

**Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik
der Universität Tübingen
Abteilung Medizinische Genetik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. O. Rieß**

**Typ-2-Diabetes: Assoziationsstudie zur Identifizierung
erblicher Risikofaktoren und Ermittlung
mit Typ-2-Diabetes in Zusammenhang stehender
parentaler Krebs-Risiken**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Christine Stefanie Zürn
aus Böblingen**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-U. Häring

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
1 Einführung.....	3
2 Allgemeine Risikofaktoren des Typ-2-Diabetes	3
3 Erbliche Aspekte des Typ-2-Diabetes.....	4
3.1 Strategien zur Erforschung der Genetik des multifaktoriellen Typ-2-Diabetes.....	4
3.1.1 Kandidatengen-Ansatz	5
3.1.2 Molekulargenetische Assoziationsstudien	6
4 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen	7
5 Ziel der Arbeit	7
Studienteilnehmer, Material und Methodik	9
1 Studienteilnehmer.....	9
2 Material	12
2.1 Gewinnung der Blutproben	12
2.2 Verarbeitung der Blutproben.....	12
3 Methodik	12
3.1 Molekulargenetische Assoziationsstudie	12
3.1.1 Auswahl der genomischen Polymorphismen	12
3.1.2 Präparation der DNA-Pools	13
3.1.3 Individuelle Genotypisierung.....	13
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	13
3.1.5 MassEXTEND-Reaktion.....	14
3.1.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	15
3.1.7 Bestimmung der Allel- und Genotyphäufigkeiten	15
4 Berechnungen.....	16
4.1 Ermittlung der Allelfrequenzen in den DNA-Pools.....	16
4.2 Individuelle Genotypisierung	17
5 Statistische Analyse.....	17
Ergebnisse	19
1 Molekulargenetische Assoziationsstudie	19
1.1 Analyse der DNA-Pools.....	19
1.1.1 Assoziierte Polymorphismen in der Gruppe der Männer.....	23
1.1.2 Assoziierte Polymorphismen in der Gruppe der Frauen	23
1.1.3 Polymorphismen mit Assoziationen in beiden Gruppen.....	24

1.2 Individuell genotypisierte SNPs.....	24
2 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen	30
2.1 Krebserkrankungen der Väter der Typ-2-Diabetiker und der Kontrollen.....	30
2.2 Krebserkrankungen der Mütter der Typ-2-Diabetiker und der Kontrollen.....	32
3 Zusammenfassung der Ergebnisse	34
3.1 Molekulargenetische Assoziationsstudie	34
3.2 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen	34
Diskussion	36
1 Molekulargenetische Assoziationsstudie	36
1.1 Methodik	36
1.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Assoziationsstudie in den DNA-Pools	37
1.3 Ergebnisse aus der individuellen Genotypisierung einzelner Polymorphismen	46
2 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen	53
3 Schlussfolgerung aus der Arbeit	57
4 Ausblick	58
Zusammenfassung.....	60
Anhang	62
1 Literaturverzeichnis.....	62
2 Abkürzungsverzeichnis	78
3 Tabellenverzeichnis.....	79
4 Abbildungsverzeichnis	80
5 Publikationen.....	81
6 Danksagung	82
7 Lebenslauf	83

Einleitung

1 Einführung

Diabetes mellitus stellt eine Gruppe metabolischer Erkrankungen dar, die durch hohe Plasmaglukosekonzentrationen charakterisiert sind und über 100 Millionen Menschen weltweit betreffen (84). In über 90 % der Fälle liegt ein Typ-2-Diabetes (NIDDM) vor. Er ist durch eine Insulinresistenz der peripheren Gewebe und in späteren Stadien zusätzlich durch eine Insulinsekretionsstörung (relatives Insulindefizit) charakterisiert (53). Man geht davon aus, dass sowohl Gene als auch so genannte „Umweltfaktoren“ an der Entstehung dieser multifaktoriellen Erkrankung beteiligt sind (21). Außerdem ist der Typ-2-Diabetes positiv mit einer Reihe von Krebserkrankungen assoziiert (160). Im Folgenden soll auf die erblichen und „umweltbedingten“ Faktoren und die mit Typ-2-Diabetes assoziierten Krebserkrankungen eingegangen werden.

2 Allgemeine Risikofaktoren des Typ-2-Diabetes

Zahlreiche Risikofaktoren konnten für den Typ-2-Diabetes bereits identifiziert werden. Vor allem stellt eine kalorienreiche Überernährung einen Risikofaktor für den Typ-2-Diabetes dar (125). Der zentrale Fettverteilungstyp, definiert als Quotient Taillen- / Hüftumfang $>1,0$ bei Männern und $>0,85$ bei Frauen, korreliert stark mit dem Typ-2-Diabetes (32;126). Aufgrund experimenteller Studien, die zeigten, dass körperliche Aktivität die Insulinresistenz reduziert, ist Bewegungsmangel auch als Risikofaktor für den Typ-2-Diabetes anzusehen (77). Niedriges Geburtsgewicht konnte mit Typ-2-Diabetes im Erwachsenenalter assoziiert werden (57;94). Auch Medikamente wie Steroide, Diuretika und Antihypertensiva können durch Einschränkung der Insulinsekretion zur Manifestation eines Typ-2-Diabetes beitragen (50). Da die Inzidenz des Typ-2-Diabetes mit steigendem Alter zunimmt, stellt ein erhöhtes Alter einen weiteren Risikofaktor für den Typ-2-Diabetes dar. Auch das weibliche Geschlecht prädisponiert verstärkt zu Typ-2-Diabetes, wenn zuvor ein Gestationsdiabetes vorlag (111). Die ethnische Herkunft beeinflusst ebenfalls das Risiko, an Typ-2-Diabetes zu erkranken, da sich die Typ-2-Diabetes-Prävalenz in verschiedenen Bevölkerungen stark unterscheidet (87;167). Ein Nikotinabusus schränkt die Insulinwirkung akut ein und ist mit einer Insulinresistenz und einer Hyperinsulinämie assoziiert (7;40;47;127). Daher ist Rauchen als ein bedeutsamer Risikofaktor für den Typ-2-Diabetes anzusehen. Es konnte auch gezeigt werden, dass Virusinfek-

tionen zur Zerstörung von β -Zellen des Pankreas führen können und dadurch Diabetes, allerdings meist einen Typ-1-Diabetes, induzieren (85;117).

3 Erbliche Aspekte des Typ-2-Diabetes

Durch Zwillingsstudien (123) und das Vorkommen familiärer Häufungen (48) wurde deutlich, dass nicht nur „Umweltfaktoren“, sondern auch erbliche Aspekte für die Entstehung des Typ-2-Diabetes von Bedeutung sind. Der Typ-2-Diabetes ist überwiegend eine multifaktorielle, polygene und genetisch heterogene Erkrankung, das heißt, dass verschiedene Gene in unterschiedlichen Populationen die Anfälligkeit in einem durch weitere allgemeine Risikofaktoren bestimmten Kontext beeinflussen (3;93). Es gibt jedoch auch erbliche Typ-2-Diabetes-Erkrankungen wie z. B. die diversen Formen des Maturity onset diabetes of the young (MODY) (150).

Verschiedene chromosomale Positionen konnten durch genomweite Kopplungsanalysen mit Typ-2-Diabetes in Verbindung gebracht werden. Suszeptibilitätsloki für den Typ-2-Diabetes wurden bereits bei Amerikanern mexikanischen Ursprungs (35;35;59;59), der schwedisch sprechenden Bevölkerung von Botnia in Finnland (99), finnischen Geschwisterpaaren mit Typ-2-Diabetes (54), Franzosen (152), amerikanischen Pima-Indianern (61), Utahs nordeuropäischen Ursprungs (38), kanadischen Eingeborenen (Oji-Cree) (70), Patienten ashkenazi-jüdischer Herkunft (122), Skandinaviern (120) und chinesischen Han (98) lokalisiert. In diesen Suszeptibilitätsloki werden durch Positionsklonierung Gene identifiziert, die für den Typ-2-Diabetes relevant sein könnten. Ein Beispiel ist *CAPN10* (MIM# 605286 (113)), das die Zystein-Protease Calpain-10 kodiert. Dieses Gen liegt auf Chromosom 2 im Bereich q37.3 im NIDDM1-Lokus und wies bei mexikanischen Amerikanern mit Typ-2 Diabetes krankheitsassoziierte Mutationen auf (59;72;72;72). Ein Hochrisiko-Haplotyp dieses Gens, bestehend aus UCSNP-43, -19 und -63, zeigte in verschiedenen Studien Assoziationen mit einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko (72).

3.1 Strategien zur Erforschung der Genetik des multifaktoriellen Typ-2-Diabetes

Neben Untersuchungen an Tiermodellen, z. B. IRS2 Knock-out Mäusen oder funktionellen Studien, dienen unter anderem der Kandidatengenansatz und molekulargenetische Assoziationsstudien der Erforschung der Genetik des Typ-2-Diabetes.

3.1.1 Kandidatengen-Ansatz

Kandidatengene sind Gene, bei denen aufgrund einer bekannten oder vorhergesagten Eigenschaft (Funktion, Expressionsmuster, chromosomale Lokalisation oder Strukturmotiv) eine Beteiligung an der Pathogenese einer Krankheit vermutet werden kann. Die Mutationssuche in Kandidatengen hat das Ziel, Sequenzveränderungen zu identifizieren, die ausschließlich oder gehäuft bei Erkrankten auftreten. Eine solche Assoziation deutet auf eine ursächliche Beteiligung der Mutation an der jeweiligen Erkrankung hin. Ein Kausalzusammenhang wird wahrscheinlicher, wenn die Mutation zu einer Aminosäureänderung führt, insbesondere in konservierten und daher vermutlich funktional wichtigen Bereichen des Proteins. Eine Mutation kann dann als krankheitsverursachend interpretiert werden, wenn sie zum Abbruch der Proteinsynthese führt, z. B. Stop-Mutationen oder bestimmte Insertionen und Deletionen. Einige Polymorphismen und Sequenzvariationen in möglichen Typ-2-Diabetes-Kandidatengen wie z. B. *PPARG* (4), *PPPIR3A* (60), *AKT1* (101), *INS* (75), *NEUROD1* (100), *RSTN* (114), *IKBKB* (103), *K(IR)* (131), *SUR* (64), *IRS1* (142), *IRS2* (162) und *Amylin*-Gen (132) wurden bereits auf ihre Assoziation mit Typ-2-Diabetes und damit verbundenen Phänotypen untersucht. In dieser Arbeit wird insbesondere auf *PPARG* und *PPPIR3A* näher eingegangen.

Die Peroxisomen-Proliferation-Aktivierten Rezeptoren (PPAR)

Das Gen *PPARG* auf Chromosom 3 in der Bande p25 kodiert für PPAR-gamma (MIM# 601487 (113)), einen nukleären Rezeptor, der die Transkription von Genen induziert, die für Insulinempfindlichkeit, Adipozytendifferenzierung und Entzündung verantwortlich sind (86). Verschiedene Mutationen in diesem Gen konnten mit Typ-2-Diabetes in Zusammenhang gebracht werden. Die wichtigste Sequenzvariation in diesem Gen ist der Pro12Ala-Polymorphismus. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Typ-2-Diabetes-Risiko mit dem häufigeren Prolin-Allel assoziiert ist (4;34;62;97;105).

Die glykogen-assoziierte Form der Protein Phosphatase 1 (*PPPIR3A*)

Das Gen *PPPIR3A* auf Chromosom 7 im Bereich q11.23-q21.11 kodiert für die glykogen-assoziierte Form der Protein Phosphatase 1 (MIM# 600917 (113)). Diese nimmt Funktionen im Glykogenstoffwechsel wahr. Verschiedene Polymorphismen in diesem Gen konnten mit Insulinresistenz bzw. Typ-2-Diabetes in Verbindung gebracht werden (60;69).

Durch die Identifizierung einer Familie europäischen Ursprungs, die an schwerer Insulinresistenz litt und heterozygote Frameshift-Mutationen in den Genen *PPP1R3A* und *PPARG* aufwies, konnten zudem Interaktionen zwischen diesen beiden Genen nachgewiesen werden (130).

3.1.2 Molekulargenetische Assoziationsstudien

Das Ziel molekulargenetischer Assoziationsstudien ist es, durch den Vergleich einer Patientenstichprobe mit einer altersgleichen Kontrollgruppe ein mit der Erkrankung verknüpftes genetisches Merkmal, z. B. einen DNA-Polymorphismus, zu finden. Untersucht werden diejenigen Gene, deren Produkte an der Entstehung der Krankheit beteiligt sein könnten. In molekulargenetischen Assoziationsstudien werden polymorphe Marker verwendet, die entweder nahe am oder im Kandidatengen liegen. Diese Marker müssen selbst nicht krankheitsauslösend oder risikomodifizierend sein. Stellt sich eine Assoziation mit dem Krankheitsphänotyp heraus, deutet dies auf eine ursächliche Sequenzveränderung in der Nähe hin, die mit dem polymorphen Marker im Kopplungsungleichgewicht liegt (92). Falsch positive Assoziationen können u. a. dann entstehen, wenn erkrankte und gesunde Menschen aus unterschiedlichen genetischen Untergruppen der Bevölkerung stammen. Daher ist es wichtig, dass sowohl die Patienten als auch die Kontrollen aus gleichen genetischen Subpopulationen stammen (139).

Molekulargenetische Assoziationsstudien können z. B. mit ausgewählten Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) durchgeführt werden. SNPs sind Einzelnukleotidaustausche im menschlichen Genom, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in der Population vertreten sind. Sie sind folglich Positionen im Genom, für die mindestens zwei Varianten (Allele) existieren, z. B. C oder G an Position X im Genom. Ein Individuum kann homozygot für C, heterozygot und homozygot für G sein. SNPs sind in kodierenden (Exons), nicht kodierenden (Introns) oder in regulatorischen Genabschnitten lokalisiert. Sie können z. B. durch Vergleich eines DNA-Abschnittes von mehreren Individuen in siliko detektiert werden. Darunter versteht man, dass ein Computerprogramm DNA-Sequenzen aus verschiedenen Sequenz-Datenbanken vergleicht und die unterschiedlichen Stellen identifiziert. Danach findet eine experimentelle Validierung des SNPs statt. Hierbei wird untersucht, ob der Polymorphismus in der zu untersuchenden Population tatsächlich mindestens zwei Allele aufweist. Das National Center for Biotechnology Information (NCBI) verfügt über eine SNP-Datenbank (dbSNP), die Anfang des Jahres 2003 4,1 Millionen SNPs enthielt (159).

4 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen

Typ-2-Diabetiker zeigen eine Komorbidität bezüglich Krebserkrankungen. Sie weisen erhöhte Inzidenzen maligner Neoplasien des Pankreas (22;136), Kolons (73;88;161), Endometriums (119;156), der Brust (133;156), der Leber und ableitenden Gallenwege (65;89), der Niere (27;106) und des Ösophagus (91) auf. Dabei scheint die beim Typ-2-Diabetiker vorliegende Hyperinsulinämie das Tumorwachstum über IGF-1 zu fördern (140). Es ist denkbar, dass Typ-2-Diabetes einerseits einen Risikofaktor für die Entwicklung des Pankreaskarzinoms darstellt, aber auch infolge dieser Krebserkrankung auftreten kann (44). Kolonkarzinome und Typ-2-Diabetes teilen viele Risikofaktoren (Adipositas, falsche Ernährung etc.) und könnten deshalb vermehrt miteinander assoziiert sein (160). Studien belegen, dass Typ-2-Diabetes das Brustkrebsrisiko besonders bei adipösen Frauen erhöht (133). Bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms scheint Typ-2-Diabetes ein Risikofaktor zu sein, der vor allem mit anderen Risikofaktoren wie beispielsweise Alkoholismus synergistisch wirkt (65). Zwischen Typ-2-Diabetes und Prostatakarzinomen konnte allerdings in einer Reihe von Studien eine negative Assoziation nachgewiesen werden (55;128;157). Dabei könnten erniedrigte Testosteron- und IGF-1-Spiegel, aber auch genetische Faktoren für diesen Zusammenhang verantwortlich sein.

5 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung erblicher Risikofaktoren für den Typ-2-Diabetes und der Ermittlung von mit Typ-2-Diabetes in Zusammenhang stehender Krebs-Risiken. Dabei wird das Design einer Fall-Kontroll-Studie verwendet (Typ-2-Diabetiker und diabetesfreie Kontrollen).

Die erblichen Faktoren für den Typ-2-Diabetes werden im Rahmen einer molekulargenetischen Assoziationsstudie durch Vergleich von Allel- und Genotyphäufigkeiten von SNPs bei Typ-2-Diabetikern und Kontrollen untersucht. Es soll definiert werden, welches SNP-Allel bzw. welcher Genotyp mit einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes vergesellschaftet ist. Dabei wird auf der einen Seite eine Strategie mittels DNA-Pools gewählt, bei der ca. 1.560 genomweit verteilte SNPs analysiert werden. Auf der anderen Seite werden fünf in Kandidatengenomen befindliche SNPs, die zum Teil in anderen Studien bereits mit Typ-2-Diabetes assoziiert waren, in unserer Studienpopulation bei jedem Studienteilnehmer durch eine individuel-

le Genotypisierung auf ihre Relevanz hin analysiert. Dadurch soll geklärt werden, ob Assoziationen in der von uns untersuchten Population bestätigt werden können. Alle molekulargenetischen Analysen werden dabei von einer Hochdurchsatz-Genotypisierungs-Einrichtung durchgeführt.

Bisher wurden vor allem Studien veröffentlicht, die untersuchten, ob Typ-2-Diabetes-Patienten häufiger an Krebs erkranken als Kontrollpersonen aus der Allgemeinbevölkerung. Diese Arbeit soll darüber hinaus untersuchen, ob Eltern von Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu den Eltern der hier untersuchten Kontrollpopulation andere Inzidenzen im Bereich der Krebserkrankungen aufweisen. Dies könnte ein Hinweis auf erbliche Faktoren sein, die einerseits Risiken für Typ-2-Diabetes-Erkrankungen und gleichzeitig Krebserkrankungen modifizieren.

Studienteilnehmer, Material und Methodik

1 Studienteilnehmer

Die Studie wurde nach positiver Begutachtung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen durchgeführt. Es wurde je eine Patienten- und Kontrollgruppe zusammengestellt.

Die Typ-2-Diabetesgruppe wurde im Diabeteszentrum Bad Mergentheim über die Studie aufgeklärt und um die Teilnahme an der Untersuchung gebeten. Bei den Patienten des Diabeteszentrums lagen entweder akute Stoffwechsellentgleisungen oder chronische Diabetes-Folgekrankheiten vor. Sie waren mindestens 18 Jahre alt. Zusätzlich mussten die Patienten Kaukasier mitteleuropäischer Herkunft sein. Es wurden deshalb aus Vereinfachungsgründen nur Patienten in die Studie eingeschlossen, deren Eltern in Deutschland geboren waren. Der Typ-2-Diabetes wurde nach den Kriterien der International Classification of Diseases (ICD-10) definiert. Bei den an der Studie teilnehmenden Patienten wurde im Arzt-Patienten-Gespräch eine Anamnese erhoben. Es wurde Venenblut abgenommen.

Die Kontrollgruppe wurde in der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Tübingen aus Blutspendern zusammengestellt. Die untere Altersgrenze der an der Studie teilnehmenden Kontrollpersonen lag bei 40 Jahren. Auch in die Kontrollgruppe durften nur Personen eingeschlossen werden, deren Eltern beide in Deutschland geboren waren. Außerdem musste sichergestellt werden, dass die Kontrollpersonen nicht an Typ-2-Diabetes oder an einer anderen Diabetesform erkrankt waren. Dies wurde dadurch gewährleistet, dass bei jeder Blutspende die Blutglukosekonzentration überprüft wurde. Außerdem konnten durch die von uns durchgeführten HbA1c-Messungen etwaige Typ-2-Diabetiker aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen werden. Es wurde auch hier die Anamnese erhoben und Blut abgenommen.

Die Kontrollgruppe bestand aus 781 Personen, und zwar 390 Frauen und 391 Männern. Die Typ-2-Diabetesgruppe setzte sich aus 801 Studienteilnehmern, nämlich 398 Männern und 403 Frauen zusammen. Insgesamt umfasste die Studie 1.582 Studienteilnehmer. Geschlechtsspezifische Verteilung und Anzahl der Frauen und Männer waren in beiden Gruppen homogen.

Das Alter der Typ-2-Diabetiker reichte von 20,06 bis 90,35 Jahren. Die jüngste Kontrollperson war 39,90 Jahre alt, die älteste 68,21 Jahre. Der Median lag bei den Typ-2-Diabetikern bei 62,25 und bei den Kontrollen bei 47,91 Jahren. Die Altersverteilungen zeigten einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$), der im Durchschnitt 14,34 Jahre betrug.

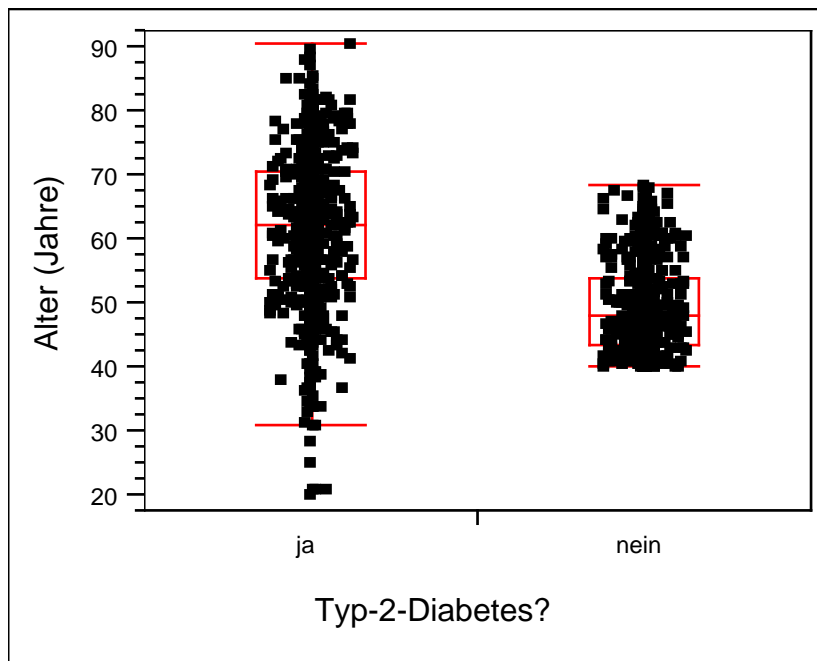


Abbildung 1: Vergleich der Altersstrukturen der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen

Bei der Analyse der erblichen Faktoren wurden in die DNA-Pool-Untersuchungen jeweils 244 weibliche und 254 männliche Typ-2-Diabetiker und Kontrollen, das heißt 498 Patienten und 498 Kontrollen (996 Studienteilnehmer) miteinbezogen. Für die individuelle Genotypisierung von fünf SNPs in Kandidatengenregionen wurde die DNA aller Studienteilnehmer verwendet.

Die Studienteilnehmer wurden zunächst in einem persönlichen Arzt-Patienten-Gespräch über Art, Ablauf und Sinn der Studie aufgeklärt. Hierzu diente ein Informationsblatt, das den Studienteilnehmern bei Interesse ausgehändigt wurde. Die anschließend schriftlich gegebene Einverständniserklärung konnte während der gesamten Studie ohne Angabe von Gründen zurückgezogen werden. Bei Teilnahmebereitschaft wurde eine Eigen- und Familien-Anamnese durchgeführt und zusammen mit krankheitsspezifischen Daten auf einem speziell dafür erarbeiteten Fragebogen notiert. Der in dieser Studie verwendete Fragebogen ist nachfolgend dargestellt.

