

Aus dem Lehrstuhl der
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Die Bedeutung eines Pro115Gln Polymorphismus im Bereich des PPAR γ 2-Genes
für das Auftreten von krankhafter Adipositas

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Daniel Forstner
aus
Oberhinkofen

2008

Aus dem Lehrstuhl der
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Die Bedeutung eines Pro115Gln Polymorphismus im Bereich des PPAR γ 2-Genes
für das Auftreten von krankhafter Adipositas

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Daniel Forstner
aus
Oberhinkofen

2008

Dekan:

Prof. Dr. B. Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler

2. Berichterstatter:

PD Dr. med. Okka Hamer

Tag der mündlichen Prüfung:

19.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Bedeutung der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren

1.1.1 Wirkung und Resultate in natura

1.1.2 Unterteilung und topobiochemisches Vorkommen der PPARs

1.1.3 Relevanz und medizinische Nutzbarkeit

1.2 PPAR γ und Adipositas

1.3 Molekularbiologie und Epidemiologie

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

2. Material

2.1 Laborgeräte

2.2 Standardchemikalien

2.3 Puffer und Lösungen

2.4 Verwendete Primer

3. Methodik

3.1 Der Arbeit zugrunde liegendes Studienkollektiv

3.1.1 Studienpopulation

3.1.2 Untersuchungen

3.1.3 Einschlusskriterien für die vorliegende Arbeit

3.2 Probenaufbereitung

3.2.1 Gewinnung der Blutproben

3.2.2 DNA-Isolierung

3.2.3 Klonierung der DNA

3.3 Amplifikation der DNA mittels PCR-Technik

3.3.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

3.3.2 Anwendung der PCR für PPAR γ -Mutationsnachweis

3.4 Restriktionsverdau und Darstellung der PCR-Produkte

3.4.1 Verdau durch Endonuklease HIND II

3.4.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

3.4.3 Darstellung und Auswertung der Bandenmuster

3.5 Statistische Methoden

4. Ergebnisse

4.1 Auswahl der Subpopulation

4.2 Vergleich der Subpopulation zum Gesamtkollektiv

4.3 Ergebnisse der PPAR γ -Mutationsanalysen

5. Diskussion

5.1 Gegenwärtige Relevanz von Adipositas

5.2 Genetische Prädispositionen für Adipositas

5.3 Relevanz von PPAR als Prädisposition

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

8.2 Lebenslauf

8.3 Danksagung

**Ich widme diese Arbeit meiner Frau Tatjana
und meiner Tochter Felicitas**

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Bedeutung der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren

1.1.1 Wirkung und Resultate in natura

Peroxisomen sind Zellorganellen mit einer Vielzahl an Funktionen. So sind sie für die Elimination von molekularem Sauerstoff und die Aufspaltung von Wasserstoffperoxyd zuständig. Des Weiteren sind sie in die Glycerollipid-Synthese, die Cholesterolsynthese, den Cholesterolabbau sowie die Fettsäureoxidation involviert. Aufgrund der Beobachtung, dass es Zusammenhänge zwischen Peroxisomenproliferation und verschiedenen Stoffwechselvorgängen gibt, kam es zur weiteren Erforschung dieser Sachverhalte. Im Jahr 1990 wurde durch Issemann und Green in einem Experiment beobachtet, dass die Proliferatoren von Peroxisomen ein Gen in der Steroidrezeptorenfamilie aktivieren konnten. Diese Reaktion konnte auf die Interaktion mit einem speziellen Kernrezeptor zurückgeführt werden, welcher als PPAR bezeichnet wurde (Vamecq et Latruffe, 1999). PPARs (Peroxisomen-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren) stellen eine Untergruppe der hormonellen Kernrezeptoren dar. Zum selben Subtyp der Kernrezeptoren zählen auch die Rezeptoren für das Schilddrüsenhormon L-Thyroxin, für Steroide und für Vitamin D (Spiegelman, 1998; Laudet et al., 1992; Desvergne et Wahli, 1999). Sie alle sind über Liganden aktivierbare Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression der Zelle steuern.

PPARs beeinflussen die Induktion der Enzyme für die peroxismale und mitochondriale Fettsäureoxidation (z.B. Acyl-CoA-Oxidase) sowie die Genexpression von weiteren Proteinen (z.B. aP2, PEPCK), welche mit dem Fettstoffwechsel mittelbar assoziiert sind (Keller et Wahli, 2000; Schoonjans et al., 1996).

Einmal durch einen Liganden aktiviert, erfolgt die Bindung der PPAR an den Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Dieser Komplex bindet dann spezifisch an eine genau definierte DNA-Sequenz von Gen-Promotoren, welche als Peroxisomen-Proliferator-Response-Elemente (PPRE) bezeichnet werden. Hierdurch kommt es

zur Transkription von bestimmten Genen, mit vermehrter Ausbildung der entsprechenden Proteine (Auwerx, 1999; Schoonjans et al, 1996). Eine schematische Darstellung dieser Vorgänge zeigt Abbildung 1.

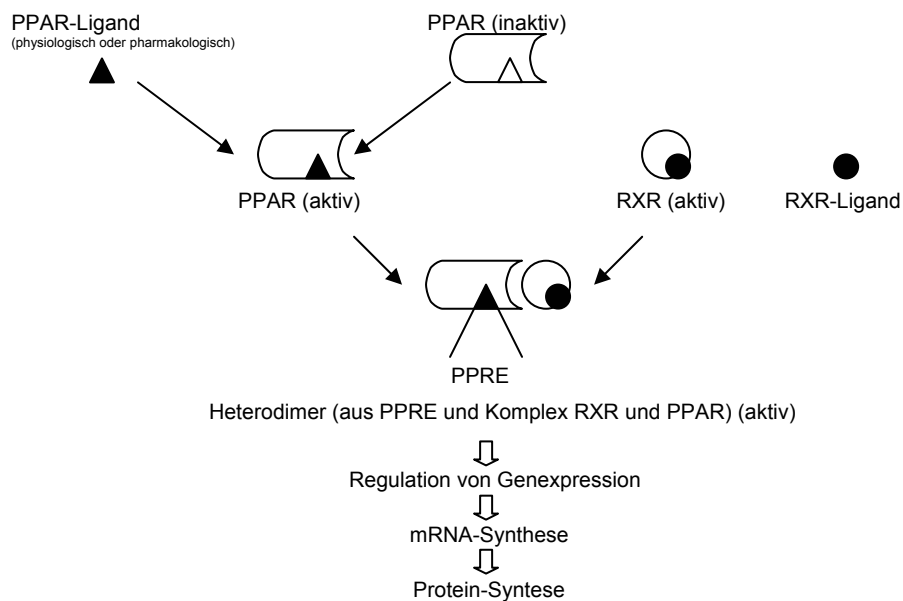


Abb.1: Schematische Darstellung der Aktivierung von PPAR durch Ligand, danach Bindung mit aktivierten RXR, dies dockt im Genom an PPRE an und führt dadurch zur selektiv gesteigerten Transkription mit konsekutiv vermehrter Proteinbildung.

So kann z.B. durch die positive Beeinflussung der menschlichen APO-A1- und APO-A2-Transkriptionsvorgänge, indem die PPARs aktiviert werden, eine Erhöhung des zirkulierenden High Density-Lipoproteins (HDL) induziert werden. Dies erklärt sich dadurch, dass diese als Hauptbestandteile Apolipoprotein A1 und A2 beinhalten. Dieser Zusammenhang wird zum Beispiel bei der Behandlung von Fettstoffwechselstörungen angewendet. Man setzt unter anderem Lipidsenker vom Fibrattyp ein (z.B. Fenofibrat), welche Liganden von PPAR α sind. Durch diese Behandlung kann man gezielt den Plasmaspiegel an HDL erhöhen und gleichzeitig eine Senkung des Very Low Density-Lipoprotein-Spiegels (VLDL) bewirken.

Neben der Beeinflussung des Fettstoffwechsels haben PPARs auch Einfluss auf die Differenzierung von Adipozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Myozyten sowie Monozyten/Makrophagen (Vamecq et Latruffe, 1999).

1.1.2 Unterteilung und topobiochemisches Vorkommen der PPARs

Bislang wurden PPARs nur in Säugetieren nachgewiesen. Die ersten PPARs wurden 1990 dabei aus Maus-Hepatozyten kloniert. Beim Menschen sind drei spezielle PPAR-Isotypen identifiziert worden: PPAR α , PPAR β (entspricht PPAR δ) und PPAR γ (Desvergne et Wahli, 1999; Vidal-Puig et al., 1997). Zusätzlich unterteilt sich PPAR γ nochmals in drei Subtypen. Im Gegensatz zur Maus, bei der nur zwei Isoformen der PPAR γ -mRNA gefunden wurden, liegen beim Menschen drei Untertypen $\gamma 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$ vor (Auwerx et al., 1999). Jeder Isotyp besitzt eine unterschiedliche Gewebeverteilung und eine eigene biologische Funktion. So wird PPAR α vor allem in Herzmuskelzellen und Geweben, in denen Glukoneogenese bzw. vermehrt Fettsäuremetabolismus erfolgt (z.B. Leber, Darmmukosa, braunes Fettgewebe und Niere), exprimiert. Im Gegensatz dazu, ist PPAR β in nahezu allen Geweben nachzuweisen. PPAR $\gamma 1$ ist ebenfalls ubiquitär vorzufinden, während PPAR $\gamma 2$, das immerhin 20 % der Gesamtmenge an PPAR γ -RNA beträgt, ausschließlich im Fettgewebe in bedeutenswerter Menge exprimiert wird (Spiegelman, 1998; Vidal-Puig et al., 1997; Auboeuf et al., 1997). Das Vorkommen von PPAR $\gamma 3$ -mRNA beschränkt sich auf Makrophagen und Darmmukosa (Kliwer et al., 1994; Braissant et al., 1996). Generell unterscheiden sich die einzelnen Isoformen nicht nur in ihrer topobiochemischen Verteilung, sondern auch funktionell sowohl in ihrer unterschiedlichen Beeinflussung diverser Stoffwechselvorgänge als auch in der spezifischen Aktivierbarkeit durch jeweils andere Liganden.

