bei der Auswertung von Ernährungsfragebögen besteht unter anderem darin, ein *underreporting*, d. h. eine Diskrepanz zwischen der vom Probanden angegebenen Energiezufuhr und dem messbaren Energieverbrauch, auszuschließen [zur Übersicht

Livingstone 2003]. Milne und Kollegen [Milne 1991] versuchten in ihrer Studie bezüglich dieser Diskrepanz, in ein *underrecording* und *undereating* zu unterscheiden. So bedeutet ein *underrecording* eine Diskrepanz zwischen Energiezufuhr und gemessenem Energieverbrauch ohne Änderung des Körpergewichts, d. h. der Proband beantwortete den Fragebogen hinsichtlich seines Ernährungsverhaltens nicht korrekt. Ein *undereating* beschreibt eine Diskrepanz zwischen angegebener Energiezufuhr und gemessenem Energieverbrauch mit einer Verringerung des Körpergewichts, d. h. der Proband wich im Untersuchungszeitraum von seinen Ernährungsgewohnheiten ab und aß weniger, ohne dieses im Fragebogen anzugeben. Um ein *underreporting* auszuschließen, wurde der Cut-Off-Faktor nach Goldberg [Goldberg 1991] verwendet. Dieser Faktor ist abhängig von der Probandenzahl und der Dauer der Ernährungsdokumentation und wurde in den entsprechenden Tabellen von Goldberg abgelesen [Goldberg 1991]. Von allen Probanden wurde der Grundumsatz (BMR, basic metabolic rate) nach der Harris-Benedict-Formel (s. Tab. 2.11) berechnet und anschließend mit dem Cut-Off-Faktor 1,475 multipliziert. Die Gesamtenergie (in kcal) laut Ernährungsprotokoll sollte über $1,475 \times BMR$ liegen. *Underrecorder* und *undereater* wurden in der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Tab. 2.11 Harris-Benedict-Formel zur Berechnung des Grundumsatzes

Harris-Benedict-Formel:	
♀	$BMR = 655,1 + [9,563 \times \text{Gewicht (kg)}] + [1,85 \times \text{Größe (cm)}] - [4,676 \times \text{Alter (a)}]$
♂	$BMR = 66,5 + [13,75 \times \text{Gewicht (kg)}] + [5,003 \times \text{Größe (cm)}] - [6,775 \times \text{Alter (a)}]$

2.8 Erfassung der körperlichen Aktivität der Probanden

Der „Goldstandard“ zur Erfassung der körperlichen Aktivität ist die *doubly labelled water*-Methode [zur Übersicht Livingstone 2003]. Bei dieser Methode trinken die Probanden nach anfänglicher Urinprobe Isotopen-markiertes Wasser ($^2\text{H}_2\text{ }^{18}\text{O}$). Nach vorgegebenen Zeitpunkten wird in weiteren Urinproben die Isotopenanreicherung gemessen. Über die unterschiedlichen Erscheinungsraten der Isotope kann die Kohlendioxidproduktion errechnet und der Energieumsatz ermittelt werden [Conway 2002]. Diese Methode ist mit sehr hohen Kosten und großem Aufwand verbunden und eignet sich daher nicht für größere Studiengruppen. Die Erfassung der körperlichen Aktivität erfolgte im Rahmen dieser Studie daher aus praktischen Gründen durch einen standardisierten Fragebogen *EPAQ2* (EPIC physical activity questionnaire). Die Beantwortung der Fragen bezog sich auf die letzten 12 Monate und erfasste die körperlichen Aktivitäten zuhause, während der Arbeit und in der Freizeit. Um den Probanden das Ausfüllen der Fragebögen zu erleichtern, wurde im EPAQ2 der Zusammenhang, in welchem die körperliche Aktivität erfolgte, erfragt (z. B. Laufen

zu Hause, während der Arbeit, in der Freizeit). Unvollständig ausgefüllte Fragebögen wurden nicht berücksichtigt. Die Auswertung der EPAQ2 wurde aus der Diplomarbeit von Silvia Gründler übernommen [Gründler 2004].

Die Intensität der körperlichen Aktivität wurde mit Hilfe des *MET-Index* (Metabolic equivalent) ausgedrückt. Dieser Index charakterisiert das Verhältnis des Energieverbrauchs einer spezifischen Aktivität zum Ruheumsatz. Ein MET entspricht $3,5 \text{ ml O}_2/\text{kg KG}/\text{min}$ (Sauerstoffaufnahme in Ruhe) [Schutz 2001], [Irwin 2001]. So konnten Aktivitäten hoher Intensität (MET-Index >6), mittlerer Intensität (MET-Index 3-6) und geringer Intensität (MET-Index <3) unterschieden werden [Pate 1995]. Jeder körperlichen Aktivität wurde der entsprechende MET-Index zugeordnet, und anschließend wurde diese mit der Dauer (erfasst in Stunden pro Woche) multipliziert. So konnte der *Energieaufwand* (Energy expenditure) berechnet werden. Erfasst wurden so die Aktivitäten zu Hause, während der Arbeit und während der Freizeit in MET-Stunden pro Woche. Zusätzlich berechnet wurden die Gesamtfernsehzeit und anstrengende Freizeitaktivitäten (in Stunden pro Woche) sowie die Wochenstundenzahl aller Freizeitaktivitäten. Der Gesamtindex, der sogenannte *self-reported physical activity index*, angegeben in MET-Stunden pro Woche, wurde nach Wareham [Wareham 2002] aus der Summe aller Aktivitäten während der Arbeit und Freizeit gebildet. Er diente als Maß für die sportliche bzw. körperliche Aktivität der Probanden in dieser Studie.

2.9 Statistische Auswertung

Die Allelverteilung des Polymorphismus wurde mit der Hardy-Weinberg Formel überprüft [Stern 1943]. Von Parametern, die zwischen den unterschiedlichen Gruppen geprüft wurden, sind der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt. Alle Parameter wurden zuerst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft.

Normalverteilte Parameter wurden zwischen den gebildeten Gruppen mit dem T-Test bzw. ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet, nicht normalverteilte Parameter mit dem Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test. Kategorische Parameter wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson bzw. mit Fisher's exaktem Test auf signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen den jeweiligen Gruppen getestet. Als signifikant wurde ein zweiseitiges Niveau von $<0,05$ angenommen. Die multiple Testung wurde mit der Bonferroni-Adjustierung korrigiert. Der Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem metabolischen Syndrom bezogen auf die Waist-to-Hip-Ratio wurde zusätzlich mittels logistischer Regressionsanalyse korrigiert. Bei den Korrelationsberechnungen zwischen den Indizes der Insulinresistenz und dem M-Wert aus dem Clamptest wurde der Rangkorrelationskoeffizient R (Spearman's Rho) ermittelt. Die Interaktionen zwischen dem Pro12Ala-Polymorphismus und den ausgewählten Umweltfaktoren hinsichtlich der

Endpunkte metabolisches Syndrom und Insulinresistenz wurden mittels Regressionsanalyse unter Einschluss multiplikativer Interaktionsterme untersucht. Angegeben ist jeweils das Signifikanzniveau für den Interaktionsterm.

Alle Tests wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 8.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