2 Material

2.1 Gewinnung der Blutproben

Von jedem Studienteilnehmer wurde nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung eine EDTA-Venenblutprobe abgenommen.

2.2 Verarbeitung der Blutproben

Die Weiterverarbeitung der Blutproben fand innerhalb von 18 Stunden nach der Blutentnahme statt. Bis zur Aufbereitung wurden die Proben bei 4 bis 8°C gelagert. Dann wurden die EDTA-Venenblutröhrchen bei + 10°C und 2.000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipetiert. Die zellulären Bestandteile des Blutes und das Plasma wurden in getrennte Probengefäße abgefüllt und bis zum Abschluss aller Laboranalysen bei – 80°C eingefroren. Die Proben wurden dabei mit einer für jeden Studienteilnehmer spezifischen Nummer versehen und dadurch anonymisiert.

3 Methodik

3.1 Molekulargenetische Assoziationsstudie

Die molekulargenetische Analyse der genomischen Polymorphismen wurde bei einer industriellen Hochdurchsatz-Genotypisierungseinrichtung in Auftrag gegeben (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA). Die nachfolgenden, in 3.1.1 bis 3.1.7 beschriebenen Schritte wurden von Sequenom ausgeführt.

3.1.1 Auswahl der genomischen Polymorphismen

In unserer Studie wurde eine von Braun et al. entwickelte genbasierte SNP-Landkarte mit über 100.000 verzeichneten SNPs für die Auswahl von ca. 1.560 in Genregionen lokalisierten SNPs herangezogen. Der Abstand dieser SNPs betrug im Median 38 kb. Ein SNP wurde als in einer Genregion liegend bezeichnet, wenn er innerhalb eines Exons, Introns oder maximal 10 kb davon entfernt lag. Die fünf individuell genotypisierten SNPs sind eine Auswahl nicht-

synonymer SNPs und Polymorphismen, die in potenziellen Kandidatengenomen für den Typ-2-Diabetes lokalisiert sind.

3.1.2 Präparation der DNA-Pools

Die DNA der Studienteilnehmer wurde in vier Pools eingebracht. Ein Pool umfasste männliche Typ-2-Diabetiker, ein weiterer weibliche Typ-2-Diabetiker. Der dritte Pool bestand aus DNA männlicher Kontrollen, der vierte aus weiblichen Kontrollen. Zunächst wurde die DNA isoliert und gereinigt (PUREGENE™ Purification Kit). Durch Fluoroskan Ascent® (Thermo Labsystems, Franklin, MA) mit PicoGreen® Reagenzien und Ausstattungen (Molecular Probes, P-7589) wurde die isolierte DNA quantitativ bestimmt. Anschließend wurde die DNA zunächst zu einer Standardkonzentration verdünnt. Äquimolare Anteile der individuellen DNA-Probe (83 pg pro Patient) wurden in ein Sammel-Reaktionsgefäß durch automatisiertes Pipettieren (Hamilton ML2200 und Vivace) transferiert, um sicherzugehen, dass eine konstante Menge von jeder DNA-Probe in den Pool mit einging. Der Pool (insgesamt 25 ng) wurde gemischt und auf eine Arbeitskonzentration von 5 ng/µl verdünnt.

3.1.3 Individuelle Genotypisierung

Fünf Polymorphismen in Kandidatengenregionen wurden zur individuellen Genotypisierung aller 1.582 Studienteilnehmer herangezogen. Hierbei wurden anstelle von DNA-Pools 2,5 ng der DNA jedes Studienteilnehmers in die Analyse eingebracht.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In unserer Studie wurden für alle Assays standardisierte PCR-Konditionen benutzt. Genomische DNA (25 ng, gepoolt bzw. individuell), eine Unit der Taq-Polymerase (HotStarTaq, Qiagen, Valencia, CA), 200 µmol von allen dNTPs, 25 pmol des nichtbiotinylierten, genspezifischen PCR Primers Nr. 1, 4 pmol des genspezifischen PCR Primers Nr. 2 und 10 pmol des biotinylierten Universalsequenz-Primers wurden für das folgende Temperatur-Profil mit eingebracht: initiale Denaturierung bei 95°C 15 Minuten lang, gefolgt von 45 Zyklen von 95°C für 20 Sekunden, 56°C für 30 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden. Zum Schluss fand ein finaler Amplifikationszyklus über 3 Minuten lang bei 72°C statt.

Die PCR-Produkte wurden immobilisiert, indem sie auf Streptavidin-umhüllte paramagnetische Partikel (Dynal, Oslo) über den biotinylierten universellen PCR-Primer aufgebracht wurden. Dann wurde der Doppelstrang durch 50 µl 0,1 M NaOH bei Raumtemperatur denaturiert. Nach der Entfernung der NaOH fand eine Neutralisation durch 10 mM Tris-HCl-Lösung statt. Der anti-sense-Strang (nicht biotinyliert) wurde abgetrennt, so dass nur der sense-Strang gebunden blieb. Die einzelsträngigen PCR-Produkte wurden für die Primer-Verlängerung durch MassEXTEND-Reaktionen verwendet (78).

3.1.5 MassEXTEND-Reaktion

Durch MassEXTEND-Reaktionen wurden allelspezifische Produkte erzeugt: Der assayspezifische anti-sense-Extensionsprimer wurde dem einzelsträngigen Template hinzugegeben. Er hybridisierte neben dem zu genotypisierenden SNP und wurde mit Deoxynukleotidtriphosphaten und einer DNA-Polymerase verlängert, bis es durch den Einbau eines Dideoxynukleotidtriphosphates zum Abbruch der DNA-Synthese kam. Entsprechend dem Allel des SNPs wurden bei der MassEXTEND-Reaktion allelspezifische Basen eingearbeitet.

Primer Extension-Reaktionen wurden in unserer Studie durch Triple-Terminator-Mixe durchgeführt. Die Assays wurden nach den SNP-spezifischen benötigten Termination-Mixen (ddACG, ddACT, ddAGT und ddCGT) gruppiert. Die letzte Reaktion von 15 µl umfasste 1 Einheit Thermosequenzase (Amersham Pharmacia), 50 µM des Terminatoren-Mixes und 20 pmol assay-spezifische Extensionsprimer. Alle Assays wurden mit dem gleichen Temperaturprofil durchgeführt, und zwar mit einer initialen Denaturierung bei 80°C für 30 Sekunden, gefolgt von 3 Zyklen bei 45°C für 15 Sekunden und 72°C für 1 Minute.

Durch eine Ammoniumhydroxid-Lösung wurden die Primer-Extensions-Produkte von der festen Trägersubstanz wieder gelöst. Für die nachfolgende Massenspektrometrie wurden 15 nl der Probe auf einen Silizium Chip (SpectroCHIP®), der 384 Elemente umfasst, durch eine piezoelektrische Pipette aufgebracht (95).

3.1.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Durch die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) konnte das exakte Molekulargewicht der DNA-Probe gemessen werden (10;20). Das Massenspektrometer beinhaltet eine Ionenquelle, einen Massenanalysator und einen Massendetektor. Die zu analysierenden Proben, hier die einzelsträngigen Extensions-Produkte, wurden mit einer Trägersubstanz (Matrix) auf einen MALDI-Probenträger (384-Elemente-Silizium-Chip) als feste Phase nach einer Kristallisation eingetrocknet. Die feste Matrix bestand aus niedermolekularen organischen Molekülen, welche die ultraviolette Strahlung stark absorbieren. Dann wurde der Probenträger in das Massenspektrometer eingebracht. Die feste Matrix-Analyt-Mischung wurde für Nanosekunden unter Vakuumbedingungen durch einen ultravioletten (337 nm) Laserpuls bestrahlt. Hierbei wurde der Analyt durch Absorption des Laserstrahls in einen ionisierten, gasförmigen Zustand transformiert. Die Analytmoleküle wurden durch das Spannungsfeld des Massenspektrometers beschleunigt und in den Massenanalysator gelenkt. Das Molekulargewicht des Analyten wurde schließlich durch eine Flugzeitanalyse bestimmt. Für jeden SNP wurden drei Messungen durchgeführt (138).

3.1.7 Bestimmung der Allel- und Genotyphäufigkeiten

Die Allele des SNPs unterschieden sich durch die natürliche Massendifferenz der komplementär eingebauten Basen. Es waren drei Genotypisierungsergebnisse der einzelnen SNP-Analyse möglich: Der Patient konnte homozygot für das eine oder andere Allel sein oder es lag Heterozygotie vor. Dies war durch Peaks an der entsprechenden Masse in Dalton ersichtlich. Diese Massenspektren wurden mithilfe einer Software (SPECTROTYPYPER®, SEQUENOM) durch Basislinien-Korrektur, Peak-Identifikation und Peak-Algorithmen bearbeitet. Auf diese Weise wurde die Allelhäufigkeit bzw. Genotyphäufigkeit für jeden SNP in allen vier DNA-Pools bzw. individuell bei jedem Studienteilnehmer bestimmt (104;134;158).

4 Berechnungen

4.1 Ermittlung der Allelfrequenzen in den DNA-Pools

Es wurde ein statistischer Vergleich der vier Allelhäufigkeiten der SNPs in den vier DNA-Pools durchgeführt. Aus den drei Messungen der relativen Allelhäufigkeit des jeweiligen zweiten Allels (willkürlich definiert) der analysierten SNPs wurde der Mittelwert gebildet. Danach wurde aus der mittleren relativen Allelhäufigkeit die absolute Häufigkeit berechnet, indem die relative Häufigkeit für das zweite Allel mit der Anzahl der Studienteilnehmer im Pool multipliziert wurde. Die absoluten Häufigkeiten für das erste Allel wurden aus der Anzahl der Studienteilnehmer und der absoluten Häufigkeit der zweiten Allele berechnet. Da sich bei den absoluten Häufigkeiten Werte mit der Zahl 0 befanden und die log odds ratios berechnet werden sollten, wurde zu jeder absoluten Häufigkeit die Zahl 0,5 addiert. Anschließend wurden die log odds ratios durch die Formel

$$\log (a \times d) : (b \times c)$$

a = absolute Häufigkeit des ersten Allels bei den Kontrollen

b = absolute Häufigkeit des zweiten Allels bei den Kontrollen

c = absolute Häufigkeit des ersten Allels bei den Fällen

d = absolute Häufigkeit des zweiten Allels bei den Fällen

berechnet.

Dann wurde der Chi-Quadrat-Test für die absoluten Häufigkeiten angewandt. Die Formel lautet:

$$\frac{(a \times d - b \times c)^2 (a+b+c+d)}{(a+c) (a+b) (c+d) (b+d)}$$

Hier wurden die absoluten Allelhäufigkeiten ohne die Addition von 0,5 verwendet. Es wurde angenommen, dass ein Chi²-Wert >3,84 auf dem 5%-Signifikanzniveau signifikant ist. Nun wurden die p-Werte berechnet und der Größe nach sortiert.

Aufgrund der Verteilung der log odds ratios, die sich signifikant von einer Normalverteilung unterscheidet, war es sinnvoll, die Ausreißer zu betrachten, die durchaus ein einzelnes signifi-

kantes Ergebnis darstellen können. Um die Rate der falsch Negativen zu kontrollieren, wurde die Methode von Benjamini und Hochberg (14) verwendet. Hierdurch wurde eine neue Schwelle durch die Formel

$$P(i) < (i:m) \times q^*$$

$$q^* = 0,05$$

$$P = \text{p-Werte}$$

$$M = \text{Zahl der Hypothesen (1.561 analysierte SNPs bei Männern, 1.559 bei Frauen)}$$

festgelegt, was einer Bonferroni-Korrektur ähnlich ist. Die einzelnen Assays waren dann als signifikant zu werten, wenn ihre p-Werte kleiner als die neu erstellte Schwelle waren.

4.2 Individuelle Genotypisierung

Bei der statistischen Berechnung wurden alle drei möglichen Genotypen (homozygot Allel A1, heterozygot, homozygot Allel A2) der Studienteilnehmer berücksichtigt. Das prozentual häufiger vorkommende Allel wurde als Allel A1, das prozentual seltenere als Allel A2 definiert. Anschließend wurde für jeden Studienteilnehmer die Häufigkeit des Allels A2 bestimmt (0, 1 oder 2). Zur Berechnung der Signifikanz der individuellen Genotypisierungsergebnisse wurde als klassischer Assoziationstest der Chi²-Test für Unabhängigkeit der Genotyp-Häufigkeiten verwendet (129).

5 Statistische Analyse

Die Studienteilnehmer-Daten wurden mit den Programmen Microsoft-Excel und Microsoft Access erfasst. Die statistischen Berechnungen erfolgten mithilfe des Computerprogrammes JMP am Institut für Medizinische Biometrie und Medizinische Informationsverarbeitung. Die Diagramme wurden mit den Programmen Microsoft-Word, Microsoft-Excel und JMP erstellt.

Die Ergebnisse der SNP-Analyse wurden durch die Berechnung von p-Werten, odds ratios, 95%-Konfidenzintervallen und durch die Methode von Benjamini et al. (14) und Sasiene (129) auf Signifikanz hin geprüft.

Zum Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der anamnestisch erhobenen Krebserkrankungen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet. Zur Interpretation wurden odds ratios (relatives Risiko), p-Werte und 95%-Konfidenzintervalle herangezogen. Alle Mittelwerte sind als Median angegeben.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art wurde auf $\alpha = 0,05$ (tolerierbares Signifikanzniveau) festgelegt. Dies entspricht einer 5%igen Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. einer 95%igen Sicherheit.

Ergebnisse

Tabelle 1: Überblick über die Ergebnisse der Untersuchung der allgemeinen Risikofaktoren

Risikofaktor	Typ-2-Diabetiker	Kontrollen
Alter (Jahre)	62,25 (Median)	47,91 (Median)
HbA1c	8,6 % (Median)	5,1 % (Median)
Systol./Diastol. Blutdruck	140/80 (Median)	120/80 (Median)
BMI	30,12 (kg/m ²)	25,43 (kg/m ²)
Fettverteilungsquotient (♀)	0,928 (Median)	0,926 (Median)
Fettverteilungsquotient (♂)	1,0 (Median)	0,942 (Median)
Nikotinabusus	14,86 %	21,64 %

1 Molekulargenetische Assoziationsstudie

1.1 Analyse der DNA-Pools

Für die DNA-Pool-Untersuchungen von 996 Studienteilnehmern wurden bei den Männern 1.561 und bei den Frauen 1.559 über das Genom verstreute SNPs herangezogen. Hierbei wurden die Allelhäufigkeiten dieser Polymorphismen zwischen den vier Pools verglichen.

In den nachfolgenden Abbildungen ist die Verteilung der log odds ratios der Allelhäufigkeiten dieser SNPs ersichtlich. Diese Verteilung weicht signifikant von einer Normalverteilung ab und es sind Ausreißer zu beobachten. Eine log odds ratio mit dem Wert 0 lässt den Rückschluss zu, dass sich die Allelhäufigkeiten des betreffenden SNPs zwischen den vier DNA-Pools nicht signifikant voneinander unterscheiden. Je näher die log odds ratios am Wert 1,0 bzw. – 1,0 liegen, desto signifikanter unterscheiden sich die Allelhäufigkeiten in den vier DNA-Pools.

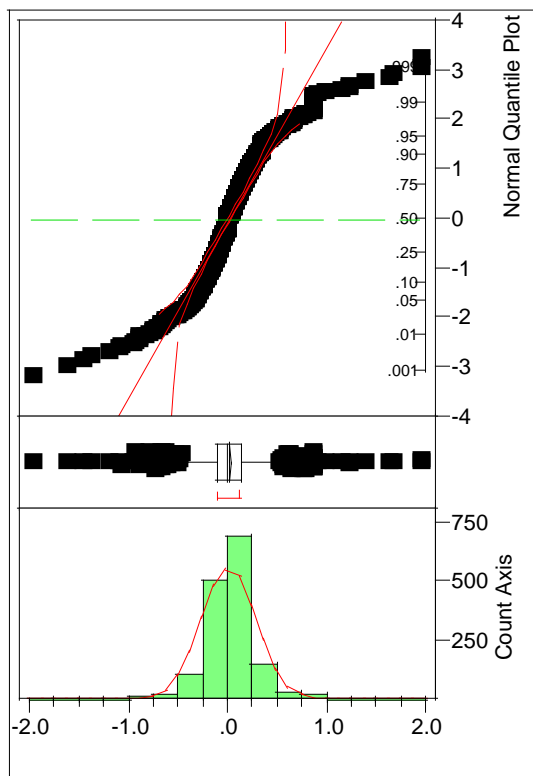


Abbildung 3: Verteilung der log odds ratios der einzelnen Allelhäufigkeiten der SNPs bei den Männern

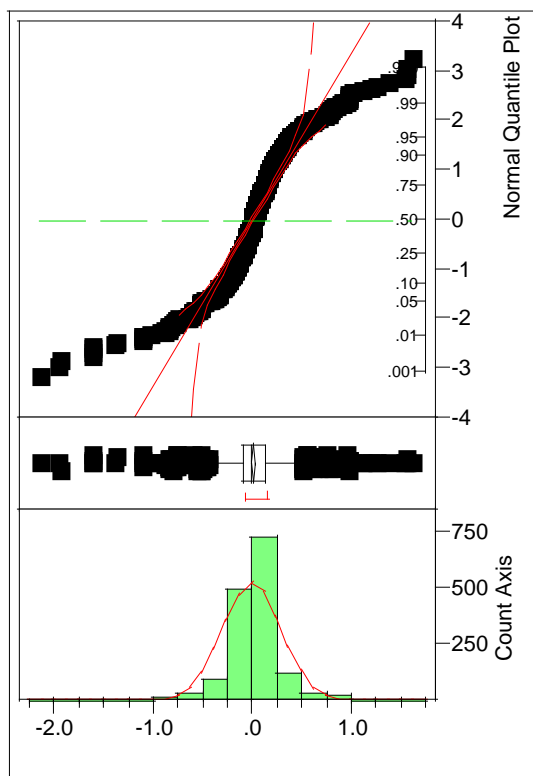


Abbildung 4: Verteilung der log odds ratios der einzelnen Allelhäufigkeiten der SNPs bei den Frauen

Mithilfe des Chi²-Tests wurden für alle SNPs p-Werte berechnet. Dabei wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. In der Männergruppe wurde ein p-Wert $< 0,05$ bei 50 der 1.561 SNPs beobachtet. Bei einem Signifikanzniveau von 5 % wären jedoch 78 SNPs als falsch positive Assoziationen zu erwarten.

Bei den Frauen unterschieden sich 66 SNPs in ihrer Allelhäufigkeit signifikant voneinander. Dies sind bei 1.559 gemessenen SNPs 4,2 %. Es wären aber auch hier 5 % falsch positive, das heißt 78 SNPs zu erwarten gewesen.

In der Verteilung der log odds ratios waren Ausreißer ersichtlich. Durch Anwendung der statistischen Methode von Benjamini und Hochberg (14) für die Ausreißer-SNPs zeigten bei den Männern 5 der 1.561 SNPs eine signifikant unterschiedliche Allelhäufigkeit in den DNA-Pools. Bei den Frauen lag die Anzahl signifikanter SNPs bei 20. Drei dieser Ausreißer-SNPs waren sowohl in der Gruppe der Männer als auch in der Gruppe der Frauen signifikant.

Einen Überblick über die 25 signifikanten Ausreißer-SNPs gibt die nachfolgende Tabelle.

Tabelle 2: Signifikante SNPs nach der Korrektur durch die Methode von Benjamini und Hochberg (14)

m/w	SNP Nr.	a	c	b	d	Chi ²	p	odds ratio	Schwelle
m	FCH-2840	91	204	163	50	103,23	0,00000000	0,14	0,00003
m	FCH-0762	165	226	89	28	41,32	0,00000000	0,23	0,00006
m	FCH-2167	244	207	10	47	27,05	0,00000020	5,33	0,00010
m	FCH-1407	36	77	218	177	19,13	0,00001220	0,38	0,00013
m	FCH-2742	191	225	63	29	15,34	0,00008960	0,39	0,00016
f	FCH-1059	141	54	103	190	64,65	0,00000000	4,78	0,00003
f	FCH-2507	98	30	146	214	48,97	0,00000000	4,73	0,00006
f	FCH-0094	111	49	133	195	35,74	0,00000000	3,30	0,00010
f	FCH-2167	161	216	83	28	35,28	0,00000000	0,25	0,00013
f	FCH-1814	102	163	142	81	30,73	0,00000003	0,36	0,00016
f	FCH-0332	157	96	87	148	30,54	0,00000003	2,77	0,00019

m/w	SNP Nr.	a	c	b	d	Chi ²	p	odds ratio	Schwelle
f	FCH-2045	7	44	237	200	29,98	0,00000004	0,14	0,00022
f	FCH-2840	177	123	67	121	25,23	0,00000051	2,59	0,00026
f	FCH-2388	4	33	240	211	24,59	0,00000071	0,12	0,00029
f	FCH-1039	144	192	100	52	22,02	0,00000271	0,39	0,00032
f	FCH-1444	159	200	85	44	17,71	0,00002568	0,41	0,00035
f	FCH-3069	6	29	238	215	16,28	0,00005458	0,20	0,00038
f	FCH-1193	137	93	107	151	15,92	0,00006603	2,07	0,00042
f	FCH-2415	3	22	241	222	15,22	0,00009570	0,14	0,00045
f	FCH-0633	57	27	187	217	12,94	0,00032129	2,43	0,00048
f	FCH-0501	155	116	89	128	12,62	0,00038128	1,92	0,00051
f	FCH-2031	221	193	23	51	12,49	0,00040951	2,51	0,00055
f	FCH-1863	26	55	218	189	12,45	0,00041820	0,41	0,00058
f	FCH-1407	69	37	175	207	12,34	0,00044312	2,19	0,00061
f	FCH-2368	173	205	71	39	12,02	0,00052687	0,47	0,00064

a = absolute Häufigkeit des ersten Allels bei den Kontrollen

b = absolute Häufigkeit des zweiten Allels bei den Kontrollen

c = absolute Häufigkeit des ersten Allels bei den Typ-2-Diabetikern

d = absolute Häufigkeit des zweiten Allels bei den Typ-2-Diabetikern

Für die signifikanten SNPs wurden die in der obigen Tabelle ersichtlichen odds ratios berechnet. Bei einer odds ratio >1 ist davon auszugehen, dass das zweite Allel einen Risikofaktor für die Entstehung des Typ-2-Diabetes darstellt. Der Faktor, um den die assoziierte Typ-2-Diabetesanfälligkeit steigt, entspricht dem Wert der odds ratio. Eine odds ratio <1 bedeutet, dass das erste Allel als Risikofaktor anzusehen ist. Der Kehrwert der odds ratio entspricht dem Faktor, mit dem das assoziierte Typ-2-Diabetes-Risiko steigt.

1.1.1 Assoziierte Polymorphismen in der Gruppe der Männer

Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die fünf SNPs, die mit einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Männern assoziiert waren.