PPARs können durch unterschiedliche exogene Substanzen aktiviert werden. Dies sind z.B. Lipidsenker (Fibrate), Herbizide oder Antidiabetika vom Thiazolidindione (TZD)-Typ, aber auch körpereigene Stoffe, wie z.B. Prostaglandin J2. Dies lässt eine wichtige Rolle der PPARs im Zusammenhang mit Adipositas und der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 vermuten. Die Untergruppe mit der größten medizinischen Relevanz sind PPAR α und PPAR γ , da diese die Zielrezeptoren für die bereits angesprochenen TZDs und Fibrate

darstellen, welche weltweit in großer Menge täglich angewendet werden (Evans et al., 2004).

1.1.3 Relevanz und medizinische Nutzbarkeit

Eine wichtige Eigenschaft der PPARs ist ihre Fähigkeit (vor allem von PPAR γ), Zellen für Insulin zu sensitivieren. Diese Eigenschaft wird in der heutigen Zeit gezielt zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 durch TZD genutzt. Die nahezu selektive Aktivierung von PPAR γ durch TZD führt zu einer gesteigerten Insulinempfindlichkeit im Muskel, in der Leber und im Fettgewebe (Riddle, 1998; Day, 1999; Scheen et Lefebvre, 1999). Neben der Sensibilitätssteigerung von Zellen gegenüber Insulin wird zusätzlich eine Senkung der zirkulierenden Fette beobachtet.

Eine weitere jedoch noch nicht klar erforschte therapeutische Relevanz von PPARs bzw. ihre pharmakologischen Liganden ist ihr Einfluss auf andere Zellkreisläufe und Stoffwechselvorgänge. Es konnte mittlerweile in Studien Auswirkungen auf die Karzinogenese, Entzündungen, Atherosklerose und Immunmodulation nachgewiesen werden (Rosen et Spiegelman, 2001; Kersten et al., 2000; Olefsky et Saltiel, 2000). So wurde z.B. gezeigt, dass eine Ligandenaktivierung von PPAR γ bei Prostata-, Brust-, Kolon-, Magen-, Lunge-, Blasen-, Schilddrüsen- und Nierenkarzinomzellen eine Differenzierung induzieren und die Proliferation inhibieren kann. Diese Beobachtungen bestätigen sich auch bei Liposarkom- und Glioblastomzelllinien in vitro und in vivo (Strakova et al., 2004). Es gibt mittlerweile vermehrt Bestrebungen, synthetische PPAR γ -Agonisten zur Tumorthapie bei Gefäßtumoren einzusetzen (Vogt et al, 2003). Dieses Wirkungsfeld ist jedoch nicht Thema dieser Arbeit.

Die lipidsenkende Wirkung von Fibraten ist, wie bereits im Vorfeld erwähnt, eine PPAR-vermittelte Reaktion. Diese wirken als Liganden an den verschiedenen Peroxisomen-Proliferator-Aktivierten-Rezeptoren.

Die positiven und erwünschten Wirkungen und Effekte von Fibraten und Thiazolidindionen fasst noch einmal Tabelle 1 zusammen.

Medikament	Wirkung	Positive Effekte
Fibrate und TZD	Induktion von Apolipoprotein A1 und Apolipoprotein A2	Erhöhung HDL-Spiegel
	Induktion von Lipoproteinlipase Reduktion von Apolipoprotein C3 Expression	Erhöhte Plasmatriglyceridhydrolyse (VLDL im Serum sinkt)
	Erhöhte peroxismale und mitochondriale β -Oxidation	Erhöhter Abbau von Fettsäuren
	Erhöhte Expression von Genen für Fettsäure-Transportproteine und Acyl-CoA-Synthetase	Stimulation der zellulären Fettsäureaufnahme und Umwandlung dieser in Acyl-CoA-Derivate.
	Reduktion von Acyl-CoA-Carboxylase	Geringere Fettsäurebiosynthese
TZD	Erhöhung der Sensibilität von Zellen gegenüber Insulin	Senkung des Insulinbedarfs
	Reduktion Leptin-Gen Expression	Senkung Leptinspiegel im Serum
	Erhöhte Expression von Adiponectin (Insulinsensitivierendes Adipozytenhormon)	Senkung des Insulinbedarfs

Tab.1: Erwünschte Effekte von TZD und Fibraten im Bezug auf ihre Einsatzgebiete im klinischen Alltag (Rangwala et Lazar, 2004; Schoonjans et al., 1996).

Leider zeigen sich neben diesen positiven Effekten (vor allem auch für die TZD) unerwünschte Nebenwirkungen. So lässt sich gelegentlich eine Gewichtszunahme von teilweise mehreren Kilogramm (Riddle, 1998; Kawai et al., 1999; Mori et al., 1999) beobachten. Diese Nebenwirkung wird auf eine nachweisbare Erhöhung des Plasmavolumens und der intrazellulären Wassereinlagerung sowie auf die Auswirkung von PPAR γ auf die Adipozyten-Differenzierung zurückgeführt. Sie werden im nächsten Kapitel näher erläutert.

1.2 PPAR γ und Adipositas

Das menschliche PPAR γ -Gen ist im Chromosom 3 auf Position 3p25 lokalisiert (Greene et al., 1995). Es umfasst mehr als 100.000 Basenpaare in der codierenden DNA. Als Folge von verschiedenen Splicingvorgängen entstehen aus dem Transkript für PPAR γ die mRNA-Matrizen für PPAR γ 1, PPAR γ 2 und PPAR γ 3 (Desvergne et Wahli, 1999; Auwerx, 1999; Fajas et al., 1998; Tontonoz et al., 1994; Zhu et al., 1995). Diese Gene sind, wie schon in den vorigen Kapiteln angeklungen, vor allem in die Adipozyten-Differenzierung und die Regulation von Fett- und Kohlenhydratstoffwechselvorgängen involviert (Spiegelman, 1998; Auwerx, 1999; Tontonoz et al., 1994; Latruffe et Vamecq, 1997; Zhang et al., 1996). Zudem senkt aktiviertes PPAR γ mittelbar die Plasmaspiegel von Leptin, TNF α (Tumornekrosefaktor α) und Resistin und erhöht gleichzeitig den Adiponectin- und Lipoproteinlipasespiegel. Diese Vorgänge steigern in vivo die Insulinsensitivität von Leber und Muskel und senken die Menge an freien Fettsäuren im Serum (Evans et al., 2004). Durch die Aktivierung von PPAR γ kommt es somit im menschlichen Adipozyten zu einer gesteigerten Aufnahme von Fettsäuren durch vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen (FattyAcidTransportProtein1 und CD36), welche die Aufnahme der Fettsäuren in die Zelle ermöglichen. Gleichzeitig wird der Eflux reduziert, indem durch Induktion bestimmter Enzyme (z.B. Glycerolkinase) im Adipozyten vermehrt Fettsäuren in Triglyceride umgewandelt werden. Zudem wird die Glukoseaufnahme und -verstoffwechslung in den Adipozyten durch Induktion weiterer Transportmoleküle (GLUT4) und Enzyme gesteigert. Die Folge ist zwar eine Senkung der Plasmatriglycerid- und VLDL-Konzentration, sowie des Glukosespiegels im Plasma, aber auch eine vermehrte Einlagerung von Triglyceriden in die Fettzellen (Rangwala et Lazar, 2004). Neben diesen Effekten auf den Adipozytenstoffwechsel konnte auch eine deutliche PPAR γ -vermittelte Zunahme ihrer Anzahl nachgewiesen werden (Spiegelman, 1998; Tontonoz et al., 1994).

Eine Aktivierung von PPAR γ führt schließlich im menschlichen Organismus zu einer erhöhten Adipogenese in Form von vermehrter Umwandlung von Adipoblasten in Adipozyten. Dabei war aber zu beobachten, dass trotz Zunahme der Anzahl die Adipozyten in ihrer Größe kleiner als normale adulte Adipozyten sind (Spiegelman, 1998; Tontonoz et al., 1994). In vitro konnte zudem eine

Umwandlung von Fibroblasten in Adipozyten durch PPAR γ -Aktivierung nachgewiesen werden (Albrechtsen et al., 2002). Die Differenzierung von Adipozyten wird vor allem durch PPAR γ 2 beeinflusst, das seine höchste Konzentration in Fettgewebe besitzt. Unter Berücksichtigung der hier skizzierten Gesamtheit der durch PPAR γ -Aktivierung hervorgerufenen Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel, liegt die Vermutung nahe, dass eine vermehrte Aktivierung zur Anhäufung von Adipozyten und somit auch zu Adipositas führen könnte.

1.3 Molekularbiologie und Epidemiologie

PPAR γ als Protein ist wie andere Mitglieder der Kernrezeptorenfamilie durch drei Domänen charakterisiert: die N-terminale Domäne (funktionelle Regulation durch Phosphorylierung), die DNA-bindende Domäne (bindet den Rezeptor an spezielle DNA-Sequenzen, PPRES) und die ligandenbindende Domäne (Ehrmann et al., 2002).

Nicht besetztes PPAR wird durch Korepressoren gebunden, was zu einer Deaktivierung der Transkriptionsfunktion des Rezeptors führt. Durch Bindung des Liganden in der ligandenbindenden Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung des PPAR, wodurch die Bindung an den Korepressor gelöst und die Transkription eingeleitet wird (Houseknecht et al., 2002). Liganden, welche in vivo PPAR γ aktivieren, sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Eicosanoide, wie z.B. die Arachidonsäuremetaboliten der Prostaglandin J2-Gruppe. Wie bereits erwähnt, entwickelte man in den letzten Jahren vermehrt synthetische Liganden zur Aktivierung von PPAR γ und setzte diese auch therapeutisch ein (Houseknecht et al., 2002).

Inzwischen wurden mehrere Mutationen in der DNA-Gensequenz von PPAR γ beschrieben, welche die normale Funktion und Aktivierung des Rezeptors beeinflussen und somit zu Störungen des metabolischen Gleichgewichtes führen (Barosso et al., 1999). Eine dieser Mutationen ist die Pro12Ala-Substitution im PPAR γ 2 spezifischen Exon B, wodurch sich eine Veränderung im Bereich der nicht ligandenabhängigen Aktivierung des Rezeptors ergibt. Dies führt dann zu einer allgemein erniedrigten Rezeptoraktivität. Diese Mutation ist mit einem niedrigen BMI, einer gesteigerten Insulinsensitivität in Muskel- und Leberzellen

und einem erhöhten HDL-Cholesterin-Spiegel assoziiert (Beamer et al., 1998; Deeb et al., 1998; Meirhaeghe et al., 2000).