Tabelle 3: Assoziierte Polymorphismen bei den Männern

SNP	Polymorphismus	Gen	Exon/ Intron	Chromosom	Chrom. Position	Assoziiertes Risiko für Typ-2-Diabetes
FCH-2840	A statt G	<i>BLZF1</i>	Exon	1q24	166976535	↑ 7,14fach
FCH-2167	G statt A	<i>FADD</i>	Exon	11q13.3	72381176	↑ 5,33fach
FCH-0762	T statt C	<i>HLA-B</i>	Exon	6p21.3	31377941	↑ 4,35fach
FCH-1407	T statt C	<i>C21ORF56</i>	Exon	21q22.3	44088022	↑ 2,63fach
FCH-2742	A statt G	<i>F5</i>	Exon	1q23	167140404	↑ 2,56fach

↑ steigend

1.1.2 Assoziierte Polymorphismen in der Gruppe der Frauen

Allele von 20 SNPs kamen im Pool der weiblichen Typ-2-Diabetiker signifikant häufiger vor als im Pool der weiblichen Kontrollpersonen. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 4: Assoziierte Polymorphismen bei den Frauen

SNP	Polymorphismus	Gen	Exon/ Intron	Chromosom	Chrom. Position	Assoziiertes Risiko für Typ-2- Diabetes
FCH-2388	C statt G	<i>KIF4A</i>	Exon	Xq13.1	65817941	↑ 8,33fach
FCH-2045	C statt G	<i>RBPSUH</i>	Exon	9p13-p12	26581347	↑ 7,14fach
FCH-2415	T statt C	<i>RBPSUH</i>	Exon	9p13-p12	26582154	↑ 7,14fach
FCH-3069	T statt C	<i>AVPR2</i>	Exon	Xq28	147308949	↑ 5,00fach
FCH-1059	A statt C	<i>MFGE8</i>	Exon	15q25	85795781	↑ 4,78fach
FCH-2507	G statt T	<i>CYP1B1</i>	Exon	2p22-p21	38267021	↑ 4,73fach
FCH-2167	A statt G	<i>FADD</i>	Exon	11q13.3	72381176	↑ 4,00fach
FCH-0094	C statt T	<i>ABL1</i>	Exon	9q34.1	124777252	↑ 3,30fach
FCH-1814	A statt G	<i>STX7</i>	Exon	6q23.1-23.2	132447790	↑ 2,78fach
FCH-0332	G statt A	<i>INPP5D</i>	Exon	2q36-q37	232121233	↑ 2,77fach
FCH-2840	G statt A	<i>BLZF1</i>	Exon	1q24	166976535	↑ 2,59fach
FCH-1039	C statt T	<i>Q9NSQ0</i>	Exon	22q13.31	39574420	↑ 2,56fach
FCH-2031	A statt G	<i>Q96GB2</i>	Exon	13q14.2	50343350	↑ 2,51fach
FCH-1444	T statt G	<i>PABPC3</i>	Exon	13q11-q12	23650973	↑ 2,44fach
FCH-1863	A statt G	<i>SLC6A2</i>	Exon	16q12.2	46150757	↑ 2,44fach

FCH-0633	G statt C	<i>FBNI</i>	Intron	15q21.1	44339669	↑ 2,43fach
FCH-1407	C statt T	<i>C21ORF56</i>	Exon	21q22.3	44088022	↑ 2,19fach
FCH-2368	C statt T	<i>SLC6A5</i>	Exon	11p15.2-p15.1	21761092	↑ 2,13fach
FCH-1193	A statt G	<i>O95784</i>	Exon	19q13.1	41004065	↑ 2,07fach
FCH-0501	G statt A	<i>Q9NUS7</i>	Exon	17q21.33	48276367	↑ 1,92fach

↑ steigend

1.1.3 Polymorphismen mit Assoziationen in beiden Gruppen

Drei SNPs zeigten sowohl in der Gruppe der Männer als auch in der Gruppe der Frauen signifikante Unterschiede in ihrer Allelhäufigkeit und sind deshalb mit einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko vergesellschaftet (siehe nachfolgende Tabelle).

Tabelle 5: Polymorphismen mit Assoziationen bei Männern und Frauen

SNP	Polymorphismus	Gen	Exon/ Intron	Chromosom	Chrom. Position	Assoziiertes Risiko für Typ-2- Diabetes
FCH-2840	♀: G statt A	<i>BLZF1</i>	Exon	1q24	166976535	↑ 2,59fach
FCH-2840	♂: A statt G	<i>BLZF1</i>	Exon	1q24	166976535	↑ 7,14fach
FCH-2167	♀: A statt G	<i>FADD</i>	Exon	11q13.3	72381176	↑ 4,00fach
FCH-2167	♂: G statt A	<i>FADD</i>	Exon	11q13.3	72381176	↑ 5,33fach
FCH-1407	♀: C statt T	<i>C21ORF56</i>	Exon	21q22.3	44088022	↑ 2,19fach
FCH-1407	♂: T statt C	<i>C21ORF56</i>	Exon	21q22.3	44088022	↑ 2,63fach

↑ steigend

1.2 Individuell genotypisierte SNPs

Zur weiteren Analyse wurden fünf in Vorgängerstudien bei anderen Ethnien mit Typ-2-Diabetes assoziierte SNPs bzw. SNPs in Kandidatengenregionen herangezogen. Es wurden individuelle Genotypisierungen von allen 1.582 Studienteilnehmern für diese fünf SNPs durchgeführt. Die SNPs befinden sich in den Genen *PRAXI* auf Chromosom 17 in der Bande q22-q23 (FCH-0033), *PPP1R3A* auf Chromosom 7 in der Bande q11.23-q21.11 (FCH-0460), *GPXI* auf Chromosom 3 in der Bande p21.3 (FCH-0912) und *PPARG* auf Chromosom 3 in der Bande p25 (GP03_016992114 und FCH-2383), die potenzielle Kandidatengene für den Typ-2-Diabetes darstellen. Die Ergebnisse der individuellen Genotypisierung zeigt die nachfolgende Tabelle.

Tabelle 6: Resultate der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen

SNP	Geschlecht	Genotyp	Anzahl des selteneren Allels A2	Status	Absolute Häufigkeit
FCH-0033	f	CC	1	T2D	0
FCH-0033	f	CC	2	Kontrolle	5
FCH-0033	f	CT	1	T2D	45
FCH-0033	f	CT	1	Kontrolle	49
FCH-0033	f	TT	0	T2D	304
FCH-0033	f	TT	0	Kontrolle	328
FCH-0033	m	CC	2	T2D	3
FCH-0033	m	CC	2	Kontrolle	2
FCH-0033	m	CT	1	T2D	34
FCH-0033	m	CT	1	Kontrolle	45
FCH-0033	m	TT	0	T2D	314
FCH-0033	m	TT	0	Kontrolle	322
FCH-0460	f	GG	0	T2D	289
FCH-0460	f	GG	0	Kontrolle	327
FCH-0460	f	TG	1	T2D	59
FCH-0460	f	TG	1	Kontrolle	54
FCH-0460	f	TT	2	T2D	3
FCH-0460	f	TT	2	Kontrolle	2
FCH-0460	m	GG	0	T2D	297
FCH-0460	m	GG	0	Kontrolle	292
FCH-0460	m	TG	1	T2D	57
FCH-0460	m	TG	1	Kontrolle	69
FCH-0460	m	TT	2	T2D	3
FCH-0460	m	TT	2	Kontrolle	5
FCH-0912	f	CC	0	T2D	172
FCH-0912	f	CC	0	Kontrolle	191
FCH-0912	f	TC	1	T2D	142
FCH-0912	f	TC	1	Kontrolle	158
FCH-0912	f	TT	2	T2D	30
FCH-0912	f	TT	2	Kontrolle	27
FCH-0912	m	CC	0	T2D	171
FCH-0912	m	CC	0	Kontrolle	187
FCH-0912	m	TC	1	T2D	151
FCH-0912	m	TC	1	Kontrolle	159
FCH-0912	m	TT	2	T2D	32
FCH-0912	m	TT	2	Kontrolle	20
GP03_016992114	f	AA	2	T2D	3
GP03_016992114	f	AA	2	Kontrolle	7
GP03_016992114	f	AG	1	T2D	66

GP03_016992114	f	AG	1	Kontrolle	83
GP03_016992114	f	GG	0	T2D	279
GP03_016992114	f	GG	0	Kontrolle	291
GP03_016992114	m	AA	2	T2D	3
GP03_016992114	m	AA	2	Kontrolle	9
GP03_016992114	m	AG	1	T2D	67
GP03_016992114	m	AG	1	Kontrolle	83
GP03_016992114	m	GG	0	T2D	281
GP03_016992114	m	GG	0	Kontrolle	268
FCH-2383	f	CC	0	T2D	190
FCH-2383	f	CC	0	Kontrolle	151
FCH-2383	f	CG	1	T2D	45
FCH-2383	f	CG	1	Kontrolle	44
FCH-2383	f	GG	2	T2D	2
FCH-2383	f	GG	2	Kontrolle	2
FCH-2383	m	CC	0	T2D	203
FCH-2383	m	CC	0	Kontrolle	168
FCH-2383	m	CG	1	T2D	46
FCH-2383	m	CG	1	Kontrolle	50
FCH-2383	m	GG	2	T2D	3
FCH-2383	m	GG	2	Kontrolle	8

T2D:Typ-2-Diabetiker

Weibliche homozygote Studienteilnehmer (A1/A1 und A2/A2)

Tabelle 7: Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten weiblichen Studienteilnehmern (A1 oder A2)

SNP	odds ratio	95%-KI		p-Wert
		von	bis	
FCH-0033	0,098	0,001	0,870	0,035
FCH-0460	1,584	0,306	9,561	0,577
FCH-0912	1,231	0,707	2,154	0,462
GP03_016992114	0,487	0,012	1,654	0,254
FCH-2383	1,258	0,150	10,580	0,820

P-Werte <0,05 sind fett gedruckt. Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde 0,5 zu jedem Wert addiert. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Die Häufigkeiten der Genotypen im SNP FCH-0033 zeigten bei den Frauen ein signifikant unterschiedliches Ergebnis. Homozygote für das prozentual häufigere Allel (A1) T litten

10,2fach häufiger an Typ-2-Diabetes als Homozygote für das prozentual seltenere Allel (A2) C ($p = 0,0345$; OR = 0,098).

Die Genotypisierungsergebnisse der restlichen SNPs zeigten keine statistische Signifikanz.

Männliche homozygote Studienteilnehmer (A1/A1 und A2/A2)

Tabelle 8: Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten männlichen Studienteilnehmern (A1 oder A2)

SNP	odds ratio	95%-KI		p-Wert
		von	bis	
FCH-0033	1,436	0,278	8,664	0,662
FCH-0460	0,626	0,144	2,370	0,496
FCH-0912	1,733	0,967	3,170	0,065
GP03_016992114	0,351	0,087	1,121	0,078
FCH-2383	3,222	0,916	14,884	0,069

Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde 0,5 zu jedem Wert addiert.

Es ergaben sich bei den fünf SNPs keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der individuellen Genotypisierung.

Weibliche und männliche homozygote Studienteilnehmer (A1/A1 und A2/A2)

Tabelle 9: Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten Studienteilnehmern (A1 oder A2)

SNP	odds ratio	95%-KI		p-Wert
		von	bis	
FCH-0033	0,451	0,097	1,629	0,230
FCH-0460	0,905	0,290	2,741	0,859
FCH-0912	1,454	0,970	2,191	0,070
GP03_016992114	0,374	0,134	0,918	0,031
FCH-2383	2,464	0,866	7,976	0,092

P-Werte $<0,05$ sind fett gedruckt. Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde 0,5 zu jedem Wert addiert. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Beim Vergleich der Genotypisierungsergebnisse der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen, die homozygot für das prozentual häufigere Allel (A1) G bzw. selteneres Allel (A2) A sind, ergab sich beim SNP GP03_016992114 ein signifikanter Unterschied. Studienteilnehmer, die einen homozygoten Genotyp für das prozentual häufigere Allel (A1) G aufwiesen, litten 2,7fach häufiger an Typ-2-Diabetes ($p = 0,0311$; OR = 0,37).

Die Resultate der Genotypisierung der restlichen SNPs waren unterhalb des Signifikanzniveaus angesiedelt.

Weibliche homozygote (A1/A1) und heterozygote (A1/A2) Studienteilnehmer

Tabelle 10: Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten (A1) und heterozygoten weiblichen Studienteilnehmern

SNP	odds ratio	95%-KI		p-Wert
		von	bis	
FCH-0033	0,991	0,641	1,529	0,967
FCH-0460	1,236	0,827	1,850	0,300
FCH-0912	0,998	0,735	1,356	0,990
GP03_016992114	0,829	0,576	1,191	0,311
FCH-2383	1,230	0,770	1,965	0,385

Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde 0,5 zu jedem Wert addiert.

Es ergaben sich bei den fünf SNPs keine signifikanten Unterschiede in den Genotyphäufigkeiten.

Männliche homozygote (A1/A1) und heterozygote (A1/A2) Studienteilnehmer

Tabelle 11: Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten (A1) und heterozygoten männlichen Studienteilnehmern

SNP	odds ratio	95%-KI		p-Wert
		von	bis	
FCH-0033	0,775	0,481	1,239	0,287
FCH-0460	0,812	0,551	1,194	0,290
FCH-0912	1,039	0,766	1,408	0,808
GP03_016992114	0,770	0,534	1,106	0,157
FCH-2383	1,313	0,838	2,063	0,234

Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde 0,5 zu jedem Wert addiert.

Die Genotyphäufigkeiten unterschieden sich bezüglich der fünf SNPs nicht signifikant voneinander.

Weibliche und männliche homozygote (A1/A1) und heterozygote (A1/A2) Studienteilnehmer

Tabelle 12: Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten (A1) und heterozygoten Studienteilnehmern

SNP	odds ratio	95%-KI		p-Wert
		von	bis	
FCH-0033	0,884	0,642	1,216	0,448
FCH-0460	0,996	0,755	1,315	0,979
FCH-0912	1,019	0,821	1,264	0,867
GP03_016992114	0,800	0,618	1,034	0,087
FCH-2383	1,273	0,920	1,760	0,145

Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde 0,5 zu jedem Wert addiert.

Es ergaben sich bei den fünf SNPs keine signifikanten Unterschiede bei der Genotypisierung aller Studienteilnehmer.

2 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen

Die anamnestisch erhobenen Inzidenzen von Krebserkrankungen der Eltern der hier untersuchten Studiengruppen wurden statistisch ausgewertet.

2.1 Krebserkrankungen der Väter der Typ-2-Diabetiker und der Kontrollen

Eine Übersicht über die Krebserkrankungen bei den Vätern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen gibt die nachfolgende Tabelle.

Tabelle 13: Statistische Parameter der Krebserkrankungen bei Vätern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen

Art der Krebs- erkrankung	Väter der Diabetiker		Kontrollen		Konfidenzintervall	
	%	%	p	OR	von	bis
Basaliom	0,00	0,00	0,99	0,98	0	∞
Brust	0,00	0,00	0,99	0,98	0	∞
Harnblase	0,13	0,52	0,20	0,32	0,03	1,75
Hoden	0,38	0,26	0,70	1,37	0,27	8,23
Kolon u. Rektum	1,51	2,58	0,14	0,59	0,28	1,18
Larynx	0,50	0,52	0,97	0,98	0,25	3,79
Leber u. Gallen- wege	1,01	1,16	0,77	0,87	0,34	2,23
Leukämie	0,13	0,13	0,98	0,98	0,08	12,0
Lunge u. Bronch.	2,52	2,71	0,81	0,93	0,50	1,72
Magen	3,15	1,94	0,13	1,63	0,87	3,15
Melanom	0,00	0,26	0,22	0,19	0,001	2,40
M. Hodgkin	0,13	0,00	0,48	2,93	0,16	428
NHL	0,00	0,00	0,99	0,98	0	∞
Niere u. Nieren- becken	0,13	0,52	0,20	0,32	0,03	1,75
Ösophagus	0,13	0,26	0,60	0,58	0,05	4,41
Pankreas	0,88	0,13	0,039	4,92	1,07	46,7
Pharynx u. Mund- höhle	0,50	0,52	0,97	0,98	0,25	3,79
Prostata	1,39	2,97	0,032	0,47	0,22	0,94
Thyroidea	0,00	0,13	0,46	0,32	0,002	6,10
ZNS/PNS	0,63	0,39	0,53	1,54	0,41	6,65

P-Werte <0,05 sind fett gedruckt. Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde zu jedem Wert 0,5 addiert.

Ein signifikanter Unterschied ergab sich in der Häufigkeit der Pankreaskarzinome (95%-KI 1,07-46,7; $p = 0,039$; OR = 4,92). 0,88 % der Väter der Typ-2-Diabetiker wiesen ein Pankreaskarzinom auf. Bei den Vätern der Kontrollen lag der prozentuale Anteil bei 0,13 %.

Auch die Inzidenz des Prostatakarzinoms unterschied sich statistisch signifikant bei den Vätern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen (95%-KI 0,22-0,94; $p = 0,032$; OR = 0,47). Väter der Typ-2-Diabetiker zeigten mit 1,39 % weniger Prostatakarzinome als die der Kontrollen (2,97 %).

Alle anderen Krebserkrankungen der Väter der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Häufigkeit.

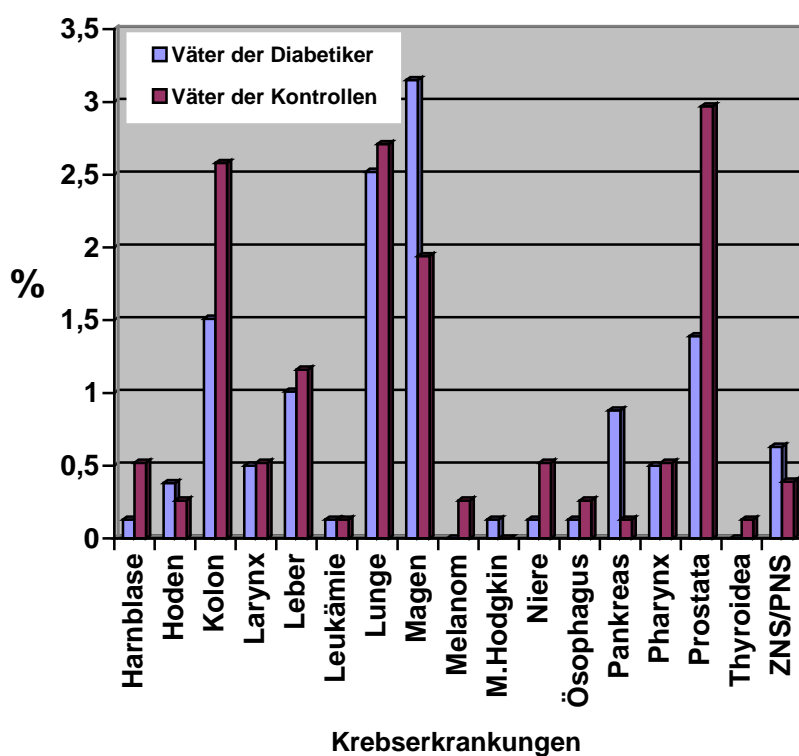


Abbildung 5: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Krebserkrankungen bei Vätern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen

2.2 Krebserkrankungen der Mütter der Typ-2-Diabetiker und der Kontrollen

Die anschließende Tabelle zeigt die Krebserkrankungen der Mütter der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen.

Tabelle 14: Statistische Parameter der Krebserkrankungen bei Müttern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen

Art der Krebs- erkrankung	Mütter der		p	OR	Konfidenzintervall	
	Diabetiker %	Kontrollen %			von	bis
Basaliom	0,13	0,00	0,48	2,92	0,16	426
Brust	3,65	4,15	0,61	0,88	0,53	1,46
Cervix uteri	0,13	0,91	0,033	0,19	0,02	0,88
Corpus uteri	3,40	1,95	0,08	1,75	0,94	3,36
Harnblase	0,25	0,00	0,24	4,87	0,40	672
Kolon u. Rektum	2,14	2,08	0,93	1,03	0,52	2,05
Larynx	0,25	0,00	0,24	4,87	0,40	672
Leukämie	0,76	0,78	0,96	0,97	0,32	2,97
Leber u. Gallen- wege	2,27	0,39	0,0009	5,23	1,87	19,87
Lunge u. Bronch.	0,76	0,52	0,58	1,41	0,42	5,10
Magen	2,14	0,52	0,005	3,84	1,47	12,42
Melanom	0,38	0,26	0,71	1,36	0,26	8,19
M. Hodgkin	0,13	0,00	0,48	2,92	0,16	426
Niere u. Nieren- becken	0,13	0,26	0,59	0,58	0,05	4,38
NHL	0,00	0,13	0,46	0,32	0,002	6,07
Ösophagus	0,13	0,00	0,48	2,92	0,16	426
Ovar	0,38	0,26	0,71	1,36	0,26	8,19
Pankreas	0,25	1,04	0,056	0,28	0,05	1,03
Pharynx u. Mund- höhle	0,00	0,00	0,99	0,98	0	∞
Thyroidea	0,25	0,00	0,24	4,87	0,40	672
ZNS/PNS	0,25	0,26	0,97	0,97	0,15	6,30

P-Werte <0,05 sind fett gedruckt. Um odds ratios bei vorhandenen 0-Werten berechnen zu können, wurde zu jedem Wert 0,5 addiert.

Mütter der Kontrollen litten zu 0,91 % an einem Karzinom der Cervix uteri. Bei den Müttern der Typ-2-Diabetiker lag der Anteil bei 0,13 % (95%-KI 0,02-0,88; p = 0,033; OR = 0,19).

Karzinome der Leber und ableitenden Gallenwege traten bei Müttern der Typ-2-Diabetiker mit 2,27 % häufiger auf. Bei 0,39 % der Mütter der Kontrollen lag diese Art der Krebserkrankung vor (95%-KI 1,87-19,9; $p = 0,0009$; OR = 5,23).

Magenkarzinome waren bei Müttern der Typ-2-Diabetiker mit 2,14 % gehäuft (95%-KI 1,47-12,4; $p = 0,005$; OR = 3,84) zu verzeichnen verglichen mit Müttern der Kontrollen (0,52 %).

Alle anderen Krebserkrankungen der Mütter der Typ-2-Diabetiker und der Kontrollen unterschieden sich statistisch nicht signifikant voneinander.

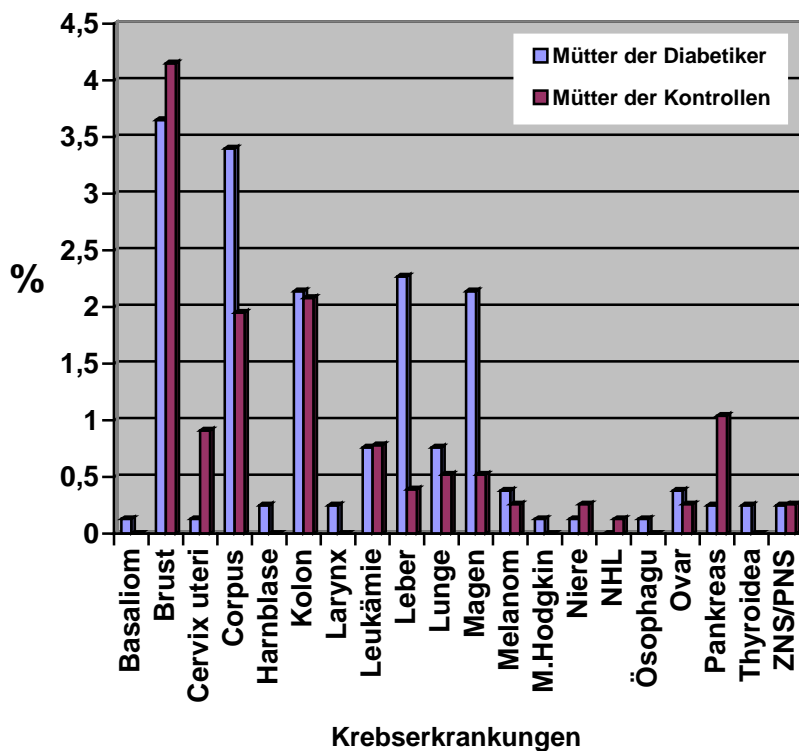


Abbildung 6: Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Krebserkrankungen bei Müttern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen

3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.1 Molekulargenetische Assoziationsstudie

Bei den Untersuchungen der DNA-Pools hinsichtlich 1.561 SNPs in der Männergruppe bzw. 1.559 SNPs bei den Frauen wurden in beiden Gruppen weniger signifikant unterschiedliche Allelhäufigkeiten beobachtet, als auf dem Signifikanzniveau von 5 % durch falsch positive Assoziationen zu erwarten gewesen wären.

Bei der Betrachtung der Ausreißer-SNPs mit einer sehr hohen bzw. niedrigen log odds ratio konnten in der Gruppe der Männer 5 SNPs und 20 SNPs bei den Frauen identifiziert werden, die mit einem höheren Typ-2-Diabetes-Risiko vergesellschaftet waren. 3 dieser Polymorphismen wurden sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen identifiziert, wobei interessanterweise jeweils der entgegengesetzte Genotyp mit dem erhöhten Krankheitsrisiko gekoppelt war.

Bei der individuellen Genotypisierung der weiblichen Studienteilnehmer ergab sich beim SNP FCH-0033 in *PRAX1* ein signifikanter Unterschied in den Genotyphäufigkeiten. Das prozentual häufiger vorkommende Allel (A1) T konnte mit einem 10,2fach erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes bei weiblichen Homozygoten assoziiert werden. Beim Vergleich der Genotyphäufigkeiten aller Studienteilnehmer zeigte der SNP GP03_016992114 in *PPARG* signifikante Unterschiede. Dabei konnte das prozentual häufiger vorkommende Allel (A1) G mit einem 2,7fach prädisponierenden Effekt für Typ-2-Diabetes bei Homozygoten assoziiert werden.

3.2 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen

Beim Vergleich der Krebserkrankungen, die bei den Vätern der Typ-2-Diabetiker bzw. Kontrollen auftraten, ergab sich beim Pankreas- und Prostatakarzinom ein signifikanter Unterschied. Die prozentuale Häufigkeit von Pankreaskarzinomen war bei Vätern der Typ-2-Diabetiker höher als bei den Vätern der Kontrollen, die von Prostatakarzinomen hingegen geringer.

Bei den Müttern der Typ-2-Diabetiker wurden anamnestisch signifikant mehr Karzinome der Leber und ableitenden Gallenwegen sowie vermehrt Magenkarzinome erhoben. Die Mütter der Kontrollen zeigten eine signifikant höhere Anzahl von Karzinomen der Cervix uteri.

Diskussion

1 Molekulargenetische Assoziationsstudie

Bei Fall-Kontroll-Studien setzt man voraus, dass sich die Patienten- und Kontrollgruppen möglichst nur in dem zu untersuchenden Merkmal unterscheiden. Hinsichtlich der Untersuchung genetischer Merkmale ist es deshalb zumindest notwendig, dass die Patienten und Kontrollen aus derselben ethnischen Bevölkerungsgruppe stammen (139). Aus diesem Grund wurden in unsere Studie nur Personen aufgenommen, die deutscher Abstammung waren. Dies wurde aus praktischen Gründen dadurch erreicht, dass nur Patienten eingeschlossen wurden, deren Eltern beide in Deutschland geboren waren.

1.1 Methodik

Die Genetik des Typ-2-Diabetes wurde in unserer Studie sowohl durch genomweit lokalisierte Polymorphismen als auch durch die Analyse von Kandidatengen untersucht. Für die genomweite Untersuchung wurden für die Männergruppe 1.561 und für die Frauen 1.559 SNPs herangezogen, die alle genbasiert waren. Als Kandidatengene wurden darüber hinaus fünf Polymorphismen ausgewählt, für die eine individuelle Genotypisierung jedes Studienteilnehmers durchgeführt wurde. Vorteilhaft am genomweiten Ansatz ist, dass auch Gene für den Typ-2-Diabetes entdeckt werden können, die aufgrund ihrer potenziellen Funktion nicht als Kandidatengen infrage gekommen wären oder über deren Funktion noch keine Aussagen gemacht werden können. Der Kandidatengenansatz führt im Allgemeinen jedoch zu einer höheren Anzahl signifikanter Ergebnisse, da gezielt für den Typ-2-Diabetes relevante Gene untersucht werden können.

Manche der hier identifizierten Polymorphismen mit einer Assoziation zum Typ-2-Diabetes könnten falsch positive Resultate darstellen. Deshalb müssen die von uns als signifikant mit Typ-2-Diabetes assoziierten SNPs in Folgestudien auf ihren Zusammenhang mit dieser Erkrankung in verschiedenen Populationen überprüft werden. In diversen Studien wurde jedoch deutlich, dass sich meist nur wenige der detektierten Assoziationen von SNPs mit einem Krankheitsphänotyp mit unabhängigem klinischen Material replizieren lassen. Dies kann auf ungenügend charakterisierten oder heterogenen Testpopulationen, an einer zu kleinen Anzahl von Probanden, populationsspezifischen Assoziationen oder unterschiedlichen statistischen

Analysemethoden beruhen (41). Fall-Kontroll-Studien sind nicht in der Lage, Gene aufzuspüren, die eine starke allelische Heterogenität aufweisen. Darunter versteht man, dass ein Gen durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Polymorphismen an der Entstehung von Krankheiten beteiligt ist. Vielmehr ist es aber mit der hier durchgeführten Studie möglich, häufige Polymorphismen zu identifizieren, die selbst ein Krankheitsrisiko modifizieren oder zumindest eine Kopplung zu einer funktionellen, häufigen genetischen Sequenzvariation anzeigen. Für die molekulargenetische Untersuchung von SNPs stehen mehrere technische Verfahren zur Verfügung. Davon sind im Bereich der Hochdurchsatz-Genotypisierung vor allem die MALDI-TOF-Massenspektrometrie, das Pyrosequencing-Verfahren, die DNA-Chip-Technologien auf der Basis immobilisierter SNP-spezifischer Primer/Sonden und die Taq-Man-Assays von Bedeutung. In dieser Studie wurde die MALDI-TOF-Massenspektrometrie angewandt (10;19). Die SNP-Genotypisierung mithilfe von Massenspektrometern bietet folgende Vorteile: die parallele Analyse vieler Patientenproben, die Genauigkeit, mit der Molekulargewichte von Nukleinsäuren bestimmt werden, die Geschwindigkeit der Analyse und die einfache Software-unterstützte Interpretation. Darüber hinaus kann auf die radioaktive Markierung der DNA-Bausteine verzichtet werden. Die hier angewandte Pooling-Strategie bedingt darüber hinaus, dass nur geringe Probenmengen erforderlich sind und die Probenverarbeitung und Massenspektrometrie vollständig automatisiert durchgeführt werden können. Nachteile dieser Methode sind, dass das zu analysierende DNA-Fragment nicht zu groß sein darf (<30 Basen), die Nachweisempfindlichkeit geringer ist als bei Fluoreszenzmethoden und die Kosten für die speziellen Geräte sehr hoch sind. Außerdem ist nachteilig, dass die zu analysierende DNA eine hohe Reinheit aufweisen muss.

1.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Assoziationsstudie in den DNA-Pools

In der Männer- bzw. Frauengruppe unterschieden sich weniger SNPs als die Fehlerrate von 5 % signifikant voneinander. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Vergleich zum gesamten Genom die hier ausgewählten 1.561 bzw. 1.559 Marker keine statistisch gesehen repräsentative Auswahl an für den Typ-2-Diabetes relevanten Polymorphismen darstellt. Die Ausreißer-SNPs mit sehr hohen bzw. niedrigen log odds ratios wurden der statistischen Methode von Benjamini und Hochberg unterzogen (14). Auf diese Weise konnten in der Männergruppe 5, bei den Frauen 20 hochsignifikante SNPs identifiziert werden. Die Gene, in denen sich die signifikanten Polymorphismen befinden, wurden in der Literatur bisher jedoch nicht mit Typ-2-Diabetes in Zusammenhang gebracht. In der folgenden Tabelle werden zu-

nächst die assoziierten Gene der Männergruppe und dann der Frauengruppe dargestellt, jeweils mit absteigendem Assoziationsfaktor. Am Ende der Tabelle sind die Gene mit Assoziationen in beiden Gruppen dargestellt. Anschließend folgt die Diskussion der Gene in der Reihenfolge der Tabelle.

Tabelle 15: Gene der signifikanten Ausreißer-SNPs bei Männern und Frauen

Gen	Assoziiertes Risiko für Typ-2-Diabetes in unserer Studie	Funktion des Gens und assoziierte Erkrankungen	Möglicher Zusammenhang mit Typ-2-Diabetes
<i>HLA-B</i>	♂ 4,35fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Leukozytenantigen • Malaria-Schutz • veränderte HIV-Immunantwort 	HLA-Assoziation wie beim Typ-1-Diabetes?
<i>F5</i>	♂ 2,56fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Blutgerinnungsfaktor • hämorrhag. Diathesen • Thrombosen 	unklar
<i>KIF4A</i>	♀ 8,33fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Organellen, Mikrotubuli • Zelltransport 	Transportstörung für Insulinvesikel?
<i>RBPSUH</i>	♀ 7,14fach ↑ ♀ 7,14fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Immunglobulinproduktion • Entwicklung des PNS bei der Drosophila 	Autoimmuner Diabetes?
<i>AVPR2</i>	♀ 5,00fach ↑	Diabetes insipidus	ähnlich DIDMOAD-Syndrom
<i>MFGE8</i>	♀ 4,78fach ↑	Faktor, der apoptotische Zellen mit Phagozyten verbindet	Veränderung von Apoptosemechanismen?
<i>CYP1B1</i>	♀ 4,73fach ↑	Glaukom	unklar
<i>ABL1</i>	♀ 3,30fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Zelldifferenzierung und -teilung • Phil.-Chrom. positive myeloische Leukämie 	<ul style="list-style-type: none"> • Viral veränderte Zellvorgänge in der β-Zelle? • Veränderung der Zelldifferenzierung?
<i>STX7</i>	♀ 2,78fach ↑	Vesikeltransport	Veränderung des Insulin-Vesikeltransports?
<i>INPP5D</i>	♀ 2,77fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Hämatopoese • Spermiogenese 	unklar
<i>Q9NSQ0</i>	♀ 2,56fach ↑	nicht näher charakterisiertes Protein	unklar
<i>Q96GB2</i>	♀ 2,51fach ↑	nicht näher charakterisiertes Protein	unklar
<i>PABPC3</i>	♀ 2,44fach ↑	mRNA-Stabilität und -Translation	unklar
<i>SLC6A2</i>	♀ 2,44fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Neurotransmitter-Transporter • psychiatrische Störungen • Anorexia nervosa 	<ul style="list-style-type: none"> • Störung des Transmittertransports der β-Zelle? • Auswirkungen auf diabetische Stoffwechsellage?
<i>FBN1</i>	♀ 2,43fach ↑	Marfan-Syndrom	unklar

<i>SLC6A5</i>	♀ 2,13fach ↑	Glyzintransporter im ZNS	unklar
<i>O95784</i>	♀ 2,07fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • IgG fc-bindendes Protein • kolorektale Erkrankungen 	Autoimmuner Diabetes?
<i>Q9NUS7</i>	♀ 1,92fach ↑	nicht näher charakterisiertes Protein	unklar
<i>BLZF1</i>	♂ 7,14fach ↑ ♀ 2,59fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Zellreifung • Transkriptionsfaktor • akute promyelozytische Leukämie 	Veränderung des Zellwachstums oder der Zellreifung
<i>FADD</i>	♂ 5,33fach ↑ ♀ 4,00fach ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Adapterprotein bei Apoptose • T-Zell-Entwicklung • bei Krebserkrankungen amplifiziert 	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptose → Insulinsekretionsstörung? • T-Zellen → autoimmuner Diabetes?
<i>C21ORF56</i>	♂ 2,63fach ↑ ♀ 2,19fach ↑	nicht näher charakterisiertes Protein	unklar

Wir konnten ein 4,35fach erhöhtes Risiko für Typ-2-Diabetes bei Männern assoziieren, die den Polymorphismus T statt C im Exon an der chromosomalen Position 31377941 im Gen **HLA-B** (MIM# 142830 (113); Major Histocompatibility Complex, Class I, B) aufwiesen. Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 6 in der Bande p21.3. Zwischen diesem Genort (HLA-B53) und dem Schutz vor schwerer Malaria scheint ein Zusammenhang zu bestehen (71). HLA-B-Allele (HLA-B35) üben auch einen Effekt auf die Immunantwort bei einer HIV-1-Infektionen aus (52). HLA-Genorte konnten mit Typ-1-Diabetes assoziiert werden, vornehmlich DR3 und DR4 (146). Die für den Typ-1-Diabetes relevanten Genorte scheinen beim Typ-2-Diabetes jedoch keine Hauptsuszeptibilitätsgene darzustellen (3;21;38;50).

Der Polymorphismus A statt G an der chromosomalen Position 167140404 in einem Exon des Gens **F5** (MIM # 227400 (113); Factor V Deficiency) konnte bei Männern mit einem 2,56fach gesteigerten Risiko für Typ-2-Diabetes assoziiert werden. Faktor V exprimiert nicht nur koagulatorische Eigenschaften infolge seiner Aktivierung durch Thrombin, sondern spielt auch eine Rolle im antikoagulatorischen System als Kofaktor für das aktivierte Protein C. Diesen beiden Funktionen zugrunde liegend konnten Mutationen im *F5* auf Chromosom 1 in der Bande q23 nicht nur mit hämorrhagischen Diathesen (148), subduralen Hämatomen bei Neugeborenen (37) und fulminanter Purpura (76), sondern auch mit einem erhöhten Thromboserisiko (APC resistance) in Verbindung gebracht werden (15;143). Dabei führte die Abwesenheit oder Dysfunktion des aktivierten Faktors V zur hämorrhagischen Diathese. Die exzessive Persistenz der aktivierten Form hingegen war mit Thrombose assoziiert. Ein Zu-

sammenhang mit Typ-2-Diabetes lässt sich aus der bisherigen Charakterisierung dieses Proteins nicht herstellen. Jedoch befindet sich das Gen *F5* in einer Kandidatengenregion (1q21-24) für den Typ-2-Diabetes, die mittels Kopplungsanalysen identifiziert wurde (3).

Frauen mit der kodierenden C- statt G-Variante an der chromosomalen Position 65817941 des Gens *KIF4A* ((153); Kinesin Family Member 4A) auf Chromosom Xq13.1 zeigten in unserer Studie eine Assoziation mit einem 8,33fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko. Das Produkt dieses X-chromosomalen Gens ist das Protein FLJ20207, das seine Funktion in membranösen Organellen und Mikrotubuli auszuüben und ein Motorprotein für den Zelltransport darzustellen scheint (56;164). Aufgrund der Rolle von *KIF4A* für den Zelltransport könnten Mutationen in diesem Gen z. B. den Insulinvesikeltransport beeinträchtigen. Laut der SWALL-Datenbank (<http://srs.sanger.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz>) wird *KIF4A* in hohem Maße in hämatopoetischen Zellen, in der fetalen Leber, Milz, im Thymus und im Knochenmark exprimiert. Eine geringere Expression dieses Gens konnte in Geweben des Herzens, Hodens, in der Niere, im Kolon und in der Lunge gezeigt werden. Im Pankreas scheint *KIF4A* jedoch nicht exprimiert zu werden.

Wir konnten zwei Polymorphismen, C statt G an der chromosomalen Position 26581347 und T statt C an der chromosomalen Position 26582154, beide in Exons des Gens *RBPSUH* ((153); Recombining binding protein suppressor of hairless (Drosophila)), mit einem 7,14fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen in Verbindung bringen. Dieses Gen auf Chromosom 9 in der Bande p13-p12 wird auch als human Jk recombination signal binding protein gene (*IGKJRB1*) bezeichnet. Das menschliche Genom enthält ein funktionelles *IGKJRB*-Gen und 2 Typen prozessierter Pseudogene (5;144). *RBPSUH* spielt wahrscheinlich bei der Rekombination der DNA (V-, D-, J-Segmente) für die Immunglobulinproduktion eine Rolle. Eine weitere mögliche Funktion dieses Gens leitet sich daraus ab, dass das von ihm kodierte RBP-Jk-Protein bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems von Drosophila beteiligt ist. Da Immunglobuline eine wichtige Funktion bei autoimmunen Diabetesformen einnehmen, ist eine Rolle dieses Gens für die Entstehung eines Diabetes insofern denkbar, dass Polymorphismen in *RBPSUH* eine Autoantikörperproduktion gegen pankreatische Inselzellantigene initiieren könnten.

Die Variation T statt C an der chromosomalen Position 147308949 des Gens *AVPR2* (MIM# 304800 (113); Arginine vasopressin receptor 2, auch *ARHGAP4* genannt) ist in dieser Studie

bei Frauen mit einem 5fach erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes vergesellschaftet. Dieses X-chromosomale Gen in der Bande q28 kodiert verschiedene Rho-GTPase aktivierende Proteine und zeigt eine enge Kopplung an das Vasopressin 2 Rezeptor-Gen (V2), das die renale Wasserreabsorption reguliert (46). Verschiedene Mutationen im *AVPR2* konnten mit Diabetes insipidus renalis in Verbindung gebracht werden (23). Dass Gene existieren, die gleichzeitig zu Diabetes insipidus und Diabetes mellitus prädisponieren, wird anhand des DIDMOAD-Syndroms deutlich (11). Dieses Syndrom wird durch Mutationen im Wolframin-Gen verursacht, das für ein Transmembran-Protein kodiert, welches in verschiedenen Geweben, unter anderem auch im Pankreas, exprimiert wird (141). Das Wolframin-Gen scheint einen pleiotropen Effekt sowohl auf das Überleben der pankreatischen β -Zellen (8) als auch auf die renale Wasserreabsorption auszuüben.

Ein Polymorphismus, der Austausch von A anstelle C an der chromosomalen Position 85795781 im Gen *MFGE8* (MIM # 602281 (113); Milk Fat Globule-EGF Factor 8), war bei Frauen mit einem 4,78fach erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes vergesellschaftet. *MFGE8* auf Chromosom 15 in der Bande q25 kodiert einen Faktor, der apoptotische Zellen mit Phagozyten verbindet (58). Dieser Faktor wird von aktivierten Makrophagen sezerniert, bindet über verschiedene Mediatoren an apoptotische Zellen und transportiert sie zu Phagozyten, die diese Zellen lysieren. Es ist denkbar, dass hier durch den vorliegenden kodierenden Polymorphismus Apoptosewege verändert werden. Dies könnte zur Entstehung des Typ-2-Diabetes beitragen.

Bei unseren Studienteilnehmerinnen konnte der kodierende Polymorphismus G statt T an der chromosomalen Position 38267021 des Gens *CYP1B1* (MIM# 601771 (113); Cytochrome P450, Subfamiliy I, Polypeptide 1) mit einem 4,73fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko in Verbindung gebracht werden. Mutationen in diesem Gen auf Chromosom 2 in der Bande p22-p21 wurden bisher bei verschiedenen Glaukom-Varianten, aber noch nicht beim Typ-2-Diabetes beschrieben (151).

Bei Frauen konnte in unserer Studie ein 3,3fach erhöhtes Typ-2-Diabetes-Risiko mit dem Polymorphismus C statt T an der chromosomalen Position 124777252 (Exon) im Gen *ABL1* (MIM# 189980 (113); Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1) assoziiert werden. Dieses Protoonkogen auf Chromosom 9 in der Bande q34.1 kodiert eine zytoplasmatische und nukleäre Tyrosinkinase, die bei der Zelldifferenzierung, der Zellteilung, der Zell-

adhäsion und der Antwort auf Stressreize beteiligt ist. Veränderungen von *ABL1* durch chromosomale Strukturänderungen oder virale Transduktion führen zu maligner Transformation, was beispielsweise bei der chronischen myeloischen Leukämie beobachtet werden konnte (29). Die Assoziation mit Typ-2-Diabetes könnte durch viral induzierte veränderte Zellvorgänge erklärbar sein, da eine Reihe viraler Erkrankungen mit einem erhöhten Diabetesrisiko, jedoch vornehmlich Typ-1, assoziiert werden konnten. Auch Veränderungen in der Zelldifferenzierung der pankreatischen β -Zelle durch Variationen in *ABL1* könnten zu Typ-2-Diabetes prädisponieren.

Der SNP A statt G im Syntaxin 7 Gen (*STX7*) (MIM # 603217 (113)) an der chromosomalen Position 132447790 war mit einem 2,78fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen assoziiert. Dieses Gen liegt auf dem Chromosom 6 in der Bande q23.1-23.2 (154). *STX7* kodiert für Syntaxine, die Rezeptoren auf zellulären Zielmembranen darstellen, welche durch Interaktionen mit Vesikelproteinen den Vesikeltransport spezifizieren. Es wäre möglich, dass der hier beschriebene kodierende Polymorphismus Protein-Funktionsvarianten verursacht, die am Insulin-Vesikeltransport angreifen und auf diese Weise zur Entstehung eines Typ-2-Diabetes beitragen.

In unserer Studie zeigten Frauen mit der Variation G statt A im Exon an der chromosomalen Position 232121233 im Gen *INPP5D* (MIM # 601582 (113); Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase, auch *SHIP* genannt) eine 2,77fach erhöhte Assoziation mit dem Typ-2-Diabetes. Dieses Gen auf Chromosom 2 in der Bande q36-q37 kodiert für die SH2-Containing Inositol Phosphatase (SHIP), die eine Rolle bei der Hämatopoese und Spermiogenese spielt (96).

Der C- statt T-Polymorphismus an der chromosomalen Position 39574420 des Gens *Q9NSQ0* (17) war mit einem 2,56fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen unserer Studie assoziiert. Dieser kodierende Polymorphismus im Gen *Q9NSQ0* ist auf Chromosom 22 in der Bande q13.31 lokalisiert. Es wird ein bisher in seiner Funktion noch unbekanntes Protein als Genprodukt angenommen.

Das Gen *Q96GB2* (17) könnte ein Kandidatengen für den Typ-2-Diabetes darstellen, da wir ein 2,51fach erhöhtes Risiko für Typ-2-Diabetes bei Frauen mit dem SNP A statt G in einem Exon dieses Gens an der chromosomalen Position 50343350 assoziieren konnten. Das aus

Plazentagewebe isolierte Gen befindet sich auf Chromosom 13 in der Bande q14.2 und kodiert das hypothetische, nicht näher definierte Protein FLJ13639 (164).

Wir konnten einen Zusammenhang zwischen einem 2,44fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen und dem SNP T statt G an der chromosomalen Position 23650973 in einem Exon des Gens **PABPC3** (MIM# 604680 (113); Polyadenylate-binding protein, cytoplasmic, 3) aufzeigen. Messenger-RNA-Stabilität und -Translation werden durch Poly(A)-bindende Proteine (PABP) kontrolliert. Bisher konnte zur Funktion dieses auf Chromosom 13 in der Bande q11-q12 liegenden Gens gezeigt werden, dass in vitro translatiertes PABPC3 RNA-Homopolymere binden kann (43).

Die Variante A statt G im Exon an der chromosomalen Position 46150757 des Gens **SLC6A2** (MIM# 163970 (113); Solute Carrier Family 6, Member 2) konnte als risikoreich (2,44fach) für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes bei Frauen assoziiert werden. Dieses Gen, auch **NET1** genannt und auf Chromosom 16 in der Bande q12.2 lokalisiert, kodiert einen Neurotransmitter-Transporter für Noradrenalin (115). Es ist folglich ein Kandidatengen für psychiatrische Störungen wie z. B. die manisch-depressive Erkrankung. Eine Relevanz dieses Transporters für den Insulin-Vesikeltransport würde einen möglichen Zusammenhang mit Typ-2-Diabetes aufzeigen. NET1 scheint als genetische Komponente bei der Anorexia nervosa involviert zu sein (149). Aus dieser den Stoffwechsel betreffenden Funktion ließe sich möglicherweise eine potenzielle Bedeutung für den Typ-2-Diabetes ableiten.