Eine weitere Mutation des PPAR γ 2-Genes, mit welcher sich auch die vorliegende Arbeit beschäftigt, wurde durch Ristow und Kollegen 1998 beschrieben (Ristow et al., 1998). Es handelt sich dabei um eine Mutation, die zum Austausch von Prolin gegen Glutamin an Codon 115 führt. Normalerweise kann PPAR γ 2 durch eine Mono-Amino-Phosphorylase-Kinase abhängige Reaktion an der N-terminalen Domäne des Rezeptors deaktiviert werden, indem an Codon 114 eine Phosphorylierung stattfindet. Die Pro115Glu-Mutation verhindert diese Phosphorylierung an Codon 114 und inhibiert damit die Deaktivierung von PPAR γ 2. Ristow et al. konnten in vitro nachweisen, dass Fibroblasten, welche diese Mutation aufwiesen, das 2,5-Fache an Triglyceriden anreichern, verglichen mit korrespondierenden Wildtyp-Zelllinien.

Ristow et al. konnte in einer simultan durchgeführten Feldstudie an 121 Probanden vier heterozygote Träger dieser Mutation nachweisen. Diese vier Individuen waren alle auffällig adipös (BMI zwischen 37,9 und 47,3 kg/m²). Diese Daten deuten auf eine pathophysiologische Relevanz der Pro115Glu-Mutation für die Entwicklung von Adipositas hin.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung, inwieweit die Pro115Glu-Mutation eine epidemiologische Bedeutung für Adipositas besitzt, was innerhalb eines repräsentativen deutschen Bevölkerungskollektivs (aus der sogenannten „Diabetomobil-Studie“ (Palitzsch et al., 1999)) überprüft werden soll. In Kenntnis der Veröffentlichung (Ristow et al., 1998), in der die Mutation nur im Zusammenhang mit einem deutlich erhöhten BMI von größer 35 kg/m² auftrat, beschränkte sich die vorliegende Untersuchung auf die entsprechende Subklasse der Adipositas II° (30 – 34,9 kg/m²) und Adipositas III° (≥ 35 kg/m²).

2. Material

2.1 Laborgeräte

- Zentrifuge:
Heraeus-Service, Germany, Hanau; Model: Biofuge A
- Cyclor für die PCR:
MJ Research, Inc., USA, MA, Waterham; Model: PTC 100
- Vortex-Apparat:
Janke & Kunkel, Germany, Staufen; IKA Labortechnik VF2
- Elektrophorese Power Supply:
Consort, Belgium, Turnhout; E 835 (300V – 500mA)

2.2 Standardchemikalien

- Ampicillin
- Autoklaviertes Aqua destilatum
- Bromphenolblau
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
- Essigsäure
- Ethanol
- Ethidium-Bromid (1% in aqua dest.)
- Glukose
- Glycerol
- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid
- Tris Base
- Trypton
- Xylencyanol

2.3 Puffer und Lösungen

- PCR-Puffer:
Boehringer Mannheim PCR buffer, 10 x conc. mit MgCl₂-Zusatz (15mmol/ml)
- PCR-Nukleotide:
Boehringer Mannheim PCR Nucleotide Mix, 10 mmol/ml je Nukleotid
- Endonuklease HIND II:
Boehringer Mannheim HIND II 5 U/μl
- TAQ-Polymerase:
Boehringer Mannheim Taq DNA Polymerase 5 U/μl
- Puffer für Verdau:
Boehringer Mannheim buffer M
- Laufpuffer für Gelelektrophorese:
Lösung aus:
 - 2,5 ml Glycerol
 - 10 μl 0,5 M EDTA
 - 500 μl 40 mg/l Bromphenolblau
 - 500 μl 40 mg/l Xylencyanol
- 1,49 ml Aqua destilatum
- Agarose Gel:
FMC Bio Products Nu Sieve 3:1 agarose
- DNA Extraktionskit
Qiagen QIA amp DNA Blood Mini Kit
- TAE-Puffer (50 fach):
Lösung aus:
 - 242 g Tris Base
 - 57,1 ml Essigsäure
 - 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8,1)
- H₂O ad 1000 ml

- LB-Medium:
Lösung aus:
 - Trypton 10 g/l
 - Hefeextrakt 5 g/l
 - NaCl 5 g/l
 - Glukose 1g/l
 - NaOH bis zu einem pH von 7,5

2.4 Verwendete Primer

Die Primer wurden exakt nach Vorlage des von Ristow et al. beschriebenen Verfahrens angefertigt. Durch die Verwendung und Amplifikation mit diesem Primer, konnte der gesuchte Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, der durch die Pro115Gln-Mutation entsteht, nachgewiesen werden. Der Sense-Primer generierte eine Einbasenmutation 3 bp aufwärts der gesuchten Mutation, welche dann eine neue HIND II Restriktionsstelle ergab, wenn die Mutation vorlag (Ristow et al, 1998).

- Primer 1 (Sense-Primer):
5' TGCAATCAAAGTGGAGCCTGCATGTC 3'
- Primer 2 (Antisense-Primer):
5' CAGAAGCTTTATCTCCACAGAC 3'

3. Methodik

3.1 Der Arbeit zugrunde liegendes Studienkollektiv

3.1.1 Studienpopulation

Alle Individuen dieser Studie haben an der sogenannten „Diabetomobil-Studie“ teilgenommen, bei der es sich um eine epidemiologische Felduntersuchung, welche von 1993 bis 1997 in Deutschland durchgeführt wurde, für metabolische Erkrankungen handelt. Eine detaillierte Beschreibung der Studie ist bereits an anderer Stelle publiziert (Palitzsch et al., 1999). Die Gewinnung der Daten unterteilte sich in zwei Phasen, die sogenannte „Haustüraktion“ (2150 Probanden) und die „Marktplatzaktion“ (4320 Probanden). In Abstimmung mit dem statistischen Bundesamt Wiesbaden wurden im Rahmen der „Haustüraktion“ nach dem Zufallsprinzip zunächst 5 der 16 deutschen Bundesländer ausgewählt (Bayern, Bremen, Nordrhein-Westfalen, Saarland, Sachsen), in welchen wiederum zufällig Städte und ländliche Bezirke mit Bevölkerungszahlen von <40000, 40000-100000 und >100000 Einwohnern bestimmt wurden. Eine grafische Darstellung der Bundesländer, aus denen die Probanden gewonnen wurden zeigt Abb. 1. Für jede Stadt wurde im Vorfeld die gewünschte Probandenzahl ermittelt. Die anzufahrenden Straßen wurden mittels eines Zufallsgenerators bestimmt, wobei stets das fünfte Haus auf der linken Straßenseite in die Untersuchung einbezogen wurde. Hierdurch blieb das Zufallsprinzip gewahrt.

An jeweils fünf Werktagen wurde von 8.30 Uhr bis 19.00 Uhr nach der beschriebenen Vorgehensweise versucht, durch Klingeln an der Wohnungstür Probanden zu gewinnen. Die Studienteilnahme war freiwillig.

Dieses Studiendesign garantierte eine repräsentative Abbildung der bundesdeutschen Bevölkerung, was in vorangegangenen Arbeiten bereits belegt wurde (Palitzsch et al., 1999).

Die „Marktplatzaktion“ erfolgte zeitgleich in denselben Städten, die im Rahmen der „Haustüraktion“ ausgewählt waren. Dabei war das „Diabetomobil“ auf öffentlichen Plätzen und in Fußgängerzonen platziert und für alle Interessenten geöffnet. Es erfolgte hierbei keine Selektion der Probanden nach Zufallsprinzipien. Jeder Passant konnte auf eigenen Wunsch an der Studie

teilnehmen. Er musste hierzu denselben Fragebogen ausfüllen, wie bei der „Haustüraktion“ und durchlief dieselben Untersuchungen. Durch diese Organisationsform wurde in kurzer Zeit eine große Zahl an Probanden erreicht, die jedoch keinen repräsentativen Durchschnitt der deutschen Bevölkerung darstellen.

Teilnahmeberechtigt waren Personen mit deutscher Staatsbürgerschaft im Alter von 18 bis 70 Jahren. Personen unter 18 und über 70 Jahren wurden aus statistischen Gründen ausgeschlossen. Aus medizinischen Gründen wurden Schwangere zu der Untersuchung nicht zugelassen. Das Studienprotokoll gab allen Studienteilnehmern vor, mindestens eine Stunde vor der Blutentnahme nüchtern zu sein.

Insgesamt nahmen 6470 Personen an der Studie teil. Einige Serumproben waren zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie nicht (mehr) verfügbar, so dass von 5766 Proben ausgegangen werden konnte.



Abb. 1: Grafische Darstellung der Herkunft der Probanden, welche an der Diabetomobilstudie teilgenommen haben.

3.1.2 Untersuchungen

Neben einer Blutentnahme mit entsprechender Möglichkeit der laborchemischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Auswertung wurden folgende Parameter dokumentiert: Körpergröße und -gewicht sowie der Ruheblutdruck nach 30 Minuten Sitzen. Der Blutdruck wurde mit passender Manschette nach der Methode von Riva-Rocci festgestellt. Die Messung von Gewicht und Größe erfolgten nach adäquater Korrektur für Schuhe und Kleidung. Der Body Mass Index (BMI) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{BMI} = \text{Gewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]})^2.$$

Zudem wurden anhand eines Fragebogens Angaben zur medizinischen Anamnese, der aktuellen Gesundheitssituation sowie zur sozialen Umgebung von allen Probanden erhoben.

3.1.3 Einschlusskriterien für die vorliegende Arbeit

Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Pro115Gln Mutation von den Erstbeschreibern Ristow et al. nur bei Personen gefunden wurde, welche einen BMI $>37 \text{ kg/m}^2$ besaßen, beschränkten wir die Analyse der DNA auf die Blutproben von Personen, welche einen BMI von mehr als 35 kg/m^2 aufwiesen. Insgesamt erfüllten 85 der 5766 Probanden die obengenannte Voraussetzung. Somit ergibt sich für die folgenden Untersuchungen eine Gesamtzahl von $n=85$.

3.2 Probenaufbereitung

3.2.1 Gewinnung der Blutproben

Bei der „Diabetomobil-Studie“ wurden den Probanden mit dem Monovetten®-System (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) Blutproben (unter anderem Serumröhrchen und EDTA-Röhrchen) entnommen und unmittelbar eingefroren.

3.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA wurde den Leukozyten einer Vollblutprobe extrahiert. Zunächst wurde durch detergenzvermittelte Lyse die Zellwand zerstört, um die Zellorganellen und somit den Zellkern freizusetzen. Anschließend wurden durch Zugabe verschiedener Puffer und nach mehreren Zentrifugationen durch spezielle Filtersäulen die Zellkerne isoliert. Diese wurden dann im nächsten Schritt hydrolytisch eröffnet und die DNA in destilliertem Wasser gelöst. In einem letzten Schritt wurde die gelöste DNA durch eine finale Filterung vollständig extrahiert. Zur Durchführung dieses skizzierten Extraktionsprinzips wurden folgende Schritte durchlaufen:

- Erwärmen der tiefgefrorenen Blutproben und der Puffer AE (Elutionspuffer) auf Raumtemperatur
- Vermengen von 20 µl QUIAGEN Protease und 200 µl der Blutprobe in einem Mikrozentrifugen-Röhrchen
- Zugabe von 200 µl Puffer AL (Lysepuffer), vermischen und für 10 Minuten bei 56 °C inkubieren
- Zugabe von 200 µl Ethanol
- QIAamp-Filtersäule auf Auffanggefäß (2 ml) setzen und die Mixtur in die Filtersäule füllen, Deckel schließen
- Zentrifugieren mit 4200 U/min für eine Minute
- Spin-Säule auf neues Auffanggefäß (2 ml) setzen und altes Behältnis mit Flüssigkeit verwerfen
- Zugabe von 500 µl AW1-Puffer (enthält ein chaotropes Salz, so dass Proteine denaturiert und aus der Säule gespült werden) in Filtersäule
- Zentrifugieren bei 8000 U/min für eine Minute
- Umsetzen der Filtersäule auf neues Auffanggefäß (2 ml) und altes Behältnis mit Flüssigkeit verwerfen
- Zugabe von 500 µl AW2-Puffer (auf Ethanolbasis, dient dazu, verbliebene Salze auszuwaschen) in die Filtersäule
- Zentrifugieren bei 14000 U/min für drei Minuten
- Aufsetzen der Säule auf ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen und das Filtrat verwerfen
- Zugabe von 200 µl AE-Puffer oder destilliertem Wasser und Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens eine Minute

- Zentrifugieren bei 8000 U/min für eine Minute

Nach Abschluss dieses Verfahrens liegt die gereinigte Blutproben-DNA, gelöst in 200 µl H₂O, vor.

3.2 Klonierung von DNA

3.1.1 Prinzip der DNA-Klonierung

Eine Positivprobe für die heterozygote Form der Pro115Glu-Mutation wurde uns in einem Plasmid integriert freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ristow (Universität Jena) zur Verfügung gestellt.

Für die notwendige Klonierung wurden Bakterien (E.coli) mit dem Plasmid vermengt und einem Hitzeschock ausgesetzt. Hierdurch wird das Plasmid in die Zelle aufgenommen, das Bakterium selbst aber nicht zerstört. In der darauffolgenden Anzucht der Zellen wurde die transformierte DNA mit jeder Teilung kopiert. Aus einer Kultur dieser transformierten Bakterien konnte die DNA in ausreichender Menge extrahiert werden.

3.2.2 Durchführung der Klonierung

a) Herstellung von Agarplatten aus LB-Medium (siehe Kapitel 2.3):

- Mischen von 1,7 g Agarose mit je 100 ml LB-Medium auf Kochplatte und Autoklavierung des Gefäßes mit Inhalt
- 30 Minuten abkühlen lassen, anschließend Zugabe von 1 µl Ampicillin
- Abfüllen in Petrischalen (Schichtdicke zw. 75 und 100 mm) und Lagerung bei 4 °C.

b) Transformation der Zellen:

- Vorbereitete Petrischalen mit LB/Ampicillin-AGAR bei 37 °C inkubieren
- Auftauen von 50 µl E.coli (z.B. HBIOI) auf Eis und Zugabe von 5 µl der DNA anschließend 40 Minuten auf Eis verweilen lassen

- Hitzeschock durch Erwärmen auf 42 °C für 90 Sekunden, danach wieder auf Eis für fünf Minuten lagern
- Zugabe von 400 µl LB Medium und unter ständigem Schwenken eine Stunde bei 37 °C inkubieren
- Ausbringen von je 50 µl des Inhaltes mittels Dreiösenausstriches auf Agarplatten und Inkubation bei 37 °C für mehrere Tage
- Extraktion der DNA aus den E.coli-Kulturen

3.3 Amplifikation der DNA mittels PCR-Technik

3.3.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden definierte Abschnitte einer DNA in vitro vervielfältigt. Ziel ist es, genügend Material für den Nachweis der zu untersuchenden Mutation oder Sequenz zu erhalten.

Benötigt werden ein definiertes Paar an Primern, welches die gewünschte Zielsequenz jeweils auf der 3'-Seite des Matrixstranges flankiert, eine hitzeresistente Polymerase sowie die vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate in ausreichender Menge.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Einzelschritten (siehe auch Abb.1):

1. Denaturierung (Schmelzen): Strangtrennung der Ausgangs-DNA durch kurzes Erhitzen (1 min.) auf 94 °C.
2. Annealing (Anlagerung): Hybridisierung der Primer bei der sogenannten Annealing-Temperatur, welche je nach Primer 50 bis 70 °C beträgt.
3. Elongation (Verlängerung): Verlängerung der Primer bei 72 °C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'OH-Ende und damit in Richtung der Zielsequenz.

Als Polymerase wird ein Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die sogenannte TAQ-Polymerase. Der Vorteil dieses Enzyms liegt in seiner Hitzestabilität. Es toleriert den Denaturierungsschritt ohne

Funktionseinbußen und muss deshalb nicht nach jedem Zyklus neu hinzugefügt werden. Das Enzym entfaltet seine optimale Aktivität bei 72 °C.

Eine erneute Anlagerung von zwei komplementären Strängen der Ausgangs-DNA während der Hybridisierung wird durch die hohe Konzentration an Primern verhindert. Die gewünschte DNA-Sequenz wird durch die PCR exponentiell vermehrt. Im Idealfall entsteht nach n Runden die 2^n -fache DNA-Menge. In der Praxis vermehrt sich die DNA-Menge nach 20-30 Zyklen auf ungefähr das 10^6 - bis 10^7 -Fache.

Die Vorteile der PCR:

1. Aufgrund der hohen Sensitivität kann theoretisch ein einziges DNA-Molekül amplifiziert werden.
2. Die Zielsequenz selbst muss nicht bekannt sein. Voraussetzung ist lediglich die Kenntnis der flankierenden Sequenzen.
3. Die Zielsequenz kann sehr lang sein.
4. Durch die exakte Bindung der Primer an den komplementären DNA-Abschnitt ist eine hohe Spezifität gewährleistet.

Die Spezifität der Primer kann durch ihre Konstruktion wesentlich beeinflusst werden. Je kürzer ein Oligonukleotid ist, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass es auch an anderen Stellen des DNA-Stranges hybridisiert und dadurch zu unspezifischen Reaktionsprodukten kommt. Andererseits können zu lange Primer durch sterische Behinderung die Hybridisierung erschweren. Der in dieser Arbeit verwendete Primer umfasste 26 bp und war somit in einer nahezu optimalen Länge. Die Bindung des Sense-Primers und die daraus resultierende Veränderung 3 bp über der Mutation schaffte eine neue Restriktionsstelle für die Restriktionsendonuklease HIND II. Neben der Oligonukleotidsequenz beeinflusst auch die Annealing-Temperatur die Spezifität. Zu niedrige Temperaturen begünstigen die Bindung der Primer an nicht völlig komplementäre Abschnitte, was wiederum unspezifische Produkte hervorruft. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, gelingt keine Hybridisierung mehr, weshalb keine DNA amplifiziert werden kann. Deshalb erhielten wir in unserer Untersuchung die besten Ergebnisse bei 60,5 °C.

3.3.2 Anwendung der PCR für den PPAR γ -Mutationsnachweis

Sämtliche Reagenzien für die PCR wurden auf Eis pipettiert, um die Haltbarkeit der Substanzen zu erhöhen und unspezifische Reaktionen zu minimieren. Die Zusammensetzung unseres Standard-PCR-Ansatzes war wie in Tabelle 2 dargestellt (Ristow et al., 1998):

Reagenzien (siehe 2.3)	Menge pro Reaktionsgefäß
H ₂ O	Ad 50 μ l
Nukleotide (je 10mM)	0,5 μ l
TAQ-Puffer + Mg ²⁺ (15mM)	5 μ l
Primer 1 (5 μ M)	5 μ l
Primer 2 (5 μ M)	5 μ l
TAQ-Polymerase 5 U/ μ l	0,5 μ l
Proben-DNA	5 μ l
Gesamt	50 μl

Tab. 2: Standard PCR-Ansatz gemäß Ristow et al.

Zunächst wurde ein sogenannter Master-Mix, bestehend aus allen Reagenzien in größeren Mengen mit Ausnahme der TAQ-Polymerase und der DNA-Probe, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt. Durch diese Vorbereitung musste nicht in jedes Probengefäß jeder Stoff einzeln pipetiert werden. Danach wurde von diesem Master-Mix je 44,5 μ l in ein PCR-Probengefäß gegeben und zu diesem die Polymerase und die Proben-DNA pipetiert. Dann wurde erneut durchmischt und der gesamte Gefäßinhalt zentrifugiert.

Sämtliche Inkubationen wurden im Anschluss im Thermocycler durchgeführt. Die erste Strangtrennung erfolgte bei einer Temperatur von 94,0 °C über einen Zeitraum von 4 Minuten.

Daraufhin wurde folgender Zyklus 35-mal hintereinander ausgeführt:

- Denaturierung bei 94 °C für eine Minute
- Annealing bei 60,5 °C für 2 Minuten
- Elongation bei 72 °C für 1 Minute 30 Sekunden

Als nächster Schritt wurde eine Temperatur von 72 °C für weitere 10 Minuten beibehalten (höhere Ausbeute durch eine terminale Elongation) und um die Reaktion zu stoppen, danach auf 4 °C abgekühlt.