Der von uns beobachtete Zusammenhang zwischen dem intronischen Polymorphismus G statt C an der chromosomalen Position 44339669 im Gen **FBNI** (MIM# 134797 (113); Fibrillin 1) und einem 2,43fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen ist noch unklar. Mutationen in diesem Gen auf Chromosom 15 in Bande q21.1, das für Fibrillin kodiert, konnten als Hauptursache für das Marfan-Syndrom identifiziert werden (33).

Anhand unserer Ergebnisse ist bei Vorliegen des SNPs C statt T an der chromosomalen Position 21761092, einem Exon des Gens **SLC6A5** (MIM# 604159 (113); Solute Carrier Family 6, Member 5, auch **GLYT2** genannt), von einem assoziierten, 2,13fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen auszugehen. Das Gen auf Chromosom 11 in der Bande p15.2-p15.1 kodiert für den Glyzintransporter GlyT2, der an Synapsen hauptsächlich in der Medul-

la, aber auch im Rückenmark und Zerebellum von Bedeutung ist (107). Ein funktioneller Zusammenhang dieses Gens mit Typ-2-Diabetes ist unklar.

In unserer Untersuchung war die Variation A statt G im Exon an der chromosomalen Position 41004065 im Gen **O95784** (17), auch *FCGBP* genannt, mit einem 2,07fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko bei Frauen vergesellschaftet. Das 22 Exons umfassende Gen befindet sich auf Chromosom 19 in der Bande q13.1. Es kodiert ein IgG-Fc-bindendes Protein (Fragment), das Aufgaben im Bereich des Immunsystems und der Entzündung im Intestinum wahrzunehmen scheint (63). Es wurde festgestellt, dass mRNA von *FCGBP* in der Plazenta und in epithelialen Zellen des Kolons exprimiert wird. Die Struktur des Proteins ähnelt dem Muzinprotein MUC 2 und dieses Protein könnte deshalb eine vor Oxidation schützende Komponente des Mukus darstellen. Polymorphismen in *FCGBP* könnten mit kolorektalen Erkrankungen in Zusammenhang stehen (63). Da dieses Gen für das Immunsystem und die Immunglobuline (IgG) relevant ist, könnten autoimmune Diabetesformen durch *O95784* bestimmt werden.

Für das Gen **Q9NUS7** (17) konnten wir ein 1,92fach erhöhtes Risiko für Typ-2-Diabetes bei Frauen annehmen, wenn der kodierende Polymorphismus G statt A in diesem Gen an der chromosomalen Position 48276367 vorlag. Das Genprodukt des auf Chromosom 17 in der Bande q21.33 aus Plazentagewebe isolierten Gens ist das noch nicht näher charakterisierte Protein FLJ11164 (164).

Wir stellten fest, dass in der Männergruppe der Polymorphismus A statt G an der chromosomalen Position 166976535 (Exon) des Gens **BLZF1** ((153); Basic leucine zipper nuclear factor 1) mit einem 7,14fach erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko in Zusammenhang steht. Bei Frauen war allerdings das G-Allel dieses SNPs mit einer 2,59fach assoziierten Steigerung des Typ-2-Diabetes-Risikos verbunden. *BLZF1* wird auch *JEM-1* genannt. Dieses Gen liegt auf Chromosom 1 in der Bande q24 und ist somit in der gleichen Kandidatengenregion (3) wie das Gen *F5* lokalisiert. Das von ihm kodierte Kernprotein könnte als Transkriptionsfaktor oder Koregulator bei der Kontrolle des Zellwachstums und/oder der Zellreifung beteiligt sein (147). Eine veränderte Expression dieses Gens wurde bei der akuten promyelozytischen Leukämie gezeigt (36). Eine Assoziation dieses Gens mit Typ-2-Diabetes könnte z. B. auf Veränderungen des Zellwachstums oder der Zellreifung beruhen.

In unserer Studie konnte bei männlichen Studienteilnehmern ein 5,33fach erhöhtes Typ-2-Diabetes-Risiko mit dem Vorliegen eines G statt A an der chromosomalen Position 72381176 des Gens *FADD* (MIM# 602457 (113); FAS-associated via Death Domain) auf Chromosom 11 in der Bande q13.3 assoziiert werden. Bei Frauen stellte A das risikoassoziierte Allel dar (4fache Risikoerhöhung). Dieser Polymorphismus liegt in einem der beiden Exons von *FADD*. *FADD* ist ein universelles Adapterprotein bei der Apoptose, welches das Signal der TNF-Rezeptor-Superfamilie übermittelt (81). Anhand von Tierstudien wurde deutlich, dass *FADD* bei der proliferativen Phase der frühen T-Zell-Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (81). Die chromosomale Region dieses Gens ist bei vielen menschlichen Krebserkrankungen, z. B. in Brustkrebs-Zelllinien, amplifiziert (83). Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von *FADD* in Zellen des Brustdrüsengewebes Apoptose induziert (24). Folglich wäre denkbar, dass der oben beschriebene kodierende Polymorphismus in *FADD* über eine Veränderung von zellulären Apoptosemechanismen zu einer Insulinsekretionsstörung im Pankreas führt. Außerdem spielen die T-Zellen bei autoimmunen Formen des Diabetes eine wichtige Rolle.

Ein 2,63fach erhöhtes Typ-2-Diabetes-Risiko bei Männern konnte mit dem kodierenden Polymorphismus T statt C an der chromosomalen Position 44088022 des Gens *C21ORF56* ((17); *DKFZp434N0650*) in Verbindung gebracht werden. Bei Frauen stieg das Typ-2-Diabetes-Risiko 2,19fach an, war aber mit dem C-Allel assoziiert. *C21ORF56* kodiert für ein in seiner Funktion nicht bekanntes Protein und liegt auf dem Chromosom 21 in der Bande q22.3 (67). Die bisher identifizierten Hauptsuszeptibilitätsloki für den Typ-2-Diabetes lagen nicht auf dem Chromosom 21.

Zwar stehen die in unserer Studie mit einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko assoziierten Gene laut Literatur in keiner klaren Assoziation mit Typ-2-Diabetes, jedoch sind etliche SNPs in Genen lokalisiert, die für unbekannte Proteine kodieren oder für Proteine, die bisher nur mit Funktionen im Zellstoffwechsel und nicht mit bestimmten Krankheitsphänotypen in Verbindung gebracht werden konnten. Replikationsstudien sind nötig, um die Rolle dieser Gene für den Typ-2-Diabetes zu bestätigen. Drei SNPs in den Genen *C21ORF56*, *FADD* und *BLZF1* zeigten sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen signifikante Ergebnisse. Das mit den Polymorphismen dieser Gene vergesellschaftete Typ-2-Diabetes-Risiko war bei Männern und Frauen jedoch jeweils mit dem anderen Allel assoziiert. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Interaktion mit geschlechtsspezifischen Genprodukten, z. B. Hormonen,

welche die Risikoerhöhung bei dem jeweiligen Allel in einem unterschiedlichen Maß beeinflussen können. Auffällig ist außerdem, dass zwei Polymorphismen (FCH-2045 und 2415), die in verschiedenen chromosomalen Positionen des Gens *RBPSUH* lokalisiert waren, beide bei Frauen signifikant mit einem erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes assoziiert werden konnten. Da beide Polymorphismen im kompletten Kopplungsungleichgewicht lagen, ist es weniger wahrscheinlich, dass es sich um einen falsch positive Effekt handelt. *RBPSUH* stellt deshalb zumindest bei Frauen ein interessantes Kandidatengen für den Typ-2-Diabetes dar.

1.3 Ergebnisse aus der individuellen Genotypisierung einzelner Polymorphismen

Fünf SNPs in Kandidatengenregionen wurden individuell bei jedem Studienteilnehmer genotypisiert. Diese Polymorphismen befinden sich in den Genen *PRAX1* (FCH-0033), *PPP1R3A* (FCH-0460), *GPXI* (FCH-0912) und *PPARG* (GP03_016992114 und FCH-2383). Die fünf Polymorphismen und die entsprechenden Kandidatengene sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt und werden anschließend diskutiert.

Tabelle 16: Gene der individuell genotypisierten SNPs

Gen	Assoziiertes Risiko für Typ-2-Diabetes in unserer Studie	Genfunktion und bisher assoziierte Erkrankungen
<i>PRAX1</i>	♀ 10,2fach ↑ für T	<ul style="list-style-type: none"> • peripherer Benzodiazepin-Rezeptor • neuropsychiatrische Störungen
<i>PPP1R3A</i>	-	<ul style="list-style-type: none"> • Glykogenstoffwechsel • Typ-2-Diabetes und Adipositas
<i>GPXI</i>	-	<ul style="list-style-type: none"> • Glutathion-Peroxidase • hämolytische Anämien
<i>PPARG intronisch, Pro12Ala</i>	♀+♂ 2,7fach ↑ für G -	<ul style="list-style-type: none"> • Transkriptionsfaktor • Typ-2-Diabetes, Insulinresistenzsyndrom, Adipositas

Der SNP FCH-0033 liegt auf dem Chromosom 17 in der Bande q22-q23 und in der chromosomalen Position 56133857. Dieser Polymorphismus befindet sich in einem Exon des 1.736 Basenpaare umfassenden Gens *PRAX1*, das auch *KIAA0612* oder *BZRAP1* genannt wird. Dieses Gen kodiert für PRAX-1 (peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1), ein zytoplasmatisches und mitochondriales Protein, das spezifisch mit dem peripheren Benzodiazepin-Rezeptor interagiert (51). *PRAX1* wird hauptsächlich im ZNS, der Hypophyse und im Thymus exprimiert. Es kann als ein Adapterprotein angesehen werden, welches verschiedene

Zielsubstanzen in die Umgebung des Rezeptors bringt. Der periphere Benzodiazepin-Rezeptor erfüllt unter anderem folgende Aufgaben: Funktionen beim Zellwachstum, bei der zellulären Signalkaskade und der Zelldifferenzierung. PRAX-1 enthält drei prolinreiche Domänen, drei Leucinzipper und eine SH3-ähnliche Domäne. Die prolinreichen Domänen und die SH3-ähnlichen Domänen sind für die Bindung dieses Proteins an den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor essenziell. SH3-Domänen sind kleine Proteinmoleküle, die ca. 50 Aminosäuren umfassen und bei einer großen Anzahl von intrazellulären, membranassoziierten, zytoskelettalen Proteinen und Proteinen mit Enzymaktivität gefunden werden (102;121). Die Funktion der SH3-Domänen ist noch unklar, aber sie könnten Prozesse wie z. B. die Erhöhung der lokalen Konzentration von Proteinen, die Veränderung der subzellulären Proteinlokalisierung und die Zusammenfügung großer Multiproteinkomplexe vermitteln (108). Da eine Expression von *PRAX1* im mesolimbischen System der Ratte identifiziert werden konnte, sind neuropsychiatrische Störungen wie Demenz, Schizophrenie und affektive Störungen als mögliche mit diesem Gen assoziierte Erkrankungen anzusehen. Ein Locus für die hereditäre degenerative Demenz wurde auch der Region q22 des Chromosom 17 zugeschrieben (16). Das *PRAX1*-Gen stellt jedoch auch ein mögliches Kandidatengen für den Typ-2-Diabetes bzw. das metabolische Syndrom dar. Der periphere Benzodiazepin-Rezeptor ist am intramitochondrialen Cholesteroltransport für die Steroidbiosynthese beteiligt und scheint auf diese Weise mit den klinischen Ausprägungen des metabolischen Syndroms zu interagieren. Durch seine enge Kopplung mit den Mitochondrien und seine mitochondriale Lokalisation werden dem peripheren Benzodiazepin-Rezeptor auch Aufgaben in der Apoptoseregulation und im Antioxidanzienmetabolismus, der bei Typ-2-Diabetikern signifikante Änderungen zeigt, zugeschrieben. Aus diesen Gründen wurde in dieser Studie eine individuelle Genotypisierung eines SNPs in *PRAX1* durchgeführt. Dieser SNP in *PRAX1* kann in einer homozygoten Form für C, homozygot für T oder heterozygot vorliegen. T ist als das prozentual häufiger vorkommende Allel (A1) anzusehen. Wurden jeweils die genotypisch homozygoten Typ-2-Diabetikerinnen mit den homozygoten weiblichen Kontrollen in ihrem Genotyp verglichen, ergab sich ein signifikanter Unterschied: Es konnte ein 10,2fach erhöhtes Typ-2-Diabetes-Risiko bei Vorliegen des prozentual häufigeren Allels (A1) T errechnet werden. Die funktionellen Auswirkungen dieses SNPs sind noch unbekannt. In der Literatur sind bisher keine Assoziationen von Polymorphismen in *PRAX1* mit Typ-2-Diabetes beschrieben worden. Unser Ergebnis konnte jedoch zeigen, dass *PRAX1* durchaus ein Gen ist, dessen mögliche Rolle beim Typ-2-Diabetes Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

Zusätzlich wurde der SNP FCH-0460 für eine individuelle Genotypisierung herangezogen. Dieser Polymorphismus liegt in einem der vier Exons an der chromosomalen Position 111996293 des 44,66 Kilobasen umfassenden Gens *PPP1R3A* (MIM# 600917(113), Protein Phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A), welches für die regulatorische Untereinheit 3A der glykogen-assoziierten Form der Protein Phosphatase 1 kodiert. Das Gen liegt auf Chromosom 7 im Bereich q11.23-q21.11. Die glykogenassoziierte Form der Protein Phosphatase 1 (PP1), die vor allem im Skelettmuskel lokalisiert ist, ist ein Heterodimer, bestehend aus einer katalytischen und regulatorischen Untereinheit (PP1G). Die regulatorische Untereinheit bindet mit hoher Affinität an Muskelglykogen und erhöht so die Dephosphorylierung von glykogengebundenen Substraten für die Protein Phosphatase 1. Aufgrund eines Insulinreizes findet eine Phosphorylierung an Ser46 der regulatorischen Untereinheit statt, wodurch die Aktivität der PP1 erhöht wird. Phosphorylierung an Ser46 aufgrund eines Adrenalinstimulus führt zur Dissoziation der katalytischen von der regulatorischen Untereinheit und inhibiert die Glykogensynthese. Aufgrund dieser Funktionen liegt nahe, dass *PPP1R3A* an der Entstehung von Typ-2-Diabetes und Adipositas beteiligt sein kann. Bisher konnte eine Familie europäischer Herkunft identifiziert werden, deren Familienmitglieder an schwerer Insulinresistenz litten und die heterozygote Frameshift- bzw. vorzeitige Stopp-Mutationen in beiden voneinander unabhängigen Genen *PPP1R3A* und *PPARG* aufwiesen (130). Die hier aufgezeigte Koinkidenz von funktionell wirksamen Mutationen in zwei verschiedenen Genen könnte ein Modell für modifizierte Interaktion von Proteinen darstellen, die metabolischen Erkrankungen wie dem Typ-2-Diabetes zugrunde liegen können. Außerdem konnte in einer anderen Studie der häufige Asp905Tyr-Polymorphismus in *PPP1R3A* mit Insulinresistenz assoziiert werden. Hierdurch könnte die große Variation in der insulinstimulierten Glykogensynthese bei Kaukasiern erklärt werden (60). Diese Variante schien auch mit der Entstehung einer Adipositas zu interagieren und eine Hypersekretion von Insulin nach Glukosegabe zu produzieren. Als Indikator für das Typ-2-Diabetes-Risiko war der Asp905Tyr-Polymorphismus jedoch nicht signifikant (60). Des Weiteren wurde ein häufiger 5bp Insertion/Deletions-Polymorphismus in einem mRNA-stabilisierenden AU(AT)-reichen Element innerhalb des 3' untranslatierten Bereiches (3'-UTR) des *PPP1R3A*-Gens untersucht. Dieser Polymorphismus war signifikant mit einem veränderten 2-Stunden-postprandialen Glukosewert bei kanadischen Ureinwohnern (Oji-Cree) mit Typ-2-Diabetes oder verminderter Glukosetoleranz assoziiert (69). Oji-Cree, die homozygot für das Deletionsallel waren, wiesen signifikant niedrigere 2-Stunden-postprandiale Plasmaglukosespiegel auf als Patienten mit anderen Genotypen. In unserer Studie ergab der Vergleich der Genotypen des SNPs der chromosomalen Position 111996293

von *PPP1R3A* weder bei homozygoten noch bei heterozygoten Typ-2-Diabetikern bzw. Kontrollen für das häufigere T- oder G-Allel einen signifikanten Unterschied. Eine mögliche Ursache, warum in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes und diesem Polymorphismus des Gens *PPP1R3A* ermittelt werden konnte, liegt in der Heterogenität der Erkrankung. Unterschiedliche Bevölkerungen weisen verschiedene Suszeptibilitätsgene oder Genkombinationen auf, die zu Typ-2-Diabetes prädisponieren. Folglich können Variationen im *PPP1R3A*-Gen existieren, die zwar in anderen Populationen, aber nicht bei unseren Studienteilnehmern das Typ-2-Diabetes-Risiko beeinflussen. Außerdem ist denkbar, dass nicht alle Polymorphismen in *PPP1R3A* für den Typ-2-Diabetes relevant sind und dass gerade dieser hier analysierte Polymorphismus für den Typ-2-Diabetes keine Bedeutung hat.

Auch der SNP FCH-0912 wurde individuell genotypisiert. Er liegt in einer Downstream-Region des Gens *GPX-1* (MIM# 138320 (113) Glutathion Peroxidase) auf Chromosom 3 in der Bande p21.3. Der Polymorphismus ist in der chromosomalen Position 48737066 lokalisiert. Die von *GPX-1* kodierte Glutathion-Peroxidase schützt Zellen vor oxidativen Stressoren und Neurone vor Peroxiden (28). Veränderte Plasmaspiegel der Glutathion-Peroxidase konnten bei Patienten mit hämolytischen Anämien beobachtet werden (116). Ein GCG-Trinukleotid-Polymorphismus in *GPXI* bzw. Homozygotie für das 6 Repeats umfassende Allel konnte mit humanen myeloischen Leukämie-Zelllinien assoziiert werden (135). Die Glutathion-Peroxidase spielt als Antioxidans jedoch auch beim Typ-2-Diabetes eine Rolle und ist deshalb als Kandidatengen für den Typ-2-Diabetes in Betracht zu ziehen. In Erythrozyten konnte bei Typ-2-Diabetikern mit mikrovaskulären Komplikationen eine reduzierte Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Vergleich zu anderen Typ-2-Diabetikern nachgewiesen werden (82). Im Vergleich zu diabetesfreien Kontrollen war die Plasma-Glutathion-Peroxidase-Aktivität bei Typ-2-Diabetikern in einer weiteren Studien signifikant erniedrigt (118). Dies macht die Imbalance zwischen Plasmaoxidanzien und Antioxidanzien bei Typ-2-Diabetikern deutlich. Auch in Leukozyten wurde eine reduzierte Glutathion-Peroxidase-Aktivität bei Typ-2-Diabetikern beobachtet; eine mögliche Erklärung für erhöhte Infektionsraten bei Typ-2-Diabetikern (109). Ein kausaler Zusammenhang zwischen Plasma-Spiegeln dieses Enzyms und der Insulinsekretionsstörung der pankreatischen β -Zellen bei Typ-2-Diabetikern ist denkbar. Der in unserer Studie analysierte Polymorphismus in *GPX-1* weist das prozentual häufiger vorkommende Allel (A1) C oder das seltenere Allel (A2) T auf. Die Genotyphäufigkeiten dieses SNPs zeigten jedoch weder bei der Berücksichtigung noch bei der Vernachlässigung des Geschlechts der Studienteilnehmer einen signifikanten Unterschied

zwischen den Gruppen. Aus diesem Grund scheint *GPX-1* für den Typ-2-Diabetes in unserer Population keine entscheidende Rolle zu spielen.

Der SNP GP03_016992114 befindet sich in einem Intron und der SNP FCH-2383 in einem Exon des mit Typ-2-Diabetes assoziierten Gens *PPARG* (MIM# 601487 (113)). Das Gen liegt auf Chromosom 3, in der Bande p25. Beide SNPs sind 1.715 Basenpaare voneinander entfernt. Der SNP GP03_016992114 befindet sich in der chromosomalen Position 12324141 und der SNP FCH-2383 in der Position 12322426. *PPARG* enthält 9 Exons und umfasst mehr als 100 kb. Es kodiert für den Peroxisomen-Proliferation-Aktivierten Rezeptor Gamma. Die Peroxisomen-Proliferation-Aktivierten Rezeptoren stellen nukleäre Transkriptionsfaktoren dar und regulieren die Transkription verschiedener Gene. Es gibt drei Subtypen von PPAR, nämlich PPAR-alpha, PPAR-delta und PPAR-gamma. *PPARG* scheint bei der Differenzierung von Adipozyten involviert zu sein und ist auch in Adipozyten in hohen Levels exprimiert (39). Ein häufiger kodierender Polymorphismus in *PPARG* ist die Pro12Ala-Substitution im Codon 12, in dieser Studie der SNP FCH-2383 (163). Bei zwei kaukasischen Kohorten war die Pro12Ala-Mutation bzw. das Alanin-Allel mit einem höheren BMI assoziiert (13). Das Alanin-Allel konnte jedoch auch mit einem erniedrigten BMI und verbesserter Insulinsensitivität in einer finnischen Population assoziiert werden (30). Eine signifikante odds ratio für die Assoziation des Prolin/Prolin-Genotyps mit Typ-2-Diabetes wurde bei Amerikanern japanischer Herkunft beobachtet (30). In einer weiteren Studie konnte ein signifikanter Anstieg des Typ-2-Diabetes-Risikos auch mit dem häufigeren Prolin-Allel vergesellschaftet werden (4). Bei kanadischen Oji-Cree hingegen war das Alanin-Allel stark mit Typ-2-Diabetes bei Frauen assoziiert. Bei weiblichen Trägern des Alanin-Allels wurde ein signifikant früheres Einsetzen des Typ-2-Diabetes beobachtet (68). Bei Koreanern konnte der Pro12Ala-Polymorphismus weder mit Typ-2-Diabetes noch mit Adipositas assoziiert werden (112). In einer Metaanalyse konnte die Assoziation zwischen Typ-2-Diabetes und dem Pro12Ala-Polymorphismus bestätigt werden. Dabei wurde eine Typ-2-Diabetesresistenz mit dem Alanin-Allel und eine Anfälligkeit für Typ-2-Diabetes mit dem Prolin-Allel assoziiert (97). Der Pro12Ala-Polymorphismus war auch mit dem Insulinresistenzsyndrom vergesellschaftet (66). Bei Dänen schien Homozygotie des Alanin-Allels mit einem reduzierten Risiko für das Insulinresistenzsyndrom verbunden zu sein (49). Des Weiteren wurden zwei verschiedene heterozygote Mutationen in der ligandenbindenden Domäne von *PPARG* (Pro467Leu und Val290Met) bei drei Personen mit schwerer Insulinresistenz beschrieben (12). In unserer Studie wurde zusätzlich zum Pro12Ala-Polymorphismus ein intronischer Polymorphismus in *PPARG* analysiert,

über den noch keine Daten in der Literatur vorliegen. Die beiden möglichen Basen dieses Polymorphismus an der chromosomalen Position 12324141 sind A oder G, wobei G das prozentual häufigere Allel (A1) darstellt. Beim Vergleich der Typ-2-Diabetiker mit den Kontrollen ohne Berücksichtigung des Geschlechts gab es bei diesem SNP ein signifikantes Ergebnis: Bei Typ-2-Diabetikern und Kontrollen, die homozygot für die prozentual häufigeren Allele (A1) G bzw. homozygot für die prozentual selteneren Allele (A2) A sind, ergab sich bei einem p-Wert von 0,0311 ein 2,7fach erhöhtes Typ-2-Diabetes-Risiko des prozentual häufigeren Allels (A1) G. Bei der individuellen Genotypisierung des Pro12Ala-Polymorphismus zeigte sich kein signifikantes Ergebnis, jedoch ein Trend in dieselbe Richtung wie beim intronischen SNP in diesem Gen. Der SNP in einem nichtkodierenden Bereich zeigt ein Kopplungsungleichgewicht zum Pro12Ala-Polymorphismus an. Er kann möglicherweise selbst funktionelle Auswirkung haben, wenn er in einem regulatorischen Bereich des Gens (Enhancer, Promotor oder Ähnliches) liegt.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Gene der in dieser Studie signifikant mit Typ-2-Diabetes assoziierten SNPs und bisherige wichtige Typ-2-Diabetes-Kandidatengene grafisch dargestellt. Übereinstimmungen zwischen den Typ-2-Diabetes-relevanten Genen in unserer Studie und bisherigen Kandidatengenegen sind in roter Farbe hervorgehoben. Die weiteren in unserer Studie identifizierten Assoziationen sind schwarz dargestellt.