3.4 Verdau und Darstellung der PCR-Produkte

3.4.1 Verdau durch Endonuklease HIND II

Um die für diese Arbeit entscheidende Mutation zu identifizieren wurde ein Verdau mit der Endonuklease HIND II ausgeführt. Da die Mutation keine natürliche Schnittstelle aufweist, wurde durch Änderung eines Nukleotids 3 bp strangaufwärts der Mutation, ein spezieller Primer konstruiert. Durch diesen Tausch im Primer entsteht beim Vorhandensein der gesuchten Mutation eine Restriktionsstelle für HIND II. So findet in diesem Falle bei Stelle 115 (welche die Phosphorylierung an Codon 114 hemmt) ein Verdau durch die Endonuklease statt. Das führt dazu, dass das PCR-Produkt in ein 104 bp und ein 25 bp langes Bruchstück gespalten wird. Bei nicht vorliegender Mutation bleibt das 129 bp lange PCR-Produkt unverändert.

Zur Durchführung des Verdaus wurde der in Tabelle 3 dargestellte Ansatz in PCR-Cups pipetiert:

Reagenzien (siehe 2.3)	Menge pro Cup
Amplifikat aus PCR	25 µl
Puffer M	2,5 µl
HIND II 5 U/µl	2 µl
MgCl ₂ (42mM)	5 µl
H ₂ O	Ad 50 µl
Gesamt	50 µl

Tab. 3: Zusammensetzung der PCR-Lösung

Anschließend wurde dieser Ansatz vermischt, zentrifugiert und im Thermocycler bei einer Temperatur von 37 °C für zwei Stunden inkubiert.

3.4.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Nach dem Verdau wurde eine Elektrophorese in einem Agarose-Gel durchgeführt. Die im elektrischen Feld zurückgelegte Strecke wird durch die Größe des DNA-Fragmentes bestimmt. Die kürzeren Stücke legen in einer

definierten Zeit eine weitere Strecke zurück als die längeren, da sie die Poren des Gels leichter passieren können.

Bei dieser Untersuchung wurde ein 2,5%iges Agarose-Gel verwendet.

Herstellung:

- Mischen der Trockensubstanz mit TAE-Puffer 1:50 im entsprechenden Massenverhältnis und Aufkochen.
- Die heiße Lösung mit 2,5 µl Ethidium-Bromid Lösung (1% in aqua dest.) vermischen.
- Heiße Lösung in eine Gelkammer mit „Kamm“ für 20 Proben gießen und erkalten lassen.
- In die einzelnen Kammern jeweils ein Gemisch aus 30 µl der verdauten DNA und 20 µl Loading-Dye geben.
- In jedem Gel jeweils noch eine 123 bp und eine 100 bp DNA-Leiter, eine Positivprobe und eine Negativprobe auftragen.

3.4.3 Darstellung und Auswertung der Bandenmuster

Durch die Beigabe von Ethidium-Bromid (Farbstoff mit UV-Fluoreszenz in Verbindung mit DNA) konnten die verschieden großen DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Nach einer Stunde in einem elektrischen Feld mit 100 V wurde das Gel zur Auswertung unter UV-Licht gelegt und das Ergebnis mit einer monochromen Kamera dokumentiert. Es zeigten sich die in Abbildung 2 dargestellten typischen Banden. Nur wenn die Pro15Gln-Mutation vorliegt, kann die 129 bp Sequenz durch HIND II in ein 104 bp und ein 25 bp großes Fragment gespalten werden. Somit zeigt nur die Mutation die Bande bei 104 bp, ebenso wie die Positivprobe (Sequenz 2, Abb.2). Der Wildtyp (Sequenz 3, Abb.2), welcher keine zusätzliche Schnittstelle für HIND II aufweist, zeigt nur eine Bande bei 129 bp. War bei einer Probe keine Bande, sondern vielmehr ein „Smeer“ dargestellt, wurde diese Probe erneut bearbeitet bzw. die DNA neu extrahiert.

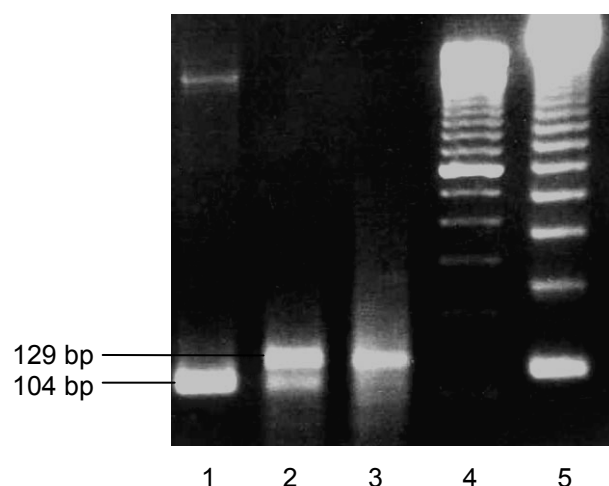


Abb. 2: PCR, welche die Pro115Gln-Mutation von PPAR γ 2 in einer mutierten cDNA und einer heterozygoten genomischen DNA demonstriert.

- Sequenz 1: cDNA mit homozygoter Pro115Gln-Mutation vollständig durch Hind II gespalten
- Sequenz 2: Heterozygote genomische DNA mit einer Bande bei 129 bp (nicht verdaute Wildtyp DNA) und einer Bande bei 104 bp (verdaute mutierte DNA)
- Sequenz 3: Homozygote Wildtyp-DNA unverdaut
- Sequenz 4 + 5: DNA-Gewichts-Leitern

3.5 Statistische Methoden

Alle Daten wurden anonym erhoben und gespeichert.

Die statistischen Berechnungen der vorliegenden Arbeit wurden mittels SPSS 6.0 für Windows® (SPSS Inc.®, Chicago, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Auswahl der Subpopulation

Wie bereits im Vorfeld beschrieben, wurden ausschließlich Teilnehmer aus der „Diabetomobil-Studie“ ausgewählt, welche einen BMI $>35 \text{ kg/m}^2$ aufwiesen. Diese Vorauswahl erfolgte, weil die vier Fälle mit nachgewiesener Pro 115Gln Mutation in der Studie von Ristow et al. (Ristow et al., 1998), einen BMI zwischen 37,9 und $47,3 \text{ kg/m}^2$ aufwiesen. In den anderen Gruppen konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden.

Die Studiengruppe mit BMI $>35 \text{ kg/m}^2$ beinhaltete insgesamt 101 Probanden, wobei nur aus 85 Proben die DNA extrahiert und die PCR durchgeführt werden konnte. Somit ergab sich folgende Konstellation:

n gesamt	85 (100 %)
n Frauen	52 (61 %)
n Männer	33 (39 %)

Im Detail setzte sich das Studienkollektiv wie in Tabelle 4 dargestellt zusammen.

Alter in Jahren	Mittel	50	HbA1c in % Norm≤6	Mittel	6,10
	Standardabweichung	±12		Standardabweichung	±1,59
	Minimum	23		Minimum	2,10
	Maximum	70		Maximum	12,30
BMI in kg/m ² Norm≤25	Mittel	38	C-Peptid ^{a,b} in ng/ml Norm<4	Mittel	2,83
	Standardabweichung	±3		Standardabweichung	±1,63
	Minimum	36		Minimum	0,30
	Maximum	49		Maximum	11,20
RR diast. in mmHg Norm<90	Mittel	94	Insulin ^{a,b} In mU/l Norm 4-24	Mittel	34,01
	Standardabweichung	±12		Standardabweichung	±30,03
	Minimum	70		Minimum	7,10
	Maximum	130		Maximum	230,10
RR syst. in mmHg Norm<140	Mittel	149	Gesamt- cholesterin in mg/dl Norm<200	Mittel	221
	Standardabweichung	±22		Standardabweichung	±36
	Minimum	110		Minimum	146
	Maximum	230		Maximum	301
Glukose ^a in mg/dl	Mittel	123	HDL-^c cholesterin in mg/dl	Mittel	56
	Standardabweichung	±56		Standardabweichung	±18
	Minimum	61		Minimum	29
	Maximum	363		Maximum	124

Tab. 4: Darstellung der Charakteristika der Studienpopulation:

BMI: Body-mass-Index; RR: Blutdruckmessung nach Riva-Rocchi

^a: Alle Studienteilnehmer waren vor der Blutentnahme mind. 1 h nüchtern^b: Diese Daten waren für 80 Individuen erhältlich^c: Norm für Männer >35 mg/dl; Norm für Frauen >40 mg/dl

4.2 Vergleich der Subpopulation zum Gesamtkollektiv

Die Subpopulation mit einem BMI >35 kg/m², die für diese Arbeit selektiert wurde, zeigte neben der Adipositas noch weitere typische Merkmale des metabolischen Syndroms häufiger als das Gesamtkollektiv. So ergaben sich bei den Probanden überdurchschnittlich häufig erhöhte systolische bzw. diastolische Blutdruckwerte, Cholesterinerhöhungen und Anzeichen für

Diabetes mellitus Typ 2. Als Hinweise für Diabetes mellitus wurden erhöhte Nüchtern-Blutglukosewerte und Erhöhungen von HbA1c gewertet.

Die geschlechtsspezifischen Eigenschaften des Gesamtkollektiv zeigt Tabelle 5:

Geschlecht	Frauen	Männer
Parameter		
BMI in kg/m ² , N	3201	3272
Median	24.2	25.5
25./75. Perzentile	21.7/27.2	23.6/27.8
RR-systolisch in mmHg, N	3200	3269
Median	130	140
25./75. Perzentile	120/150	130/150
RR diastolisch in mmHg, N	3200	3270
Median	85	90
25./75. Perzentile	80/90	80/95
Gesamtholesterin in mg/dl, N	3198	3271
Median	213.0	209.0
25./75. Perzentile	183.0/2	180.0/240.0
HDL-Cholesterin in mg/dl, N	3191	3265
Median	64.0	50.0
25./75. Perzentile	53.0/76.0	42.0/60.0
Glukose in mg/dl, N	3203	3271
Median	90	91
25./75. Perzentile	79/106	79/108
Insulin in mU/l, N	2472	2585
Median	15.20	16.80
25./75. Perzentile	10.70/22.60	11.35/25.50
HbA1c in %, N	3188	3248
Median	5.1	5.1
25./75. Perzentile	4.8/5.4	4.9/5.5
Harnsäure in mg/dl, N	2317	2493
Median	5.3	7.3
25./75. Perzentile	4.4/6.3	6.2/8.6

Tab. 5: geschlechtsspezifische Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Gesamtkollektivs der Diabetomobilstudie. Angabe der Perzentilen, da für Verfälschungen durch Extremwerte weniger Anfällig als bei Darstellung der Standardabweichung mit Minimum und Maximum.

Ergebnis einer erfolgreichen Klonierung mit guter Auftrennung der Banden und ohne Nachweis der Mutation zeigt Abbildung 4.

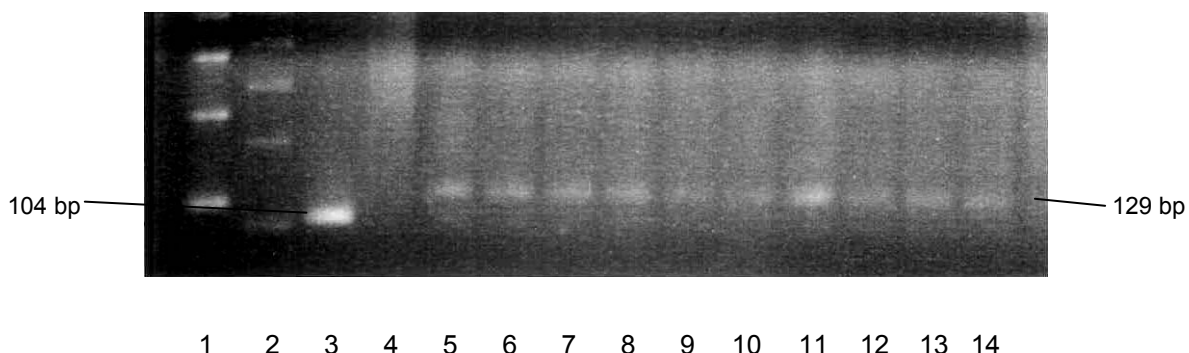


Abb. 4: Suche nach der Pro115Gln Mutation im PPAR γ 2-Gen in der Studienpopulation. Der erfolgreiche HIND II-Verdau wurde bei jedem Versuch durch simultane Verarbeitung einer cDNA mit der Pro115Gln-Mutation gezeigt.

Spalten 1 + 2:	DNA-Gewichts-Leitern
Spalte 3:	cDNA mit Pro115Gln Mutation und deshalb HIND II sensitive Reaktionsstelle als Positivkontrolle
Spalte 4:	Negativkontrolle
Spalten 5-14:	Genproben von 10 Studienteilnehmern, welche als homozygote Wildtyp-Träger erkannt wurden.

Bei den Mutationsanalysen aus dem „Diabetomobil-Kollektiv“ wurden die Blutproben der Probanden ausgewählt, welche die Einschlusskriterien erfüllten (in Kapitel 4.1 erläutert). Es standen insgesamt 101 Proben zur Verfügung, wobei 16 dieser Proben aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht amplifiziert werden konnten. Diese Probleme hatten ihre Ursache in Proben-Verunreinigungen, nicht durchführbarer DNA-Extraktion (trotz mehrerer Versuche) bzw. nicht mehr ausreichendem Probenmaterial. Ausgewertet wurden letztlich n=85 Serumproben. Die genaueren Charakteristika der Studienpopulation wurden ebenfalls bereits in Kapitel 4.1 aufgeführt.

Die beschriebene Mutation an Stelle 115 konnte in keiner der von uns untersuchten Proben nachgewiesen werden. Es stellte sich ausschließlich der Wildtyp in Form einer einzelnen Bande bei 129 bp dar. Keiner der untersuchten Probanden war demnach homo- oder heterozygot für die Pro115Gln Mutation.

Statistisch betrachtet lag somit die Wahrscheinlichkeit für die Allelhäufigkeit der Pro115Gln Mutation in unserer Studie in einem Bereich von 0-2,1 % (einseitiges Konfidenzintervall: 97,5 %).

5. Diskussion

5.1. Gegenwärtige Relevanz von Adipositas

Übergewicht ist ein Risikofaktor für Hypertonie, koronare Herzerkrankung und Diabetes mellitus Typ 2 (Pi-Sunyer, 2002). Unter Adipositas versteht man eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts. Als Berechnungsgrundlage für die Gewichtsklassifikation dient der Körpermasseindex [Body Mass Index (BMI)]. Von Adipositas spricht man bei einem BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$. Die genaue Einstufung des Gewichtes nach BMI wird in Tabelle 6 dargestellt.

Kategorie	BMI	Risiko für Begleiterkrankungen des Übergewichts
Untergewicht	< 18,5	niedrig
Normalgewicht	18,5 – 24,9	Durchschnittlich
Übergewicht	≥ 25	
Präadipositas	25 - 29,9	gering erhöht
Adipositas Grad I	30 - 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35 - 39,9	hoch
Adipositas Grad III	≥ 40	sehr hoch

Tab.6: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI (nach WHO, 2000 EK IV)

Insbesondere in den Industrienationen hat sich in den letzten hundert Jahren die Adipositas durch Fehlernährung, Bewegungsmangel, Essstörungen, endokrine Erkrankungen aber auch aufgrund genetischer Faktoren zu einem ernstzunehmenden Problem entwickelt und stellt mittlerweile bereits im Kindes- und Jugendalter ein großes Problem dar. Die WHO führt Übergewicht in der Liste der zehn bedeutendsten Erkrankungen der westlichen Länder auf.

Inzwischen neigt die WHO dazu, Adipositas als eine der gefährlichsten Krankheiten der Welt anzusehen. Dies zeigt sich auch bei Betrachtung der jüngst erhobenen Daten aus Deutschland. Derzeit sind etwa 50 % der erwachsenen Männer mit einem BMI ≥ 25 übergewichtig und ca. 18 % mit einem BMI ≥ 30 adipös. Bei den erwachsenen Frauen sind etwa 35 % übergewichtig und knapp

20 % adipös (Mensink et al., 2005). Dies bedeutet eine Verdoppelung der Häufigkeit an krankhaften Übergewicht innerhalb der letzten 20 Jahren (Evans et al., 2004). Problematisch sind zudem die bei Übergewicht auftretenden Komorbiditäten und Komplikation (Hauner et al., 2007):

- Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels (z.B. Insulinresistenz, gestörte Glukosetoleranz, Diabetes mellitus Typ 2)
- Dyslipoproteinämie (niedriges HDL-Cholesterin, Hypertriglyceridämie, vermehrte kleine dichte LDL-Partikel)
- Hyperurikämie/Gicht
- Störungen der Hämostase (Steigerung der Gerinnung und Hemmung der Fibrinolyse)
- Chronische Inflammation (z.B. erhöhtes CRP)
- Arterielle Hypertonie, linksventrikuläre Hypertrophie
- Kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Koronare Herzkrankheit, Apoplex, Herzinsuffizienz)
- Karzinome (Frauen: z.B. Endometrium, Zervix, Ovarien, Mamma; Männer: z.B. Prostata, Kolon, Gallenblase, Pankreas)
- Hormonelle Störungen (z.B. Hyperandrogenämie bei Frauen, Polycystisches Ovar-Syndrom, erniedrigter Testosteron-Spiegel bei Männern, Einschränkung der Fertilität)
- Pulmonale Komplikationen (z.B. Dyspnoe, restriktive Ventilationsstörungen, Hypoventilations- und Schlafapnoe-Syndrom)
- Gastrointestinale Erkrankungen (z.B. Cholecystolithiasis, akute u. chron. Cholecystitis, Steatosis hepatis, Refluxkrankheit)
- Degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates (z.B. Coxarthrose, Gonarthrose, Wirbelsäulensyndrome)
- Erhöhtes OP- und Narkoserisiko
- Allgemeinbeschwerden (z.B. verstärktes Schwitzen, Gelenkbeschwerden, Belastungsdyspnoe)
- Einschränkung der Aktivitäten des täglichen Lebens (ADL)
- Verminderte Lebensqualität
- Erhöhtes Unfallrisiko
- Erhöhtes Komplikationsrisiko während der Gravidität (z.B. Eklampsie, Gestationsdiabetes) und vor und nach der Entbindung

- Psychosoziale Konsequenzen mit erhöhter Depressivität und Ängstlichkeit, soziale Diskriminierung, Selbstwertminderung, soziale Isolation

Zusätzlich wird die Situation durch die beständige Zunahme des sogenannten metabolischen Syndroms verschlimmert. Die Diagnose des Metabolischen Syndroms wird nach einem Vorschlag der AHA/NHLBI (Grundy et al., 2005) anhand der in Tabelle 7 aufgeführten Kriterien gestellt. Treffen 3 dieser 5 Kriterien zu, liegt ein metabolisches Syndrom vor.

Erhöhter Taillenumfang	Männer ≥ 102 cm Frauen ≥ 88 cm
Erhöhte Triglyzeride (nüchtern)	≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/L) oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung erhöhter Triglyzeride
Niedriges HDL-Cholesterin (nüchtern)	Männer < 40 mg/dl (1,0 mmol/L) Frauen < 50 mg/dl (1,3 mmol/L) oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung von niedrigen HDL-Cholesterin
Bluthochdruck	≥ 130 mm Hg systolischer Blutdruck oder ≥ 85 mm Hg diastolischer Blutdruck oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung bestehenden Bluthochdrucks
Erhöhte Nüchternblutglukose	≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/L) oder Medikamenteneinnahme zur Behandlung erhöhter Nüchternblutglukose

Tab.7: Kriterien für die Diagnose des Metabolischen Syndroms nach AHA/NHLBI (Grundy et al., 2005)

Daneben gibt es noch weitere Definitionen für das metabolische Syndrom (Ford, 2005). Inwieweit es sich um ein eigenständiges Syndrom handelt ist aber

umstritten. In einer gemeinsamen Erklärung von der European Association for the Study of Diabetes (EASD) und der American Diabetes Association (ADA) wird lediglich von einem Cluster kardiovaskulärer Risikofaktoren gesprochen und vom Gebrauch eines Krankheitsbegriffes „Metabolisches Syndrom“ abgeraten (Hauner et al., 2007).