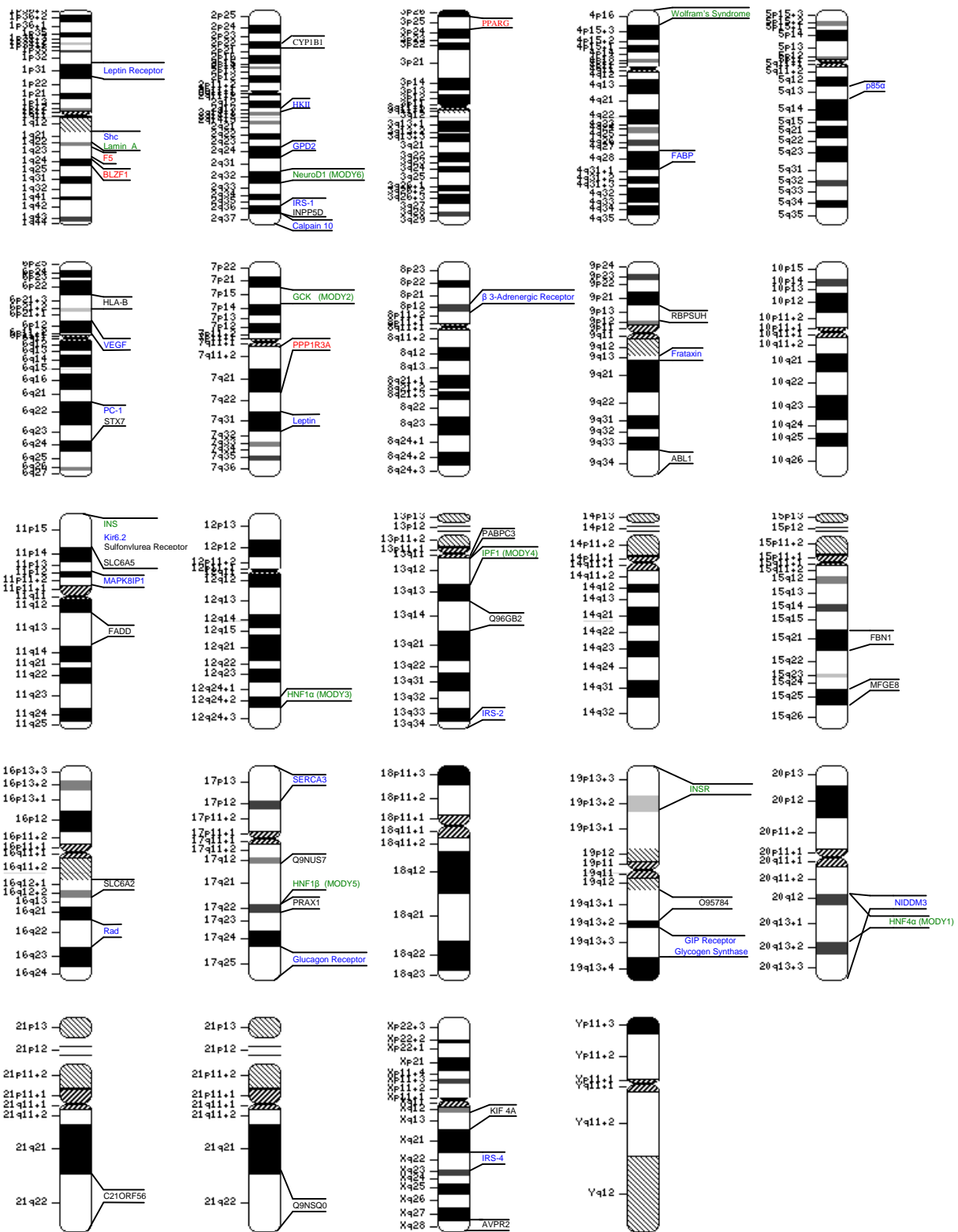


Abbildung 7: Lokalisation von Typ-2-Diabetes-Kandidatengenen

- Gene monogener Diabeteserkrankungen (grün)
- Kandidatengene für den Typ-2-Diabetes (blau)
- mit anderen Studienergebnissen übereinstimmende Assoziationen unserer Studie (rot)
- weitere in unserer Studie identifizierte Assoziationen (schwarz)

2 Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen

Ein Ziel der Studie war, zu ermitteln, ob Eltern von Typ-2-Diabetes-Patienten im Vergleich zu Eltern der Kontrollkollektive unterschiedliche Krebsinzidenzen aufweisen.

Die meisten Krebserkrankungen zeigen in diversen Studien bei Typ-2-Diabetikern höhere Prävalenzen. Jedoch scheint es zwischen Prostatakarzinomen und Typ-2-Diabetes eine negative Assoziation zu geben, die in manchen (128;157), aber nicht in allen Untersuchungen (145) festgestellt werden konnte. Es wurde die Anamnese der Eltern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen hinsichtlich Krebserkrankungen erhoben. Da erstgradig Verwandte, hier Typ-2-Diabetes-Patienten und ihre Eltern, 50 % identisches Erbgut aufweisen, lässt die Betrachtung der elterlichen Krebserkrankungen auch Rückschlüsse auf eventuelle gemeinsame genetische Risikofaktoren für Krebserkrankungen und Typ-2-Diabetes zu.

Kritisch betrachtet werden muss, dass unsere Kontrollgruppe im Durchschnitt ca. 14 Jahre jünger als die Patientengruppe war. Erhöhte Krebsinzidenzen bei den Eltern der hier untersuchten Diabetes-Studiengruppen sind deshalb, wenn überhaupt, im Zusammenhang mit bereits gemachten Beobachtungen anderer Studien zu bewerten. Diese erhöhten Krebsinzidenzen wurden bei den Müttern der Typ-2-Diabetiker bei Krebserkrankungen der Leber und ableitenden Gallenwege und beim Magenkrebs beobachtet. Bei den Vätern der Typ-2-Diabetiker war die Inzidenz von Pankreaskarzinomen signifikant erhöht.

Für Krebserkrankungen der Leber und ableitenden Gallenwege waren in der Literatur schon höhere Prävalenzen bei Typ-2-Diabetikern beschrieben worden (1;145). Wir können dies nun auch für Mütter von Typ-2-Diabetikern bestätigen. Die kausalen Mechanismen für ein erhöhtes Leberkrebsrisiko bei Typ-2-Diabetikern bzw. deren Mütter sind unklar. Bisher konnte ein erhöhter Alkoholkonsum als gemeinsamer Risikofaktor für Typ-2-Diabetes und Leberkrebs erhoben werden (9;31;145). Es ist möglich, dass die Leber von Personen mit einer genetischen Typ-2-Diabetes-Prädisposition Änderungen im Fettstoffwechsel erfährt, die zu Nekrose und Zirrhose führen können (137;155). Dies kann die Zellproliferation stimulieren, was wiederum den Prozess der Leberkarzinogenese fördert (124). Krebserkrankungen der ableitenden Gallenwege konnten bei Frauen mit Adipositas und zentralem Fettverteilungstyp assoziiert werden. Dies könnte darauf beruhen, dass bei Fettleibigen kanzerogene Risikofaktoren wie Gallensteine, hohe Cholesterinspiegel in der Gallenflüssigkeit und hohe endogene Östrogen-

spiegel gehäuft vorliegen (160). Weil Adipositas mit Typ-2-Diabetes assoziiert ist, könnte der erhöhte Anteil an Krebserkrankungen der Gallenwege auf diese Weise erklärt werden. Es wird angenommen, dass Adipositas und Typ-2-Diabetes teilweise durch dieselben Gene beeinflusst werden. Dieser zu Adipositas und Typ-2-Diabetes prädisponierende genetische Hintergrund könnte folglich für die erhöhte Zahl an Gallenwegskarzinomen bei den Müttern der Typ-2-Diabetiker verantwortlich sein.

Das Verhältnis zwischen Magenkrebs und Typ-2-Diabetes ist weitgehend unbekannt. In einer Fall-Kontroll-Studie zu Typ-2-Diabetes und dem Risiko für verschiedene Krebserkrankungen war kein erhöhtes Magenkrebsrisiko festgestellt worden (90). Calpain-10 konnte jedoch kürzlich als Suszeptibilitätsgen für den Typ-2-Diabetes identifiziert werden (72), während Calpain 9 ein Suppressor für Magenkrebs zu sein scheint (74). Veränderungen in dieser Genfamilie könnten sowohl das Risiko für Typ-2-Diabetes als auch für Magenkrebs erhöhen. Damit ließe sich z. B. erklären, warum die gesteigerte Magenkrebsprävalenz bei den Müttern der Typ-2-Diabetiker im Vergleich zu den Müttern der Kontrollen signifikant erhöht war.

Der Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes und Pankreaskarzinomen ist der Gegenstand zahlreicher Studien, da beide Erkrankungen dasselbe Organ betreffen. Es wird kontrovers diskutiert, ob Typ-2-Diabetes einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms darstellt, oder ob Typ-2-Diabetes als eine frühe Manifestation dieser Krebserkrankung anzusehen ist (44). Bei den Vätern der Typ-2-Diabetiker wurden in unserer Studie höhere Inzidenzen des Pankreaskarzinoms beobachtet, was in anderen Untersuchungen auch schon bei Typ-2-Diabetikern gezeigt werden konnte (26;42). Dies legt nahe, dass Typ-2-Diabetes über seine genetische Grundlage ein Risiko für Pankreaskarzinome darstellt. Man geht aufgrund diverser Studien davon aus, dass Typ-2-Diabetes vor allem ein Risikofaktor für ein Pankreaskarzinom darstellt, wenn der Typ-2-Diabetes länger als 5 Jahre besteht. Typ-2-Diabetes könnte dabei aufgrund von Veränderungen im Insulinspiegel (Hyperinsulinämie) und von gastrointestinalen Hormonlevel, die auch genetisch determiniert sein könnten, die Pankreaskarzinom-Entstehung fördern. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass Insulin das Wachstum von isolierten menschlichen Pankreaszellen *in vitro* induziert (45). Solche hyperplastischen Veränderungen treten in Inselzellen auf, wenn der endokrine Pankreasteil versucht, die bei insulinresistenten Typ-2-Diabetikern benötigten erhöhten Insulinmengen bereitzustellen. Dieser Zustand könnte den Pankreas anfälliger für hormonale Veränderungen, die mit Typ-2-Diabetes assoziiert sind, und für Karzinogene machen.

Signifikant niedrigere Krebsinzidenzen bei den im Durchschnitt älteren Eltern der Typ-2-Diabetiker sind in Hinsicht auf die im Allgemeinen mit zunehmendem Alter steigende Anzahl an Krebsfällen besonders auffällig. Diese erniedrigten Krebsinzidenzen wurden bei den Müttern der Typ-2-Diabetiker beim Cervixkarzinom und bei den Vätern der Typ-2-Diabetiker beim Pankreaskarzinom aufgezeigt.

Die signifikant niedrigeren Inzidenzen von Krebserkrankungen der Cervix uteri bei Müttern der Typ-2-Diabetiker legen einen Schutz von Typ-2-Diabetes vor Cervixkarzinomen nahe, was jedoch in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Im Gegensatz dazu konnte in wenigen Studien sogar eine positive Assoziation zwischen Typ-2-Diabetes und Cervixkarzinomen festgestellt werden (165;166). Die meisten Studien gehen jedoch davon aus, dass Typ-2-Diabetiker ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome, nicht für Cervixkarzinome, besitzen (2;6). Unsere Ergebnisse sind wegen des höheren Alters der Mütter der Typ-2-Diabetiker im Vergleich zu den Müttern der Kontrollen eher als besonders zuverlässig zu werten.

In unserer Studie litten die Väter der Typ-2-Diabetiker zu einem geringeren Teil an Prostatakarzinomen. Weil das Alter der Patienten im Durchschnitt 14,3 Jahre über dem Alter der Kontrollen lag, wären aufgrund des Altersunterschieds bei den Eltern der Patienten tendenziell höhere Inzidenzen für Prostatakarzinome zu erwarten gewesen. Die Aussagekraft niedriger Inzidenzen beim Prostatakarzinom von Vätern der Typ-2-Diabetiker ist deshalb als besonders relevant zu werten. Ein reduziertes Risiko für Prostatakarzinome bei Typ-2-Diabetikern war auch in verschiedenen anderen Studien beschrieben worden (128;157). Der mögliche Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes und Prostatakarzinomen stellt sich wie folgt dar: Typ-2-Diabetes geht mit einer Insulinresistenz am peripheren Gewebe und kompensatorischer Hyperinsulinämie einher. Erhöhte Insulinspiegel erniedrigen die Konzentrationen der IGF-bindenden Proteine 1 und 2 und reduzieren die Plasmakonzentration von IGF-1 (79). Insulin verringert auch die hepatische Synthese und den Plasmaspiegel von SHBG, was bei Männern zu einer Reduktion des zirkulierenden Testosterons führt (80). Epidemiologische und klinische Beobachtungen zeigen, dass IGF-1 und Androgene das Wachstum von Prostatakarzinomen fördern können (18;25). Bei Männern, die eine für den Typ-2-Diabetes typische Adipositas und chronische Hyperinsulinämie aufweisen, liegen folglich erniedrigte Testosteron-, Östrogen- und IGF-1-Konzentrationen im Plasma vor, wodurch ein Wachstumsreiz auf die Prostatazellen wegfällt. In Hinblick auf diese durch Typ-2-Diabetes hervorgerufenen Veränderungen im endogenen Hormonmetabolismus erscheint eine Reduktion des Prostatakarzinom-

Risikos bei Diabetikern und deren Vätern biologisch plausibel. Als genetischer Faktor, der sowohl das Typ-2-Diabetes- als auch das Prostatakarzinom-Risiko beeinflussen könnte, kommt das Gen *PPARG* in Betracht. Genetische Variationen im *PPARG*, vor allem der Pro12Ala-Polymorphismus, konnten mit einer erhöhten Inzidenz von Typ-2-Diabetes assoziiert werden (4;68). Zusätzlich wurde gezeigt, dass *PPARG* in menschlichen Prostatakarzinom-Zelllinien exprimiert wird (110). Dabei übt die Aktivierung dieses Rezeptors einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Zelllinien des Prostatakarzinoms aus.

Obwohl bei der statistischen Auswertung der Krebsanamnesen eine multiple Testung vorlag, musste keine Alpha-Adjustierung durchgeführt werden. Dies ist daraus abzuleiten, dass der Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes und Prostatakarzinomen im Vordergrund stand und die restlichen Ergebnisse als rein deskriptiv zu betrachten sind.

3 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Polymorphismen in den Genen *HLA-B*, *F5*, *KIF4A*, *RBPSUH*, *AVPR2*, *MFGE8*, *CYP11B1*, *ABLI*, *STX7*, *INPP5D*, *Q9NSQ0*, *Q96GB2*, *PABPC3*, *SLC6A2*, *FBN1*, *SLC6A5*, *O95784*, *Q9NUS7*, *BLZF1*, *FADD* und *C21ORF56* zeigten in unserer Studie eine Assoziation mit Typ-2-Diabetes. Drei dieser Gene (*FADD*, *BLZF1* und *C21ORF56*) scheinen für den Typ-2-Diabetes besonders relevant zu sein, da deren SNPs sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern ein signifikantes Resultat zeigten. Insofern gelang eine Replikation der Ergebnisse innerhalb der untersuchten Populationen. Im Gen *RBPSUH* wurden zwei Polymorphismen analysiert, die beide signifikant mit Typ-2-Diabetes assoziiert waren. Auch hier scheinen falsch positive Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Die Rolle der Gene *PRAX1* und *PPARG* als mögliche Kandidatengene für den Typ-2-Diabetes konnte durch die individuelle Genotypisierung in unserer Studie bestätigt werden. Das Gen *GPXI* kam durch unsere Ergebnisse bei der individuellen Genotypisierung nicht als Suszeptibilitätsgen für den Typ-2-Diabetes in Betracht. Der individuell genotypisierte Polymorphismus im Gen *PPP1R3A* zeigte in unserer Studie keinen Zusammenhang mit Typ-2-Diabetes, obwohl mehrere Polymorphismen in diesem Gen in anderen Studien bereits eine Assoziation gezeigt hatten. Aus diesem Grund scheinen nicht alle Polymorphismen oder nur in einer bestimmten Ethnie vorliegende Polymorphismen in *PPP1R3A* für den Typ-2-Diabetes relevant zu sein.

Bei den durchschnittlich älteren Eltern der Typ-2-Diabetiker sind erhöhte Krebserkrankungen in der Anamnese beschränkt aussagekräftig. Dies gilt für die bei den Eltern der Typ-2-Diabetiker erhöhten Zahlen des Karzinoms der Leber und ableitenden Gallenwege, des Magenkarzinoms und des Pankreaskarzinoms. Hier konnten jedoch die bereits vorliegenden Daten über erhöhte Inzidenzen bei Typ-2-Diabetes-Patienten selbst unterstützt werden. Niedrigere Inzidenzen von Krebserkrankungen bei den Eltern der Typ-2-Diabetiker sind zuverlässig interpretierbar. Väter bzw. Mütter von Typ-2-Diabetes-Patienten erkrankten seltener an Prostatakarzinomen bzw. bösartigen Tumoren der Cervix. Diese Beobachtung wurde bisher lediglich, allerdings auch kontrovers, bei Typ-2-Diabetikern selbst gemacht. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Gene an der Assoziation zwischen einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko und niedrigeren Inzidenzen für Prostata- und Cervixkarzinomen beteiligt sind.

4 Ausblick

Die molekulargenetische Forschung steht am Anfang eines Prozesses, in dem neue Medikamente für die beforschte Erkrankung entwickelt werden sollen. Dabei dient die Identifikation an der Erkrankung beteiligter Gene der Charakterisierung von Proteinen oder Targets, die möglicherweise pharmakologisch beeinflusst werden können.

Die Identifizierung von signifikant mit Typ-2-Diabetes assoziierten SNPs in dieser Studie stellt eine Grundlage für eine Reihe von Folgeuntersuchungen zur Validierung dieser Polymorphismen dar. Notwendig erscheint, Untersuchungen in gleichen und unterschiedlichen ethnischen Populationen zur Überprüfung der Ergebnisse durchzuführen. Die Replikation der assoziierten Polymorphismen in derselben ethnischen Studienpopulation würde die Möglichkeit, dass SNPs falsch positiv assoziiert wurden, ausschließen. Die Untersuchung der Polymorphismen in anderen ethnischen Bevölkerungen könnte zeigen, ob die SNPs populationspezifisch sind, d. h., ob sie nur in einer bestimmten Bevölkerungsgruppe mit einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko assoziiert sind. Es war in zahlreichen Untersuchungen der Fall, dass klare Assoziationen eines SNPs mit dem Typ-2-Diabetes in anderen Ethnien nicht repliziert werden konnten. Die durch unsere Untersuchungen für den Typ-2-Diabetes ins Interesse gerückten chromosomalen Genorte müssen darüber hinaus durch ein dichteres Netz an SNPs in diesen Regionen untersucht werden. Es könnte außerdem untersucht werden, ob die in dieser Studie identifizierten Gene in für den Typ-2-Diabetes relevanten Geweben, wie Adipozyten oder pankreatischen β -Zellen, hoch- bzw. herunterreguliert sind. Des Weiteren wäre es sinnvoll, diese Gene gezielt an Knock-out-Organismen, z. B. Mäusen, zu untersuchen. Dabei sollten phänotypische Merkmale dieser Tiere, die einen induzierten Defekt in diesen Genen aufweisen, analysiert und eine etwaige Übereinstimmung mit Typ-2-Diabetes oder assoziierten Erkrankungen festgestellt werden. Weiterhin könnte getestet werden, ob die hier identifizierten Polymorphismen in Subtypen des Typ-2-Diabetes, z. B. bei Patienten mit bestimmten Folgeerkrankungen, stärkere Assoziationen aufweisen als in den Gesamtkollektiven. Interessant wäre auch, eine genotypische Substratifizierung durchzuführen. Dabei würde man Typ-2-Diabetiker mit dem risiko-assoziierten Allel Typ-2-Diabetikern mit dem nicht-assoziierten zweiten Allel gegenüberstellen und z. B. genomweit analysieren. Dadurch könnten möglicherweise weitere Gene identifiziert werden, die an einem erhöhten Typ-2-Diabetes-Risiko mitbeteiligt sind.

Mit dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass Väter von Patientinnen und Patienten mit Typ-2-Diabetes signifikant seltener an Prostatakarzinomen erkrankt waren. Mütter dieser Patienten waren weniger häufig an Cervixkarzinomen erkrankt. Dieser Zusammenhang deutet auf genetische Faktoren hin, die in einem Netzwerk aus Genen, Proteinwirkungen und Umweltfaktoren einerseits für Typ-2-Diabetes prädisponieren, andererseits aber Krebs-Risiken senken. Solche Beobachtungen sollten dazu motivieren, die biologischen Funktionen vielschichtig zu sehen, und beim Eingreifen in diese komplexen Netzwerke, z. B. durch Wirkstoffe, im Auge zu behalten, dass damit zunächst unerwartete Effekte in ganz anderen Organsystemen oder Stoffwechselwegen bzw. Funktionen des Körpers nicht unwahrscheinlich sind.

Zusammenfassung

Der Typ-2-Diabetes wird als multifaktorielles Krankheitsbild durch die Interaktion von erblichen Merkmalen mit diversen Risikofaktoren hervorgerufen. Während Risikofaktoren wie beispielsweise Adipositas, Bewegungsmangel und Nikotinabusus weitgehend aufgeklärt sind, liegt die komplexe Genetik dieser Erkrankung noch weitgehend im Dunkeln, da bisher nur wenige und dann überwiegend bevölkerungsspezifische Suszeptibilitätsgene identifiziert werden konnten. Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Identifikation bisher unbekannter mit Typ-2-Diabetes vergesellschafteter molekulargenetischer Marker und die Überprüfung der Relevanz von Polymorphismen in bereits bekannten Typ-2-Diabetes-Kandidatengenen in unserer Population.

Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie wurde eine Typ-2-Diabetesgruppe und eine Kontrollgruppe aus Blutspendern zusammengestellt. Zur Untersuchung erblicher Faktoren für den Typ-2-Diabetes wurden ca. 1.560 genomweit verteilte Polymorphismen herangezogen. Außerdem wurden fünf Polymorphismen in Typ-2-Diabetes-spezifischen Kandidatengenregionen individuell genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie, wobei zum einen vier DNA-Pools gebildet und zum anderen individuelle DNA-Proben der Studienteilnehmer verwendet wurden.