Eine Ernährung mit zu viel Fleisch und Fett führt zur vermehrten Einlagerung von Fetten und Cholesterin im Körper. Die Deponierung überflüssiger Triglyzeride bewirkt eine Gewichtszunahme, vermehrte Insulinresistenz der Körperzellen, Schädigung des Arterienendothels und damit die oben beschriebenen Symptome. Die Potenzierung der einzelnen Risikofaktoren begünstigt bzw. verursacht Myokardinfarkt, Apoplex sowie weitere ernsthafte Folgeerkrankungen. Deshalb ist die Ursachenforschung für die Entstehung von Übergewicht, insbesondere von Adipositas, ein wichtiges Ziel vieler Studiengruppen.

5.2 Genetische Prädispositionen für Adipositas

Verschiedene Familienstudien ergaben den Hinweis, dass ca. 80 % der BMI-Erhöhungen genetisch bedingt sind (Maes et al., 1997; Sorensen, 1995; Perusse et al., 1998; Bouchard, 1996). Die genetisch bedingte Adipositasdisposition wirkt auf unterschiedliche Stoffwechselprozesse. Ein bekannter Risikofaktor für Adipositas und koronare Herzerkrankung ist ein erhöhter Leptinspiegel (Walace et al., 2001; Soderberg et al., 1999). Bei Leptin handelt es sich um ein Cytokin, das die Adipozytendifferenzierung fördert und dessen Konzentration direkt mit der Fettmasse korreliert. Leptin wirkt bei der Weitermeldung des Energiestatus an das Gehirn mit. Ein Fehlen von Leptin führt somit zu einem fehlenden Sättigungsgefühl und ständigem Hunger. (Flier et Maratos-Flier, 1998). An derselben Stelle des Stoffwechsels greift auch PPAR γ 2 als ein Schlüsselregulator für die Adipozytendifferenzierung sowie die Energiespeicherung ein (Latruffe et Vamecq, 1997; Spiegelmann et Flier, 1996; Tontonoz et al., 1994). Allerdings ist die epidemiologische Relevanz einer genetisch bedingten Hypoleptinämie bzw. einer durch Rezeptordefekt bedingten Leptinsenkung eher marginal (Flier, 2007).

5.3 Relevanz von PPAR als Prädisposition

PPAR γ 2 (Peroxisomen-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor γ) gehört zur Gruppe der hormonellen Kernrezeptoren und wirkt bei Aktivierung als Transskriptionsfaktor, welcher die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten direkt fördert. Bei Versuchen in vitro konnte außerdem gezeigt werden, dass eine übermäßige PPAR γ 2 Expression Fibroblasten in Adipozyten umwandelt.

Ristow und Kollegen beschrieben 1998 erstmals eine Pro115Gln-Mutation im PPAR γ 2-Gen, die zu einem konstitutiv erhöhten Aktivierungsniveau von PPAR γ 2 führt. Bedingt durch diese Mutation kann eine Serin-Gruppe an Position 114 des menschlichen PPAR γ 2-Genes nicht mehr dephosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung führt zu einer geringeren Promotorfunktion in der Adipozytendifferenzierung. Bei homozygotem Vorliegen der Pro115Gln-Mutation zeigte sich in vitro eine gesteigerte Triglyceridakkumulation in Adipozyten und in vivo ein nicht mit Insulinresistenz assoziiertes Übergewicht (Ristow et al., 1998). Zusätzlich konnten die Autoren in der Studien-Population einer kleinen Region Deutschlands vier Träger der heterozygoten Form der Pro115Gln-Mutation nachweisen. Alle Individuen mit dieser Mutation waren auffällig übergewichtig mit einem BMI zwischen 37,9 und 47,3 kg/m². Dieser Sachverhalt ließ vermuten, dass die Mutation nicht nur funktionelle, sondern auch epidemiologische Relevanz hat. Da die Mutation nur bei vier Probanden mit sehr hohem BMI (37.9-47.3 kg/m²) gefunden wurde, bezog sich dieser Verdacht vor allem auf die ausgeprägte Adipositas. Deshalb wurde bei der vorliegenden Arbeit auf Personen fokussiert, welche einen BMI >35 kg/m² nachgewiesen haben, da hier die Wahrscheinlichkeit am höchsten war, Mutationsträger zu finden. Die Blutproben dieser Arbeit stammen alle von Teilnehmern der „Diabetomobil-Studie“. Diese Studie wurde im Zeitraum von 1993 bis 1996 mit einer mobilen Messstation in ganz Deutschland durchgeführt, um die Prävalenz von Diabetes mellitus und assoziierten Stoffwechselerkrankungen an einer randomisierten Studienpopulation zu erforschen (Palitzsch et al., 1999). Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurde durch die gewählte Gewinnung der teilnehmenden Personen dafür gesorgt, dass es sich um eine repräsentative Stichprobe von deutschen Staatsbürgern handelt.

Bei der Untersuchung der DNA-Proben aller Personen mit BMI >35 kg/m² des Diabetomobil-Kollektivs konnten weder heterozygote noch homozygote Pro115Gln-Mutationsträger identifiziert werden. Das 97,5 % einseitige

Konfidenzintervall der Allel-Häufigkeit der Pro115Gln-Mutation lag in unserer Studie zwischen 0,0 % und 2,1 %.

In zwei weiteren Studien durch Evans et al. und Hamann et al. wurden Studienpopulationen aus zwei definierten Regionen Deutschlands untersucht. Auch hier konnte kein Träger der Pro115Gln-Mutation identifiziert werden (Evans et al., 2000, Hamann et al., 1999). Fasst man die Daten dieser beiden Studien und unserer landesweiten Studie zusammen, wurden insgesamt 581 krankhaft übergewichtige Personen aus ganz Deutschland auf die Pro115Gln-Mutation untersucht. In allen drei Studien zeigten sich nur homozygote Wildtyp-Träger. Unter Berücksichtigung aller vorliegenden Daten liegt das 97,5 % einseitige Konfidenzintervall für die Allelfrequenz der Pro115Gln Mutation vermutlich in Deutschland zwischen 0,0 % und 0,26 %.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die Pro115Gln Mutation bei krankhaft adipösen Personen vorliegt ist so gering, dass sie als bedeutende Ursache epidemiologisch zu vernachlässigen ist. Diese Schlussfolgerung wird dadurch gestützt, dass in einer französischen adipösen Personengruppe mit einem BMI von $>30 \text{ kg/m}^2$ ebenfalls kein Träger des Pro115Gln-Polymorphismus gefunden werden konnte (Clement et al., 2000). Auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass noch eine weitere adipöse Person mit einem BMI von $>35 \text{ kg/m}^2$ mit der Pro115Gln Mutation in Deutschland identifiziert werden konnte (M. Blüher und R. Paschke 2000; persönliche Kommunikation), kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die Mutation keine epidemiologische Relevanz für die Entstehung von krankhafter Adipositas zu besitzen scheint.

Die vier heterozygoten Mutationsträger, welche Ristow et al. identifizieren konnte, stammten alle aus definierten Regionen Nordrhein-Westfalens (Bochum und Köln; siehe Abbildung 5). Daher kann ein sogenannter „Founder Effect“ nicht ausgeschlossen werden. Dieser besagt, dass durch die Untersuchung in einer örtlich begrenzten Region ein bestimmtes Gen zufällig gehäuft vorkommen kann (Verwandtschaft, Inzucht). Wird dieses vermehrte Vorkommen eines Genes zufällig, z.B. im Rahmen einer Studie mit der untersuchten Eigenschaft verknüpft, entsteht in der Schlussfolgerung eine scheinbare, jedoch nicht allgemeingültige Korrelation, insbesondere dann, wenn das mutierte Gen in der DNA sehr nahe der Stelle liegt, an der die untersuchte DNA-Mutation lokalisiert ist. Diese Möglichkeit wurde bereits von Ristow et al. in seiner Arbeit angesprochen (Ristow et al., 1998).



Abb. 5: Der rote Kreis zeigt die Region, aus welcher das Studienkollektiv der Mutationsanalyse durch Ristow et al. rekrutiert wurde. Es handelt sich um eine kleine Region im Bereich Köln und Bochum. Hier wurden die vier Mutationsträger gefunden.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine Korrelation zwischen der von Ristow et al. 1998 in Deutschland beschriebene Pro115Gln Mutation des PPAR γ 2-Genes und krankhafter Adipositas (> Grad II) besteht. Anhand eines repräsentativen gesamtdeutschen Kollektivs zeigte sich, dass die oben genannte Mutation epidemiologisch mit vernachlässigbar geringer Wahrscheinlichkeit eine genetische Ursache für krankhafte Adipositas darstellt.

Insgesamt wurden 85 Personen aus Gesamtdeutschland mit einem BMI von mindestens 35 kg/m² untersucht und überprüft, ob bei ihnen die Pro115Gln Mutation des PPAR γ 2-Gen besteht. Aus dem Blut dieser Probanden wurde die DNA extrahiert und mittels PCR vervielfältigt. Anschließend wurde ein HIND2-Verdau durchgeführt, welcher bei Vorliegen der Mutation eine Bande bei 104 bp und 25 bp aufgewiesen hätte. Unter den untersuchten Blutproben fanden sich keine Träger der vorbeschriebenen Mutation. Demnach ist die Allelfrequenz so gering, dass die von Ristow et al. beschriebenen Pro115Gln-Träger eventuell im Sinne eines „Founder-Effekts“ interpretiert werden müssen.

7. Literaturverzeichnis:

1. **Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H:** Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997; 46; 1319-1327
2. **Auwerx J:** PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 1999; 42: 1033-1049
3. **Barroso I, Gurnell M, Crowley VEF, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GLI, Williams TDM, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VKK, Rahilly SO:** Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402; 880-883
4. **Beamer BA et al.:** Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998; 47; 1806-1808
5. **Bouchard C:** Genetics of obesity in humans: current issues. *Ciba Found Symp*; 1996; 201; 108-115
6. **Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W:** Differential expression of peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and γ in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137: 354-366
7. **Clement K, Hercberg S, Passinge B, Galan P, Varroud-Vial M, Shuldiner AR, Beamer Ba, Charpentier G, Guy-Grand B, Froguel P, Vaisse C:** The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR γ gene mutations in obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 2000; 24; 391-393
8. **Day C:** Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* 1999; 16; 179-192
9. **Deeb SS et al.:** A Pro 12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genet* 1998; 20; 284-287
10. **Desvergne B, Wahli W:** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688
11. **Ehrmann J, Vavrusova N, Collan Y, Kolar Z:** PPARs in health and disease. *Biomed Papers*; 2002; 146; 11-14
12. **Evans D, Mann WA, Heer J, Michel U, Wendt D, Kortner B, Wolf A, Beisiegel U:** Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) does not play a major role in the development of morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 2000; 24; 647-651
13. **Evans RM, Barish GD, Wang Y-X:** PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*; 2004; 10; 355-361

14. **Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J:** PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 1998; 438; 55-60
15. **Flier JS, Maratos-Flier E:** Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*; 1998; 92; 437-440
16. **Ford ES.** Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 2005; 11; 2745-2749
17. **Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD:** Isolation of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr* 1995; 4: 281-299
18. **Grundy SM, CleemannJI, Daniels SR, Donato KA, Eckl RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F:** Diagnosis and management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/national Heart, Lung and Blood Institute scientific statement. *Circulation*; 2005; 112; 2735-2752
19. **Guo Q, Sahoo SP, Wang PR, Milot DP, Ippolito MC, Wu MS, Baffic J, Biswas C, Hernandez M, Lam MH, Sharma N, Han W, Kelly LJ, Macnaul KL, Zhou G, Desai R, Heck JV, Doebber TW, Berger JP, Moller DE, SparrowCP, Chao ZS, Wright SD:** A Novel Peroxisome Poliferator-Activated Rezeptor α/γ Dual Agonist demonstrates favorable Effects on Lipid Homeostasis. *Endocrinology*; 2004; 145; 1640-1648
20. **Hamann A, Munzberg H, Buttron P, Busing B, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Hebebrand J, Greten H:** Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene in lean and obese subjekts. *Eur J Endocrinol*; 1999; 141; 90- 92
21. **Hauner H, Buchholz G, Hamann A, Husemann B, Koletzko B, Liebermeister H, Wabitsch M, Westenhöfer J, Wirth A, Wolfram G:** Prävention und Therapie der Adipositas. Evidenzbasierte Leitlinie; Deutsche Adipositas-Gesellschaft, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin; 2007; 1-29
22. **Houseknecht KL, Cole BM, Steel PJ:** PPAR γ and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol*; 2002; 22; 1-23
23. **Hsueh WA, Bruemmer D:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ : Implications for cardiovascular Disease. *Hypertension*; 2004; 43 (part 2); 297-305
24. **Jiang CY, Ting AT, Seed B:** PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86
25. **Kawai T, Takei I, Oguma Y, Ohashi N, Tokui M, Oguchi S, Katsukawa F, Hirose H, Shimada A, Watanabe K, Saruta T:** Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes. *Metabolism* 1999; 48; 1102-1107
26. **Keller H, Wahli W:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4: 291-296

27. **Kersten S, Desvergne B, Wahli W:** Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405: 421-424
28. **Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM:** Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7355-7359
29. **Latruffe N, Vamecq J:** Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 1997; 79: 81-94
30. **Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D:** Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 1992; 11: 1003-1013
31. **Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moermann EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, Jilka RL:** Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR γ 2. *J Cell Biochem* 1999; 74: 357-371
32. **Lecka-Czernik B, Moermann EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL:** Divergent Effects of Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Ligands on Adipocyte Versus Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* 2002; 143 (6): 2376-2384
33. **Maes HH, Neale MC, Eaves LJ:** Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997; 27: 325-351
34. **Marx N, Duez H, Fruchart J-C, Staels B:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis. *Circ Res*; 2004; 94: 1168-1178
35. **Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P:** Impact of the peroxisome proliferator activated receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 2000; 24: 195-199
36. **Mensink GB, Lampert T, Bergmann E:** Übergewicht und Adipositas in Deutschland 1984-2003. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*; 2005; 48: 1348-1356
37. **Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y:** Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 908-912
38. **Olefsky JM, Saltiel AR:** PPAR γ and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 362-368
39. **Palitzsch KD, Nusser J, Arndt H, Enger I, Zietz B, Cuk a, Schaeffler A, Büttner R, Frick E, Rath H, Schölmerich J:** Die Prävalenz des Diabetes mellitus wird in Deutschland deutlich unterschätzt – eine bundesweite epidemiologische Studie auf der Basis einer HbA1c-Analyse. *Diab Stoffw* 1999; 8: 189-200
40. **Perusse L, Chagnon YC, Bouchard C:** Etiology of massive obesity: role of genetic factors. *World J Surg*; 1998; 22: 907- 912
41. **Pi-Sunyer FX:** The medical risks of obesity. *Obes Surg*; 2002; 12: 6S-11S

42. **Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK:** The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negativ regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82
43. **Riddle MC:** Learning to use troglitazone. *Diabetes Care* 1998; 21; 1389-1390
44. **Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR:** Obesity associated with a mutation in a generic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998; 339; 953-959
45. **Rosen ED, Spiegelman BM:** PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth; *J Biol Chem* 2001; 276: 37731-37734
46. **Scheen AJ, Lefebvre PJ:** Troglitazone: antihyperglycemic activity and potential role in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22; 1568-1577
47. **Schoonjans K, Staels B, Auwerx J:** Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids and gene expression. *J Lipid Res* 1996; 37; 907-925
48. **Soderberg S, Ahren B, Jansson JH, Johnson O, Hallmans G, Asplund K, Olsson T:** Leptin isassociated with increased risk of myokardial infarction. *J Intern Med*; 1999; 246; 409-418
49. **Sorensen TI:** The genetics of obesity. *Metabolism*; 1995; 44; 4-6
50. **Spiegelman BM,** PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 47: 507-514
51. **Spiegelmann BM, Flier JS:** Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*; 1996; 87; 377-389
52. **Strakova N, Ehrmann J, Dzubak P, Bouchal J, Kolar Z:** The Synthtic Ligand of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Clitazone affects Human Glioblastoma cell Lines. *J Phar Expe Ther*; 2004; 309; 1239-1247
53. **Tontonoz P, Hu E, Spiegelmann BM:** Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79; 1147-1156
54. **Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM:** PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93: 241-252
55. **Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS:** Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99: 2416-2422
56. **Vogt T, Hafner C, Bross K, Bataille F, Jauch KW, Berand A, Landthaler M, Andreesen R, Reichle A:** Antiangiogenetic therapy with pioglitazone, rofecoxib and metronomic trofosamide in advanced malignant vascular tumors. *Cancer*; 2003; 98; 2251-2256

57. **Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, KellyA, Sheperd J, Gaw A, Sattar N:** Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*; 2001; 104; 3052-3056
58. **Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelmann BM, Moller DE:** Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* 1996; 10; 1457-1466
59. **Zhu Y,Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK:** Structural organisation of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92; 7921-7925

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

PPAR	Peroxisomen Proliferator Aktivierter Rezeptor
PPRE	Peroxisomen-Proliferator-Antwort-Elemente (engl.)
TZD	Thiazolidindione
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.)

8.2 Lebenslauf

Name:	Forstner
Vorname:	Daniel
Geb.Datum:	08. Mai1974
Geburtsort:	Vohenstrauß
Familienstand	verheiratet
Religion	evangelisch
Schulbildung:	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Neustadt a.d. Waldnaab Abschluss mit Abitur 1994; Note 1,6
Ausbildung:	
01.07.1994	Eintritt in die Bundeswehr
01.04.- 30.06.'95	Krankenpflegepraktikum im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz
Seit Nov. 1995	Medizinstudium in Regensburg
Sept. 1997	Physikum nach Mindeststudienzeit mit Gesamtnote 3,0
Seit Nov. 1997	mehrere Famulaturen in den Fächern Chirurgie, Innere Medizin, Allgemeinmedizin und Nuklearmedizin
Sept. 1998	1.Staatsexamen nach Mindeststudienzeit mit Gesamtnote 2,0
Sept. 2000	2. Staatsexamen nach Mindeststudienzeit mit Gesamtnote 1,0

Okt. '00-Aug. '01	Praktisches Jahr in den Abteilungen Chirurgie, Innere Medizin und Nuklearmedizin
1. Oktober '01	Drittes Staatsexamen nach Mindeststudienzeit mit Gesamtnote 2. Abschluss des Medizinstudiums in Mindeststudienzeit mit Gesamtnote sehr gut.
15. Okt. '01-31. Okt. '02	AiP in der Abteilung für Chirurgie im Bundeswehrkrankenhaus Amberg in der Oberpfalz
01. Nov. '02-14. Apr. '03	AiP in der Abteilung für Innere Medizin im Bundeswehrkrankenhaus Amberg in der Oberpfalz
15. Apr. '03-31. Jan. '04	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin im Bundeswehrkrankenhaus Amberg in der Oberpfalz
02. Feb. '04- 31. Juli '04	Weiterbildung zum Allgemeinmediziner im StoSanZ Regensburg Nibelungenkaserne
01. Aug. '04-31. Jan. '05	Weiterbildung zum Allgemeinmediziner in Allgemeinarztpraxis Szika in Neutraubling
seit 01. Feb. '05	Truppenärztliche Tätigkeit bei der Bundeswehr an verschiedenen Standorten
06. April '05	Facharztprüfung Allgemeinmedizin in Hannover erfolgreich absolviert
01. Mai '05-aktuell	- Truppenarzt SanZ Feldkirchen mit Außenstellen - mehrere Auslandseinsätze in Afghanistan

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Okka Hamer, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und große Geduld aufbrachte.

Außerdem danke ich meinem zweiten Betreuer Herrn PD Dr. med. Cornelius Bollheimer. Er hat mich zusammen mit Frau PD Dr. med. Okka Hamer bei den experimentellen Versuchsaufbauten angeleitet und mich sowohl während der experimentellen als auch der theoretischen Arbeit mit großem Engagement begleitet und unterstützt.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Palitzsch für die Überlassung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler für die Übernahme der Korrektur und Prüfung meiner Arbeit.

Ohne die großzügige und aufopfernde Unterstützung der Labormitarbeiterinnen Fr. Nissel, Fr. Michel und Fr. Ottinger wären die hochpräzisen und eindeutigen Ergebnisse der DNA-Mutationsanalysen in dieser Qualität nicht möglich gewesen. Dafür danke ich Ihnen ganz besonders!

Ganz besonderer möchte ich mich bei meiner Frau Tatjana, die mir ständig liebevoll zur Seite stand, bedanken.