Bei der Untersuchung der erblichen Faktoren für den Typ-2-Diabetes konnten aus den genomweit verteilten ca. 1.560 SNPs bei den Frauen 20 und bei den Männern 5 Polymorphismen signifikant mit Typ-2-Diabetes assoziiert werden. Diese SNPs liegen in den bisher noch nicht mit Typ-2-Diabetes in Zusammenhang gesehenen Genen *HLA-B*, *F5*, *KIF4A*, *RBPSUH*, *AVPR2*, *MFGES*, *CYP1B1*, *ABL1*, *STX7*, *INPP5D*, *Q9NSQ0*, *Q96GB2*, *PABPC3*, *SLC6A2*, *FBN1*, *SLC6A5*, *O95784*, *Q9NUS7*, *BLZF1*, *FADD*, *C21ORF56*. Für drei dieser SNPs, die in den Genen *FADD*, *BLZF1* und *C21ORF56* lagen, sind falsch positive Ergebnisse unwahrscheinlich, weil sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern signifikante Ergebnisse vorliegen. Falsch positive Effekte sind auch beim Gen *RBPSUH* unwahrscheinlich, da hier beide analysierten SNPs bei weiblichen Studienteilnehmern eine statistische Signifikanz aufwiesen.

An einer Auswahl von fünf Polymorphismen wurde getestet, ob bisher beschriebene Typ-2-Diabetes-Kandidatengene auch in unserer Population mit einem erhöhten Risiko für diese Erkrankung vergesellschaftet sind. Bei der individuellen Genotypisierung dieser SNPs identi-

fizierten wir Assoziationen in den Genen *PRAX1* und *PPARG*. Beim Gen *PRAX1* war das häufiger vorkommende T-Allel (A1) mit einem 10,2fachen Risiko bei Frauen mit Typ-2-Diabetes assoziiert. Das prozentual häufigere G-Allel (A1) des 1.715 Basenpaare vom Pro12Ala-Polymorphismus entfernten intronischen SNPs des Gens *PPARG* zeigte ein 2,7fach mit Typ-2-Diabetes assoziiertes Risiko unabhängig vom Geschlecht. *PRAX1* und *PPARG* konnten somit als Kandidatengene für den Typ-2-Diabetes bestätigt werden.

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Aspekt war der Zusammenhang zwischen Typ-2-Diabetes und Krebserkrankungen. Bei Typ-2-Diabetikern wurden in mehreren Studien erhöhte Raten an vielen verschiedenen Krebserkrankungen beobachtet. Zum Teil konnte aber auch ein protektiver Effekt des Typ-2-Diabetes auf bestimmte Krebserkrankungen nachgewiesen werden. Dabei könnten erbliche Faktoren eine bedeutsame Rolle zu spielen. Dieser Zusammenhang sollte durch die Untersuchung der Krebsinzidenzen der Eltern der hier untersuchten, vergleichsweise großen Patienten- und Kontrollkollektiven weiter aufgeklärt werden. Mithilfe anamnestischer Angaben wurde festgestellt, ob in der Gruppe der Eltern der Typ-2-Diabetes-Patienten unterschiedliche Inzidenzen von Krebserkrankungen nachweisbar waren. Da die Gruppe der Typ-2-Diabetiker bei Aufnahme in die Studie im Durchschnitt ca. 14 Jahre älter war, wurden höhere Krebsinzidenzen in der Gruppe deren Eltern in dieser Studie lediglich beschrieben, aber nicht weiter interpretiert. Dagegen sind die erniedrigten Prävalenzen von Cervixkarzinomen bei den Müttern und Prostatakarzinomen bei Vätern der Typ-2-Diabetiker besonders zuverlässig interpretierbar. Der scheinbar protektive Effekt des Typ-2-Diabetes auf die Entstehung von Cervixkarzinomen ist dabei eine neue Erkenntnis, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Väter von Patientinnen und Patienten mit Typ-2 Diabetes seltener an Prostatakarzinomen erkrankten. Bekannt war, dass Typ-2-Diabetiker selbst seltener an diesem bösartigen Tumor litten. Unsere Daten legen deshalb nahe, dass auch erbliche Faktoren an diesem scheinbar protektiven Effekt der Typ-2-Diabetes-Erkrankung auf das Prostatakarzinom beteiligt sind.

Anhang

1 Literaturverzeichnis

1. Adami,HO, Chow,WH, Nyren,O, Berne,C, Linet,MS, Ekblom,A, Wolk,A, McLaughlin,JK, Fraumeni,JF, Jr.: Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *J.Natl.Cancer Inst.* 88:1472-1477, 1996
2. Adami,HO, McLaughlin,J, Ekblom,A, Berne,C, Silverman,D, Hacker,D, Persson,I: Cancer risk in patients with diabetes mellitus. *Cancer Causes Control* 2:307-314, 1991
3. Almind,K, Doria,A, Kahn,CR: Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat.Med.* 7:277-279, 2001
4. Altshuler,D, Hirschhorn,JN, Klannemark,M, Lindgren,CM, Vohl,MC, Nemesh,J, Lane,CR, Schaffner,SF, Bolk,S, Brewer,C, Tuomi,T, Gaudet,D, Hudson,TJ, Daly,M, Groop,L, Lander,ES: The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 26:76-80, 2000
5. Amakawa,R, Jing,W, Ozawa,K, Matsunami,N, Hamaguchi,Y, Matsuda,F, Kawaichi,M, Honjo,T: Human Jk recombination signal binding protein gene (IGKJRB): comparison with its mouse homologue. *Genomics* 17:306-315, 1993
6. Anderson,KE, Anderson,E, Mink,PJ, Hong,CP, Kushi,LH, Sellers,TA, Lazovich,D, Folsom,AR: Diabetes and endometrial cancer in the Iowa women's health study. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10:611-616, 2001
7. Attvall,S, Fowelin,J, Lager,I, Von Schenck,H, Smith,U: Smoking induces insulin resistance--a potential link with the insulin resistance syndrome. *J.Intern.Med.* 233:327-332, 1993
8. Awata,T, Inoue,K, Kurihara,S, Ohkubo,T, Inoue,I, Abe,T, Takino,H, Kanazawa,Y, Katayama,S: Missense variations of the gene responsible for Wolfram syndrome (WFS1/wolframin) in Japanese: possible contribution of the Arg456His mutation to type 1 diabetes as a nonautoimmune genetic basis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 268:612-616, 2000
9. Balkau,B, Eschwege,E, Fontbonne,A, Claude,JR, Warnet,JM: Cardiovascular and alcohol-related deaths in abnormal glucose tolerant and diabetic subjects. *Diabetologia* 35:39-44, 1992

10. Bansal,A, van den,BD, Kammerer,S, Honisch,C, Adam,G, Cantor,CR, Kleyn,P, Braun,A: Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:16871-16874, 2002
11. Barrett,TG, Bunday,SE, Macleod,AF: Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346:1458-1463, 1995
12. Barroso,I, Gurnell,M, Crowley,VE, Agostini,M, Schwabe,JW, Soos,MA, Maslen,GL, Williams,TD, Lewis,H, Schafer,AJ, Chatterjee,VK, O'Rahilly,S: Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883, 1999
13. Beamer,BA, Yen,CJ, Andersen,RE, Muller,D, Elahi,D, Cheskin,LJ, Andres,R, Roth,J, Shuldiner,AR: Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 47:1806-1808, 1998
14. Benjamini,Y, Hochberg,Y: Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R.Statist.Soc.* 57:289-300, 1995
15. Bertina,RM, Koeleman,BP, Koster,T, Rosendaal,FR, Dirven,RJ, de Ronde,H, van der Velden,PA, Reitsma,PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-67, 1994
16. Bird,TD, Wijsman,EM, Nochlin,D, Leehey,M, Sumi,SM, Payami,H, Poorkaj,P, Nemens,E, Rafkind,M, Schellenberg,GD: Chromosome 17 and hereditary dementia: linkage studies in three non-Alzheimer families and kindreds with late-onset FAD. *Neurology* 48:949-954, 1997
17. Boeckmann,B, Bairoch,A, Apweiler,R, Blatter,MC, Estreicher,A, Gasteiger,E, Martin,MJ, Michoud,K, O'Donovan,C, Phan,I, Pilbout,S, Schneider,M: The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* 31:365-370, 2003
18. Bosland,MC: The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr*39-66, 2000
19. Braun,A, Little,DP, Reuter,D, Muller-Mysok,B, Koster,H: Improved analysis of microsatellites using mass spectrometry. *Genomics* 46:18-23, 1997
20. Buetow,KH, Edmonson,M, MacDonald,R, Clifford,R, Yip,P, Kelley,J, Little,DP, Strausberg,R, Koester,H, Cantor,CR, Braun,A: High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism

markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:581-584, 2001

21. Busch,CP, Hegele,RA: Genetic determinants of type 2 diabetes mellitus. *Clin.Genet.* 60:243-254, 2001
22. Calle,EE, Murphy,TK, Rodriguez,C, Thun,MJ, Heath,CW, Jr.: Diabetes mellitus and pancreatic cancer mortality in a prospective cohort of United States adults. *Cancer Causes Control* 9:403-410, 1998
23. Cheong,HI, Park,HW, Ha,IS, Moon,HN, Choi,Y, Ko,KW, Jun,JK: Six novel mutations in the vasopressin V2 receptor gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *Nephron* 75:431-437, 1997
24. Chinnaiyan,AM, O'Rourke,K, Tewari,M, Dixit,VM: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512, 1995
25. Chokkalingam,AP, Pollak,M, Fillmore,CM, Gao,YT, Stanczyk,FZ, Deng,J, Sesterhenn,IA, Mostofi,FK, Fears,TR, Madigan,MP, Ziegler,RG, Fraumeni,JF, Jr., Hsing,AW: Insulin-like growth factors and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10:421-427, 2001
26. Chow,WH, Gridley,G, Nyren,O, Linet,MS, Ekbom,A, Fraumeni,JF, Jr., Adami,HO: Risk of pancreatic cancer following diabetes mellitus: a nationwide cohort study in Sweden. *J.Natl.Cancer Inst.* 87:930-931, 1995
27. Czyzyk,A, Szczepanik,Z: Diabetes mellitus and cancer. *Eur.J.Intern.Med.* 11:245-252, 2000
28. de Haan,JB, Bladier,C, Griffiths,P, Kelner,M, O'Shea,RD, Cheung,NS, Bronson,RT, Silvestro,MJ, Wild,S, Zheng,SS, Beart,PM, Hertzog,PJ, Kola,I: Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* 273:22528-22536, 1998
29. de Klein,A, van Kessel,AG, Grosveld,G, Bartram,CR, Hagemeijer,A, Bootsma,D, Spurr,NK, Heisterkamp,N, Groffen,J, Stephenson,JR: A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300:765-767, 1982
30. Deeb,SS, Fajas,L, Nemoto,M, Pihlajamaki,J, Mykkanen,L, Kuusisto,J, Laakso,M, Fujimoto,W, Auwerx,J: A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with de-

creased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat.Genet.* 20:284-287, 1998

31. Del Vecchio,BC, Gentile,S, Marmo,R, Carbone,L, Coltorti,M: Alterations of glucose metabolism in chronic liver disease. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 8:29-36, 1990
32. Despres,JP: The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. *Obes.Res.* 6 Suppl 1:8S-17S.:8S-17S, 1998
33. Dietz,HC, Cutting,GR, Pyeritz,RE, Maslen,CL, Sakai,LY, Corson,GM, Puffenberger,EG, Hamosh,A, Nanthakumar,EJ, Curristin,SM, .: Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352:337-339, 1991
34. Douglas,JA, Erdos,MR, Watanabe,RM, Braun,A, Johnston,CL, Oeth,P, Mohlke,KL, Valle,TT, Ehnholm,C, Buchanan,TA, Bergman,RN, Collins,FS, Boehnke,M, Tuomilehto,J: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12A1a variant: association with type 2 diabetes and trait differences. *Diabetes* 50:886-890, 2001
35. Duggirala,R, Blangero,J, Almasy,L, Dyer,TD, Williams,KL, Leach,RJ, O'Connell,P, Stern,MP: Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am.J.Hum.Genet.* 64:1127-1140, 1999
36. Duprez,E, Tong,JH, Derre,J, Chen,SJ, Berger,R, Chen,Z, Lanotte,M: JEM-1, a novel gene encoding a leucine-zipper nuclear factor upregulated during retinoid-induced maturation of NB4 promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 14:1563-1570, 1997
37. Ehrenforth,S, Klarmann,D, Zabel,B, Scharrer,I, Kreuz,W: Severe factor V deficiency presenting as subdural haematoma in the newborn. *Eur.J.Pediatr.* 157:1032, 1998
38. Elbein,SC, Hoffman,MD, Teng,K, Leppert,MF, Hasstedt,SJ: A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes* 48:1175-1182, 1999
39. Elbrecht,A, Chen,Y, Cullinan,CA, Hayes,N, Leibowitz,M, Moller,DE, Berger,J: Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 224:431-437, 1996
40. Eliasson,B, Attvall,S, Taskinen,MR, Smith,U: The insulin resistance syndrome in smokers is related to smoking habits. *Arterioscler.Thromb.* 14:1946-1950, 1994
41. Emahazion,T, Feuk,L, Jobs,M, Sawyer,SL, Fredman,D, St Clair,D, Prince,JA, Brookes,AJ: SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends Genet.* 17:407-413, 2001

42. Everhart,J, Wright,D: Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 273:1605-1609, 1995
43. Feral,C, Guellaen,G, Pawlak,A: Human testis expresses a specific poly(A)-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 29:1872-1883, 2001
44. Fisher,WE: Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J.Surg.* 25:503-508, 2001
45. Fisher,WE, Boros,LG, Schirmer,WJ: Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors. *J.Surg.Res.* 63:310-313, 1996
46. Foletta,VC, Brown,FD, Young,WS, III: Cloning of rat ARHGAP4/C1, a RhoGAP family member expressed in the nervous system that colocalizes with the Golgi complex and microtubules. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 107:65-79, 2002
47. Frati,AC, Iniestra,F, Ariza,CR: Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 19:112-118, 1996
48. Frayling,TM, Walker,M, McCarthy,MI, Evans,JC, Allen,LI, Lynn,S, Ayres,S, Millaer,B, Turner,C, Turner,RC, Sampson,MJ, Hitman,GA, Ellard,S, Hattersley,AT: Parent-offspring trios: a resource to facilitate the identification of type 2 diabetes genes. *Diabetes* 48:2475-2479, 1999
49. Frederiksen,L, Brodbæk,K, Fenger,M, Jorgensen,T, Borch-Johnsen,K, Madsbad,S, Urhammer,SA: Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87:3989-3992, 2002
50. Froguel,P, Velho,G: Genetic determinants of type 2 diabetes. *Recent Prog.Horm.Res.* 56:91-105.:91-105, 2001
51. Galiegue,S, Jbilo,O, Combes,T, Bribes,E, Carayon,P, Le Fur,G, Casellas,P: Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J.Biol.Chem.* 274:2938-2952, 1999
52. Gao,X, Nelson,GW, Karacki,P, Martin,MP, Phair,J, Kaslow,R, Goedert,JJ, Buchbinder,S, Hoots,K, Vlahov,D, O'Brien,SJ, Carrington,M: Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N.Engl.J.Med.* 344:1668-1675, 2001
53. Gerich,JE: The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr.Rev.* 19:491-503, 1998

54. Ghosh,S, Watanabe,RM, Valle,TT, Hauser,ER, Magnuson,VL, Langefeld,CD, Ally,DS, Mohlke,KL, Silander,K, Kohtamaki,K, Chines,P, Balow,JJ, Birznieks,G, Chang,J, Eldridge,W, Erdos,MR, Karanjawala,ZE, Knapp,JI, Kudelko,K, Martin,C, Morales-Mena,A, Musick,A, Musick,T, Pfahl,C, Porter,R, Rayman,JB: The Finland-United States investigation of non-insulin-dependent diabetes mellitus genetics (FUSION) study. I. An autosomal genome scan for genes that predispose to type 2 diabetes. *Am.J.Hum.Genet.* 67:1174-1185, 2000

55. Giovannucci,E, Rimm,EB, Stampfer,MJ, Colditz,GA, Willett,WC: Diabetes mellitus and risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 9:3-9, 1998

56. Ha,MJ, Yoon,J, Moon,E, Lee,YM, Kim,HJ, Kim,W: Assignment of the kinesin family member 4 genes (KIF4A and KIF4B) to human chromosome bands Xq13.1 and 5q33.1 by in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* 88:41-42, 2000

57. Hales,CN, Barker,DJ, Clark,PM, Cox,LJ, Fall,C, Osmond,C, Winter,PD: Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303:1019-1022, 1991

58. Hanayama,R, Tanaka,M, Miwa,K, Shinohara,A, Iwamatsu,A, Nagata,S: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417:182-187, 2002

59. Hanis,CL, Boerwinkle,E, Chakraborty,R, Ellsworth,DL, Concannon,P, Stirling,B, Morrison,VA, Wapelhorst,B, Spielman,RS, Gogolin-Ewens,KJ, Shepard,JM, Williams,SR, Risch,N, Hinds,D, Iwasaki,N, Ogata,M, Omori,Y, Petzold,C, Rietzch,H, Schroder,HE, Schulze,J, Cox,NJ, Menzel,S, Boriraj,VV, Chen,X, .: A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat.Genet.* 13:161-166, 1996

60. Hansen,L, Hansen,T, Vestergaard,H, Bjoerbaek,C, Echwald,SM, Clausen,JO, Chen,YH, Chen,MX, Cohen,PT, Pedersen,O: A widespread amino acid polymorphism at codon 905 of the glycogen-associated regulatory subunit of protein phosphatase-1 is associated with insulin resistance and hypersecretion of insulin. *Hum.Mol.Genet.* 4:1313-1320, 1995

61. Hanson,RL, Ehm,MG, Pettitt,DJ, Prochazka,M, Thompson,DB, Timberlake,D, Frouud,T, Kobes,S, Baier,L, Burns,DK, Almasy,L, Blangero,J, Garvey,WT, Bennett,PH, Knowler,WC: An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am.J.Hum.Genet.* 63:1130-1138, 1998

62. Hara,K, Okada,T, Tobe,K, Yasuda,K, Mori,Y, Kadowaki,H, Hagura,R, Akanuma,Y, Kimura,S, Ito,C, Kadowaki,T: The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 271:212-216, 2000

63. Harada,N, Iijima,S, Kobayashi,K, Yoshida,T, Brown,WR, Hibi,T, Oshima,A, Morikawa,M: Human IgGFc binding protein (FcgammaBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J.Biol.Chem.* 272:15232-15241, 1997
64. Hart,LM, de Knijff,P, Dekker,JM, Stolk,RP, Nijpels,G, van der Does,FE, Ruige,JB, Grobbee,DE, Heine,RJ, Maassen,JA: Variants in the sulphonylurea receptor gene: association of the exon 16-3t variant with Type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians. *Diabetologia* 42:617-620, 1999
65. Hassan,MM, Hwang,LY, Hatten,CJ, Swaim,M, Li,D, Abbruzzese,JL, Beasley,P, Patt,YZ: Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 36:1206-1213, 2002
66. Hasstedt,SJ, Ren,QF, Teng,K, Elbein,SC: Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 pro(12)ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86:536-541, 2001
67. Hattori,M, Fujiyama,A, Taylor,TD, Watanabe,H, Yada,T, Park,HS, Toyoda,A, Ishii,K, Totoki,Y, Choi,DK, Groner,Y, Soeda,E, Ohki,M, Takagi,T, Sakaki,Y, Taudien,S, Blechschmidt,K, Polley,A, Menzel,U, Delabar,J, Kumpf,K, Lehmann,R, Patterson,D, Reichwald,K, Rump,A, Schillhabel,M, Schudy,A, Zimmermann,W, Rosenthal,A, Kudoh,J, Schibuya,K, Kawasaki,K, Asakawa,S, Shintani,A, Sasaki,T, Nagamine,K, Mitsuyama,S, Antonarakis,SE, Minoshima,S, Shimizu,N, Nordsiek,G, Hornischer,K, Brant,P, Scharfe,M, Schon,O, Desario,A, Reichelt,J, Kauer,G, Blocker,H, Ramser,J, Beck,A, Klages,S, Hennig,S, Riesselmann,L, Dagand,E, Haaf,T, Wehrmeyer,S, Borzym,K, Gardiner,K, Nizetic,D, Francis,F, Lehrach,H, Reinhardt,R, Yaspo,ML: The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405:311-319, 2000
68. Hegele,RA, Cao,H, Harris,SB, Zinman,B, Hanley,AJ, Anderson,CM: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85:2014-2019, 2000
69. Hegele,RA, Harris,SB, Zinman,B, Wang,J, Cao,H, Hanley,AJ, Tsui,LC, Scherer,SW: Variation in the AU(AT)-rich element within the 3'-untranslated region of PPP1R3 is associated with variation in plasma glucose in aboriginal Canadians. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83:3980-3983, 1998
70. Hegele,RA, Sun,F, Harris,SB, Anderson,C, Hanley,AJ, Zinman,B: Genome-wide scanning for type 2 diabetes susceptibility in Canadian Oji-Cree, using 190 microsatellite markers. *J.Hum.Genet.* 44:10-14, 1999
71. Hill,AV, Allsopp,CE, Kwiatkowski,D, Anstey,NM, Twumasi,P, Rowe,PA, Bennett,S, Brewster,D, McMichael,AJ, Greenwood,BM: Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352:595-600, 1991

72. Horikawa,Y, Oda,N, Cox,NJ, Li,X, Orho-Melander,M, Hara,M, Hinokio,Y, Lindner,TH, Mashima,H, Schwarz,PE, Bosque-Plata,L, Horikawa,Y, Oda,Y, Yoshiuchi,I, Colilla,S, Polonsky,KS, Wei,S, Concannon,P, Iwasaki,N, Schulze,J, Baier,LJ, Bogardus,C, Groop,L, Boerwinkle,E, Hanis,CL, Bell,GI: Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat.Genet.* 26:163-175, 2000
73. Hu,FB, Manson,JE, Liu,S, Hunter,D, Colditz,GA, Michels,KB, Speizer,FE, Giovannucci,E: Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J.Natl.Cancer Inst.* 91:542-547, 1999
74. Huang,Y, Wang,KK: The calpain family and human disease. *Trends Mol.Med.* 7:355-362, 2001
75. Huxtable,SJ, Saker,PJ, Haddad,L, Walker,M, Frayling,TM, Levy,JC, Hitman,GA, O-Rahilly,S, Hattersley,AT, McCarthy,MI: Analysis of parent-offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III variable number tandem repeat alleles. *Diabetes* 49:126-130, 2000
76. Jackson,RT, Luplow,RE, III: Adult purpura fulminans and digital necrosis associated with sepsis and the factor V mutation. *JAMA* 280:1829-1830, 1998
77. James,DE, Kraegen,EW, Chisholm,DJ: Effects of exercise training on in vivo insulin action in individual tissues of the rat. *J.Clin.Invest* 76:657-666, 1985
78. Jurinke,C, van den,BD, Cantor,CR, Koster,H: The use of MassARRAY technology for high throughput genotyping. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* 77:57-74.:57-74, 2002
79. Kaaks,R, Lukanova,A: Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc.Nutr.Soc.* 60:91-106, 2001
80. Kaaks,R, Lukanova,A, Sommersberg,B: Plasma androgens, IGF-1, body size, and prostate cancer risk: a synthetic review. *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* 3:157-172, 2000
81. Kabra,NH, Kang,C, Hsing,LC, Zhang,J, Winoto,A: T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:6307-6312, 2001
82. Kesavulu,MM, Giri,R, Kameswara,RB, Apparao,C: Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab* 26:387-392, 2000

83. Kim,PK, Dutra,AS, Chandrasekharappa,SC, Puck,JM: Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. *J.Immunol.* 157:5461-5466, 1996
84. King,H, Aubert,RE, Herman,WH: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431, 1998
85. King,ML, Shaikh,A, Bidwell,D, Voller,A, Banatvala,JE: Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *Lancet* 1:1397-1399, 1983
86. Kliewer,SA, Willson,TM: The nuclear receptor PPARgamma - bigger than fat. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:576-581, 1998
87. Knowler,WC, Pettitt,DJ, Saad,MF, Bennett,PH: Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev.* 6:1-27, 1990
88. La Vecchia,C, Negri,E, Decarli,A, Franceschi,S: Diabetes mellitus and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 6:1007-1010, 1997
89. La Vecchia,C, Negri,E, Decarli,A, Franceschi,S: Diabetes mellitus and the risk of primary liver cancer. *Int.J.Cancer* 73:204-207, 1997
90. La Vecchia,C, Negri,E, Franceschi,S, D'Avanzo,B, Boyle,P: A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *Br.J.Cancer* 70:950-953, 1994
91. Lagergren,J, Bergstrom,R, Nyren,O: Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann.Intern.Med.* 130:883-890, 1999
92. Lander,ES, Schork,NJ: Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-2048, 1994
93. Liese,AD, Mayer-Davis,EJ, Haffner,SM: Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective. *Epidemiol.Rev.* 20:157-172, 1998
94. Lithell,HO, McKeigue,PM, Berglund,L, Mohsen,R, Lithell,UB, Leon,DA: Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ* 312:406-410, 1996
95. Little,DP, Cornish,TJ, O'Donnell,MJ, Braun,A, Cotter,RJ, Köster,H: MALDI on a Chip: Analysis of Arrays of Low-Femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oli-

- gonucleotides and DNA Diagnostic Products Dispensed by a Piezoelectric Pipet. *Anal.Chem.* 69:4540-4546, 97 A.D.
96. Liu,Q, Shalaby,F, Jones,J, Bouchard,D, Dumont,DJ: The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, ship, is expressed during hematopoiesis and spermatogenesis. *Blood* 91:2753-2759, 1998
 97. Lohmueller,KE, Pearce,CL, Pike,M, Lander,ES, Hirschhorn,JN: Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat.Genet.* 33:177-182, 2003
 98. Luo,TH, Zhao,Y, Li,G, Yuan,WT, Zhao,JJ, Chen,JL, Huang,W, Luo,M: A genome-wide search for type II diabetes susceptibility genes in Chinese Hans. *Diabetologia* 44:501-506, 2001
 99. Mahtani,MM, Widen,E, Lehto,M, Thomas,J, McCarthy,M, Brayer,J, Bryant,B, Chan,G, Daly,M, Forsblom,C, Kanninen,T, Kirby,A, Kruglyak,L, Munnely,K, Parkkonen,M, Reeve-Daly,MP, Weaver,A, Brettin,T, Duyk,G, Lander,ES, Groop,LC: Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nat.Genet.* 14:90-94, 1996
 100. Malecki,MT, Jhala,US, Antonellis,A, Fields,L, Doria,A, Orban,T, Saad,M, Warram,JH, Montminy,M, Krolewski,AS: Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat.Genet.* 23:323-328, 1999
 101. Matsubara,A, Wasson,JC, Donelan,SS, Welling,CM, Glaser,B, Permutt,MA: Isolation and characterization of the human AKT1 gene, identification of 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs), and their lack of association with Type II diabetes. *Diabetologia* 44:910-913, 2001
 102. Mayer,BJ: SH3 domains: complexity in moderation. *J.Cell Sci.* 114:1253-1263, 2001
 103. Menzaghi,C, Plengvidhya,N, Ma,X, Warram,JH, Shoelson,SE, Doria,A: Genetic variability in insulin action inhibitor Ikkbeta (IKBKB) does not play a major role in the development of type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87:1894-1897, 2002
 104. Mohlke,KL, Erdos,MR, Scott,LJ, Fingerlin,TE, Jackson,AU, Silander,K, Hollstein,P, Boehnke,M, Collins,FS: High-throughput screening for evidence of association by using mass spectrometry genotyping on DNA pools. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:16928-16933, 2002
 105. Mori,H, Ikegami,H, Kawaguchi,Y, Seino,S, Yokoi,N, Takeda,J, Inoue,I, Seino,Y, Yasuda,K, Hanafusa,T, Yamagata,K, Awata,T, Kadowaki,T, Hara,K, Yamada,N, Gotoda,T, Iwasaki,N, Iwamoto,Y, Sanke,T, Nanjo,K, Oka,Y, Matsutani,A, Maeda,E, Ka-

- suga,M: The Pro12 -->Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:891-894, 2001
106. Mori,M, Saitoh,S, Takagi,S, Obara,F, Ohnishi,H, Akasaka,H, Izumi,H, Sakauchi,F, Sonoda,T, Nagata,Y, Shimamoto,K: A Review of Cohort Studies on the Association Between History of Diabetes Mellitus and Occurrence of Cancer. *Asian Pac.J.Cancer Prev.* 1:269-276, 2000
 107. Morrow,JA, Collie,IT, Dunbar,DR, Walker,GB, Shahid,M, Hill,DR: Molecular cloning and functional expression of the human glycine transporter GlyT2 and chromosomal localisation of the gene in the human genome. *FEBS Lett.* 439:334-340, 1998
 108. Morton,CJ, Campbell,ID: SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr.Biol.* 4:615-617, 1994
 109. Muchova,J, Liptakova,A, Orszaghova,Z, Garaiova,I, Tison,P, Carsky,J, Durackova,Z: Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of Type 2 diabetes mellitus. *Diabet.Med.* 16:74-78, 1999
 110. Mueller,E, Smith,M, Sarraf,P, Kroll,T, Aiyer,A, Kaufman,DS, Oh,W, Demetri,G, Figg,WD, Zhou,XP, Eng,C, Spiegelman,BM, Kantoff,PW: Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:10990-10995, 2000
 111. O'Sullivan,JB: Diabetes mellitus after GDM. *Diabetes* 40 Suppl 2:131-5.:131-135, 1991
 112. Oh,EY, Min,KM, Chung,JH, Min,YK, Lee,MS, Kim,KW, Lee,MK: Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85:1801-1804, 2000
 113. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
 114. Osawa,H, Onuma,H, Murakami,A, Ochi,M, Nishimiya,T, Kato,K, Shimizu,I, Fujii,Y, Ohashi,J, Makino,H: Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene: the absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 51:863-866, 2002
 115. Pacholczyk,T, Blakely,RD, Amara,SG: Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350:350-354, 1991

116. Paglia,DE, Valentine,WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Lab Clin.Med.* 70:158-169, 1967
117. Pak,CY, Eun,HM, McArthur,RG, Yoon,JW: Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2:1-4, 1988
118. Palanduz,S, Ademoglu,E, Gokkusu,C, Tamer,S: Plasma antioxidants and type 2 diabetes mellitus. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 109:309-318, 2001
119. Parazzini,F, La Vecchia,C, Negri,E, Riboldi,GL, Surace,M, Benzi,G, Maina,A, Chiaffarino,F: Diabetes and endometrial cancer: an Italian case-control study. *Int.J.Cancer* 81:539-542, 1999
120. Parker,A, Meyer,J, Lewitzky,S, Rennich,JS, Chan,G, Thomas,JD, Orho-Melander,M, Lehtovirta,M, Forsblom,C, Hyrkko,A, Carlsson,M, Lindgren,C, Groop,LC: A gene conferring susceptibility to type 2 diabetes in conjunction with obesity is located on chromosome 18p11. *Diabetes* 50:675-680, 2001
121. Pawson,T: Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573-580, 1995
122. Permutt,MA, Wasson,JC, Suarez,BK, Lin,J, Thomas,J, Meyer,J, Lewitzky,S, Rennich,JS, Parker,A, DuPrat,L, Maruti,S, Chayen,S, Glaser,B: A genome scan for type 2 diabetes susceptibility loci in a genetically isolated population. *Diabetes* 50:681-685, 2001
123. Poulsen,P, Kyvik,KO, Vaag,A, Beck-Nielsen,H: Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* 42:139-145, 1999
124. Preston-Martin,S, Pike,MC, Ross,RK, Jones,PA, Henderson,BE: Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 50:7415-7421, 1990
125. Ramlo-Halsted,BA, Edelman,SV: The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. *Prim.Care* 26:771-789, 1999
126. Reaven,GM: Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev.* 75:473-486, 1995
127. Ronnema,T, Ronnema,EM, Puukka,P, Pyorala,K, Laakso,M: Smoking is independently associated with high plasma insulin levels in nondiabetic men. *Diabetes Care* 19:1229-1232, 1996

128. Rosenberg,DJ, Neugut,AI, Ahsan,H, Shea,S: Diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Invest* 20:157-165, 2002
129. Sasieni,PD: From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53:1253-1261, 1997
130. Savage,DB, Agostini,M, Barroso,I, Gurnell,M, Luan,J, Meirhaeghe,A, Harding,AH, Ihrke,G, Rajanayagam,O, Soos,MA, George,S, Berger,D, Thomas,EL, Bell,JD, Meeran,K, Ross,RJ, Vidal-Puig,A, Wareham,NJ, O'Rahilly,S, Chatterjee,VK, Schafer,AJ: Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree. *Nat.Genet.* 31:379-384, 2002
131. Schwanstecher,C, Meyer,U, Schwanstecher,M: K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Diabetes* 51:875-879, 2002
132. Seino,S: S20G mutation of the amylin gene is associated with Type II diabetes in Japanese. Study Group of Comprehensive Analysis of Genetic Factors in Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 44:906-909, 2001
133. Sellers,TA, Anderson,KE, Olson,JE, Folsom,AR: Family histories of diabetes mellitus and breast cancer and incidence of postmenopausal breast cancer. *Epidemiology* 9:102-105, 1998
134. Sham,P, Bader,JS, Craig,I, O'Donovan,M, Owen,M: DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nat.Rev.Genet.* 3:862-871, 2002
135. Shen,Q, Townes,PL, Padden,C, Newburger,PE: An in-frame trinucleotide repeat in the coding region of the human cellular glutathione peroxidase (GPX1) gene: in vivo polymorphism and in vitro instability. *Genomics* 23:292-294, 1994
136. Silverman,DT, Schiffman,M, Everhart,J, Goldstein,A, Lillemoe,KD, Swanson,GM, Schwartz,AG, Brown,LM, Greenberg,RS, Schoenberg,JB, Pottern,LM, Hoover,RN, Fraumeni,JF, Jr.: Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br.J.Cancer* 80:1830-1837, 1999
137. Silverman,JF, O'Brien,KF, Long,S, Leggett,N, Khazanie,PG, Pories,WJ, Norris,HT, Caro,JF: Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am.J.Gastroenterol.* 85:1349-1355, 1990
138. Storm,N, Darnhofer-Patel,B, van den,BD, Rodi,CP: MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol.Biol.* 212:241-62.:241-262, 2003

139. Strachan,T, Abitbol,M, Davidson,D, Beckmann,JS: A new dimension for the human genome project: towards comprehensive expression maps. *Nat.Genet.* 16:126-132, 1997
140. Strickler,HD, Wylie-Rosett,J, Rohan,T, Hoover,DR, Smoller,S, Burk,RD, Yu,H: The relation of type 2 diabetes and cancer. *Diabetes Technol.Ther.* 3:263-274, 2001
141. Strom,TM, Hortnagel,K, Hofmann,S, Gekeler,F, Scharfe,C, Rabl,W, Gerbitz,KD, Meitinger,T: Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum.Mol.Genet.* 7:2021-2028, 1998
142. Stumvoll,M, Fritsche,A, Volk,A, Stefan,N, Madaus,A, Maerker,E, Teigeler,A, Koch,M, Machicao,F, Haring,H: The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to the variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans. *Diabetes* 50:882-885, 2001
143. Svensson,PJ, Dahlback,B: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N.Engl.J.Med.* 330:517-522, 1994
144. Tang,X, Saito-Ohara,F, Song,J, Koga,C, Ugai,H, Murakami,H, Ikeuchi,T, Yokoyama,KK: Assignment of the human gene for KBF2/RBP-Jk to chromosome 9p12-13 and 9q13 by fluorescence in situ hybridization. *Jpn.J.Hum.Genet.* 42:337-341, 1997
145. Tavani,A, Gallus,S, Bosetti,C, Tzonou,A, Lagiou,P, Negri,E, Trichopoulos,D, La Vecchia,C: Diabetes and the risk of prostate cancer. *Eur.J.Cancer Prev.* 11:125-128, 2002
146. Todd,JA: From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays* 21:164-174, 1999
147. Tong,JH, Fant,X, Benoit,G, Chen,SJ, Chen,Z, Lanotte,M: Genomic organization of the JEM-1 (BLZF1) gene on human chromosome 1q24: molecular cloning and analysis of its promoter region. *Genomics* 69:380-390, 2000
148. Tracy,PB, Giles,AR, Mann,KG, Eide,LL, Hoogendoorn,H, Rivard,GE: Factor V (Quebec): a bleeding diathesis associated with a qualitative platelet Factor V deficiency. *J.Clin.Invest* 74:1221-1228, 1984
149. Urwin,RE, Bennetts,B, Wilcken,B, Lampropoulos,B, Beumont,P, Clarke,S, Russell,J, Tanner,S, Nunn,KP: Anorexia nervosa (restrictive subtype) is associated with a polymorphism in the novel norepinephrine transporter gene promoter polymorphic region. *Mol.Psychiatry* 7:652-657, 2002

150. Velho,G, Froguel,P: Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. *Eur.J.Endocrinol.* 138:233-239, 1998
151. Vincent,AL, Billingsley,G, Buys,Y, Levin,AV, Priston,M, Trope,G, Williams-Lyn,D, Heon,E: Digenic inheritance of early-onset glaucoma: CYP1B1, a potential modifier gene. *Am.J.Hum.Genet.* 70:448-460, 2002
152. Vionnet,N, Hani,E, Dupont,S, Gallina,S, Francke,S, Dotte,S, De Matos,F, Durand,E, Lepretre,F, Lecoeur,C, Gallina,P, Zekiri,L, Dina,C, Froguel,P: Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am.J.Hum.Genet.* 67:1470-1480, 2000
153. Wain,HM, Lush,M, Ducluzeau,F, Povey,S: Genew: the human gene nomenclature database. *Nucleic Acids Res.* 30:169-171, 2002
154. Wang,H, Frelin,L, Pevsner,J: Human syntaxin 7: a Pep12p/Vps6p homologue implicated in vesicle trafficking to lysosomes. *Gene* 199:39-48, 1997
155. Wanless,IR, Lentz,JS: Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 12:1106-1110, 1990
156. Weiderpass,E, Gridley,G, Persson,I, Nyren,O, Ekblom,A, Adami,HO: Risk of endometrial and breast cancer in patients with diabetes mellitus. *Int.J.Cancer* 71:360-363, 1997
157. Weiderpass,E, Ye,W, Vainio,H, Kaaks,R, Adami,HO: Reduced risk of prostate cancer among patients with diabetes mellitus. *Int.J.Cancer* 102:258-261, 2002
158. Werner,M, Sych,M, Herbon,N, Illig,T, Konig,IR, Wjst,M: Large-scale determination of SNP allele frequencies in DNA pools using MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum.Mutat.* 20:57-64, 2002
159. Wheeler,DL, Church,DM, Federhen,S, Lash,AE, Madden,TL, Pontius,JU, Schuler,GD, Schriml,LM, Sequeira,E, Tatusova,TA, Wagner,L: Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res.* 31:28-33, 2003
160. Wideroff,L, Gridley,G, Mellekjær,L, Chow,WH, Linet,M, Keehn,S, Borch-Johnsen,K, Olsen,JH: Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J.Natl.Cancer Inst.* 89:1360-1365, 1997

161. Will,JC, Galuska,DA, Vinicor,F, Calle,EE: Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am.J.Epidemiol.* 147:816-825, 1998
162. Withers,DJ, Gutierrez,JS, Towery,H, Burks,DJ, Ren,JM, Previs,S, Zhang,Y, Bernal,D, Pons,S, Shulman,GI, Bonner-Weir,S, White,MF: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904, 1998
163. Yen,CJ, Beamer,BA, Negri,C, Silver,K, Brown,KA, Yarnall,DP, Burns,DK, Roth,J, Shuldiner,AR: Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 241:270-274, 1997
164. Yodate,HT, Suwa,M, Irie,R, Matsui,H, Nishikawa,T, Nakamura,Y, Yamaguchi,D, Peng,ZZ, Yamamoto,T, Nagai,K, Hayashi,K, Otsuki,T, Sugiyama,T, Ota,T, Suzuki,Y, Sugano,S, Isogai,T, Masuho,Y: HUNT: launch of a full-length cDNA database from the Helix Research Institute. *Nucleic Acids Res.* 29:185-188, 2001
165. Zemla,B: The bio-social elements of risk in the invasive cervical cancer incidence among a stationary and migratory woman population. A case-control study. *Neoplasma* 31:119-127, 1984
166. Zemla,B: [Analysis of selected risk factors in invasive cervical cancer among autochthonous women (born in Upper Silesia) and migrants]. *Wiad.Lek.* 42:143-148, 1989
167. Zimmet,P, Dowse,G, Finch,C, Serjeantson,S, King,H: The epidemiology and natural history of NIDDM--lessons from the South Pacific. *Diabetes Metab Rev.* 6:91-124, 1990

2 Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass-Index
Bronch.	Bronchus
β-Zelle	Pankreatische Betazelle
Diastol.	Diastolischer Blutdruck
DIDMOAD-Syndrom	Syndrom des Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Optikusatrophie und Taubheit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Geschl.	Geschlecht
HbA1c	Glykierter Anteil des Hämoglobins
IgG	Immunglobulin G
IGF-1	Insulin-like-growth-factor 1
KI	Konfidenzintervall
m	männlich
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted-laser-desorption/ionisation-time-of-flight-Massenspektrometrie
NIDDM	Non-insulin-dependend-diabetes-mellitus
OR	odds ratio
Phil.Chrom.	Philadelphia-Chromosom
PNS	Peripheres Nervensystem
SNP	Single nucleotid polymorphism
Systol.	Systolischer Blutdruck
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UCSNP	University of Chicago single nucleotid polymorphism
w	weiblich

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überblick über die Ergebnisse der Untersuchung der allgemeinen Risikofaktoren
Tabelle 2	Signifikante SNPs nach der Korrektur durch die Methode von Benjamini und Hochberg (14)
Tabelle 3	Assoziierte Polymorphismen bei den Männern
Tabelle 4	Assoziierte Polymorphismen bei den Frauen
Tabelle 5	Polymorphismen mit Assoziationen bei Männern und Frauen
Tabelle 6	Resultate der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen
Tabelle 7	Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten weiblichen Studienteilnehmern (A1 oder A2)
Tabelle 8	Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten männlichen Studienteilnehmern (A1 oder A2)
Tabelle 9	Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten Studienteilnehmern (A1 oder A2)
Tabelle 10	Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten (A1) und heterozygoten weiblichen Studienteilnehmern
Tabelle 11	Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten (A1) und heterozygoten männlichen Studienteilnehmern
Tabelle 12	Statistische Parameter der individuellen Genotypisierung von 5 Polymorphismen bei homozygoten (A1) und heterozygoten Studienteilnehmern
Tabelle 13	Statistische Parameter der Krebserkrankungen bei Vätern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen
Tabelle 14	Statistische Parameter der Krebserkrankungen bei Müttern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen
Tabelle 15	Gene der signifikanten Ausreißer-SNPs bei Männern und Frauen
Tabelle 16	Gene der individuell genotypisierten SNPs

4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vergleich der Altersstrukturen der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen
Abbildung 2	Fragebogen
Abbildung 3	Verteilung der log odds ratios der einzelnen Allelhäufigkeiten der SNPs bei den Männern
Abbildung 4	Verteilung der log odds ratios der einzelnen Allelhäufigkeiten der SNPs bei den Frauen
Abbildung 5	Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Krebserkrankungen bei Vätern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen
Abbildung 6	Prozentuale Häufigkeiten verschiedener Krebserkrankungen bei Müttern der Typ-2-Diabetiker und Kontrollen
Abbildung 7	Lokalisation von Typ-2-Diabetes-Kandidatengenomen

5 Publikationen

Zuern CS, Hermanns M, Dietz K, Northoff H, Heeren M, Wernet D, Haak T, Meyer P.
„The association between paternal prostate cancer and type 2 diabetes“
Submitted to *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*.

Zürn CS, Hermanns N, Dietz K, Northoff H, Heeren M, Wernet D, Haak T, Meyer P.
„Prostatakarzinom-Risiko bei Vätern von Typ-2-Diabetikern“
Poster präsentiert bei der Jahresversammlung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in
Bremen, 28. Mai 2003 (Abstract Nummer P 129).

Haak T, Böhm B, Heeren M, **Zuern C**, Meyer P, Hermanns N.
„Prävalenz GAD-positiver Befunde bei Typ-2-Diabetes-Patienten und deren Bedeutung für
den Zeitpunkt der Insulinpflicht“
Vortrag gehalten bei der Jahresversammlung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen,
28. Mai 2003 (Vortrag Nummer V 26).

Zuern CS, Kammerer S, Langdown M, Braun A, Hermanns N, Dietz K, Northoff H, Heeren
M, Wernet D, Haak T, Meyer P.
„Single nucleotide polymorphisms in PPARG are associated with type 2 diabetes in German
patients“
Poster presented at the 14th Annual Meeting of the German Society of Human Genetics
together with the Austrian Society of Human Genetics and the Swiss Society of Medical
Genetics in Marburg, Germany, October 1-4, 2003 (Abstract number P 263).

6 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Olaf Rieß für die Möglichkeit, die Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Ich danke Herrn Dr. med. Peter Meyer für die Überlassung des interessanten Themas. Durch seine exzellente Anleitung und Betreuung hatte ich die Möglichkeit, mich mit dem Fach Humangenetik auf vielfältige Art und Weise auseinander zu setzen. Durch das gemeinsame Verfassen mehrerer Publikationen förderte Herr Dr. Meyer mein Interesse an der wissenschaftlichen Forschung. Vor allem danke ich ihm für seine konstruktive Diskussionsbereitschaft und seine fortwährende Motivation.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Klaus Dietz möchte ich für die weitreichende Unterstützung beim Erstellen der Statistik meiner Arbeit sehr danken. Vor allen Dingen danke ich ihm, dass er sich viel Zeit für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen genommen hat. Dadurch hatte ich die Möglichkeit, einen Einblick in statistische Methoden zu erlangen, Statistik anzuwenden und darüber hinaus Interesse für dieses Fach zu entwickeln.

Für die Möglichkeit, die Kontrollgruppe in der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Tübingen zu rekrutieren, danke ich Herrn Professor Dr. med. Hinnak Northoff. Ein Dankeschön auch an Herrn Örlner, der mir bei der Aufklärung der Studienteilnehmer in der Blutspendezentrale freundlich zur Seite stand.

Ich danke meiner Familie und meinem Freund Chris, die mich in vielfältiger Weise beim Erstellen der Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt den zahlreichen Blutspendern sowie den Patienten des Diabetes Zentrums Bad Mergentheim, die durch ihre Blutabgabe und ihr Vertrauen diese Studie ermöglichten.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christine Stefanie Zürn
Geburtsdatum: 3. Juli 1978
Geburtsort: Böblingen
Familienstand: ledig
Eltern: Wolf Rüdiger Zürn, Dipl.-Ing.
Brigitte Zürn, Lektorin

Schulbildung:

1985- 1989 Friedrich-Silcher-Grundschule in Böblingen
1989- 1998 Albert-Einstein-Gymnasium in Böblingen, Abschluss mit
der Allgemeinen Deutschen Hochschulreife

Studium:

Oktober 1998 – Mai 2005 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
August 2000 Ärztliche Vorprüfung
August 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2001 Beginn des Promotionsvorhabens am Institut für Anthro-
pologie und Humangenetik, Universitätsklinikum Tübin-
gen (Ärztlicher Direktor Professor Dr. med. Olaf Rieß)
März 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4. Mai 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung