

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin IV**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**E23K-Polymorphismus im Gen der KIR6.2-Untereinheit des**

**ATP-sensitiven Kaliumkanals**

**Auswirkungen auf Glukosetoleranz, Insulin- und**

**Glukagonsekretion**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Eberhard-Karls-Universität**

**zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Martin Gerhard Holzwarth**

**aus**

**Stuttgart**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Stumvoll

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. B. Ranke

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b>Diabetes mellitus Typ 2</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Insulin - Synthese, Regulation und Wirkung</b>	<b>2</b>
1.3	<b>Glukagon und GLP-1</b>	<b>3</b>
1.4	<b>ATP-sensitive Kaliumkanäle</b>	<b>4</b>
1.5	<b>E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen</b>	<b>5</b>
1.6	<b>Problemstellung und Studienplanung</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>7</b>
2.1	<b>Rahmenbedingungen</b>	<b>7</b>
2.2	<b>Probanden</b>	<b>7</b>
2.2.1	Teilnahmevoraussetzung	7
2.2.2	Teilnehmer	8
2.3	<b>Versuchsablauf</b>	<b>9</b>
2.3.1	Oraler Glucosetoleranztest (oGTT)	9
2.3.2	Hyperglykämischer Clamp	10
2.4	<b>Verwendete Medikamente</b>	<b>11</b>
2.4.1	Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)	11
2.4.2	Hyperglykämischer Clamp	12
2.5	<b>Analytik</b>	<b>12</b>
2.5.1	Aufbereitung der Blutentnahmen	12
2.5.2	Verfahren zur Bestimmung der einzelnen Blutparameter	13
2.5.3	Genotypisierung	13
2.6	<b>Berechnungen</b>	<b>14</b>
2.6.1	Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)	14
2.6.2	Hyperglykämischer Clamp	15
2.7	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>16</b>

<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)</b>	<b>17</b>
3.1.1	Plasmaglukose	17
3.1.2	Plasmainsulin	18
3.1.3	Insulinsensitivität	19
3.1.4	Plasmaglukagon	19
<b>3.2</b>	<b>Hyperglykämischer Clamp</b>	<b>21</b>
3.2.1	Plasmaglukose	21
3.2.2	Plasmainsulin und Plasma-C-Peptid	21
3.2.3	Insulinsekretion	23
3.2.4	Insulinsensitivität	24
3.2.5	Plasmaglukagon	24
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Plasmaglukose</b>	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Insulinsekretion</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Periphere Insulinwirkung</b>	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Plasmaglukagon</b>	<b>30</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluß des homozygoten E23K-Polymorphismus auf die Funktion ATP-sensitiver Kaliumkanäle</b>	<b>31</b>
4.5.1	Integration veränderter KIR6.2-Untereinheiten in $K_{ATP}$ -Kanäle	31
4.5.2	Nukleotidsensitivität ATP-sensitiver Kaliumkanäle	32
4.5.3	Einfluß des E23K-Polymorphismus auf die Nukleotidsensitivität	33
<b>4.6</b>	<b>Auswirkungen veränderter KIR-Untereinheiten auf die Regulation der Glukagonsekretion im Pankreas und ZNS</b>	<b>35</b>
4.6.1	Histologische Veränderungen im Pankreas	35
4.6.2	ZNS-Regulation der Glukagonsekretion	38
<b>4.7</b>	<b>Schlußfolgerung</b>	<b>39</b>

<b>5</b>	<b><i>Tabellen</i></b>	<b>41</b>
5.1	<b>Ergebnisse des oralen Glukosetoleranztests (oGTT)</b>	<b>41</b>
5.2	<b>Ergebnisse des Hyperglykämischen Clamps</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>48</b>
7.1	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>48</b>
7.2	<b>Berechnungsformeln</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>58</b>

# ***1 Einleitung***

## **1.1 Diabetes mellitus Typ 2**

In den letzten Jahren und Jahrzehnten nahmen die Inzidenz und die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) ständig zu. Allein in Deutschland leben heute schätzungsweise vier Millionen an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankte Personen. Von zentraler Bedeutung für den Pathomechanismus sind eine insuffiziente Insulinsekretion und eine periphere Insulinresistenz. Allerdings sind bis heute noch viele Einzelheiten im Wissen um die Entstehung der Erkrankung unbekannt. Direkte oder indirekte Folgen der Erkrankung sind für die betroffenen Personen oftmals sehr schwerwiegend und für das Gesundheitswesen zunehmend kostenintensiv.

Bereits seit längerer Zeit wird eine multifaktorielle Genese des Diabetes mellitus Typ 2 vermutet [45]. So scheinen sowohl Umwelteinflüsse, wie z.B. Ernährungsgewohnheiten, als auch genetische Faktoren im Sinne einer Polygenie von erheblicher ätiologischer Bedeutung zu sein [31; 50]. Bis heute sind jedoch nur wenige, detaillierte Kenntnisse über eine genetisch determinierte Dysregulation des Glukosestoffwechsels bekannt. Primäre Bedeutung besitzen in diesem Zusammenhang diejenigen Gene, die Proteine mit wichtigen Schlüsselfunktionen in der Regulation des Glukosestoffwechsels kodieren. Bei einem dieser Kandidatengene handelt es sich um das KIR6.2-Gen.

## 1.2 Insulin - Synthese, Regulation und Wirkung

Insulin wird als Proteohormon von der  $\beta$ -Zelle des Pankreas synthetisiert und ist das wichtigste anabole Hormon des menschlichen Körpers [36]. Über insulinabhängige Glukosetransporter Glut4 ermöglicht es die Glukoseaufnahme in Zellen, v.a. des Muskel- und Fettgewebes, und senkt somit den Plasmaglukosespiegel. Neben weiteren Wirkungsweisen führt Insulin auch zu einer Steigerung der hepatischen und muskulären Glykogensynthese bzw. zu einer Hemmung der Lipolyse in den Fettzellen [36].

Nach Transkription und Translation des Insulingens entsteht zunächst Präproinsulin, das nach einer enzymatischen Abspaltung eines Signalpeptids im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums in Proinsulin überführt wird. Konvertasen spalten anschließend im Golgi-Apparat eine Teilsequenz (C-Peptid) ab, und so entsteht das wirksame Peptidhormon Insulin. Nach seiner Proteinbiosynthese und anschließender posttranslatinaler Modifikation wird Insulin zusammen mit dem C-Peptid in äquimolaren Mengen intrazellulär in Sekretgranula der  $\beta$ -Zellen gespeichert [36].

Wichtigster Reiz für die Expression des Insulingens bzw. die Insulinsekretion ist der Plasmaglukosespiegel [36; 46]. Pankreatische  $\beta$ -Zellen verfügen in ihrer Zellmembran über nicht-insulinabhängige Glukosetransporter vom Typ Glut2 mit einer hohen Michaelis-Menten-Konstante für Glukose, die eine hohe Glukosekonzentration zur Halbsättigung dieser Glut2-Transporter erforderlich macht. Bei physiologischen Bedingungen bleibt somit gewährleistet, daß die Aufnahme von Glukose in die  $\beta$ -Zellen in Abhängigkeit von der Plasmaglukosekonzentration erfolgt und nicht durch die Enzymkinetik limitiert wird [36].

Bei der anschließenden Glykolyse entsteht ATP in Abhängigkeit zur Höhe des Plasmaglukosespiegels. ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) der  $\beta$ -Zelle, die aus jeweils 4 Untereinheiten von KIR6.2 und des Sulfonylharnstoff-Rezeptors 1 (SUR1) bestehen [29], schließen sich bei ansteigender intrazellulärer ATP-Konzentration und

depolarisieren die Zellmembran [3]. Daraufhin öffnen sich zellmembranständige, spannungsabhängige Kalziumkanäle bei einem Anstieg des Zellmembranpotentials und führen somit zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels und damit zur Exozytose der mit Insulin und C-Peptid gefüllten Speichergranula [4].

### 1.3 Glukagon und GLP-1

Das Peptidhormon Glukagon verhält sich durch seine Fähigkeit zur Steigerung v.a. der hepatischen Glukoneogenese und Glykogenolyse weitestgehend reziprok zu Insulin. Es ist Teil eines Präprohormons, welches neben dem Glukagon Aminosäuresequenzen für zwei weitere Hormone enthält, die in ihrer Struktur dem Glukagon homolog sind und als GLP-1 (glucagon-like-peptide) und GLP-2 bezeichnet werden. Nach proteolytischer Spaltung dieses Präprohormons entsteht in den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas Glukagon [36]. In ähnlicher Weise synthetisieren L-Zellen der intestinalen Mukosa aus diesem gemeinsamen Ausgangsmolekül das Inkretin GLP-1. Dieses bewirkt nach seiner Sekretion infolge einer Nahrungsaufnahme eine Steigerung der glukoseabhängigen Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle des Pankreas [32; 36].

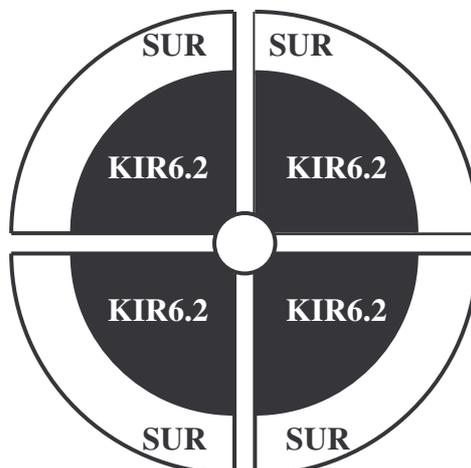
Wichtigster Stimulus für die Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen ist ein Abfall der Plasmaglukosekonzentration [36]. Über die Regulationsmechanismen der Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen ist bis heute weit weniger bekannt als z.B. über jene der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen. Bisher wurde für  $\alpha$ -Zellen von Ratten die Expression des Enzyms Glukokinase [26] und die Existenz von  $K_{ATP}$ -Kanälen beschrieben [11]. Denkbar wäre somit, daß ein hyperglykämieinduzierter intrazellulärer Anstieg der ATP-Konzentration ebenfalls für die Basisregulation der Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen eine Rolle spielt. Diese These zur Regulation der Glukagonsekretion wird allerdings nicht in allen Publikationen der letzten Jahre bestätigt [11]. Nach jüngeren Erkenntnissen scheinen  $\alpha$ -Zellen Aktionspotentiale auch nur in einem bestimmten Aktivitätsbereich

ihrer  $K_{ATP}$ -Kanäle erzeugen zu können [23]. Die fehlende Koexpression von Glut2-Transportern neben der Expression der Glukokinase ist vermutlich für das "glucose-sensing" der  $\alpha$ -Zellen von untergeordneter Bedeutung [26].

#### 1.4 ATP-sensitive Kaliumkanäle

ATP-sensitive Kaliumkanäle werden in der  $\beta$ - [7; 13] und der  $\alpha$ -Zelle [11] des Pankreas, aber auch in Skelett- [60] oder glatten Muskelzellen [61], Herzmuskelzellen [47], dem Gehirn [35] und der Hypophyse [10], sowie der Niere [28] exprimiert. Sie bilden ein Kopplungsglied zwischen metabolischen und elektrophysiologischen Steuerungsprozessen der Zellen und tragen damit zur Regulation verschiedener Zellfunktionen wie Hormonsekretion, Erregbarkeit von Neuronen oder Muskelzellen oder einer Zytoprotektion während einer Ischämie bei [41]. Klassische ATP-sensitive Kaliumkanäle sind Heterooktamere und bestehen aus jeweils vier homologen Untereinheiten eines Rezeptors für Sulfonylharnstoffe (SUR1, SUR2A oder SUR2B) [2] und vier zentral gelegenen KIR6.2-Untereinheiten, welche eine selektive Pore für das Elektrolyt Kalium bilden [40]. Für die Funktion des Kaliumkanals scheint diese stöchiometrische Anordnung von essentieller Bedeutung zu sein [42].

**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung eines ATP-sensitiven Kaliumkanals  $(SUR/KIR6.2)_4$



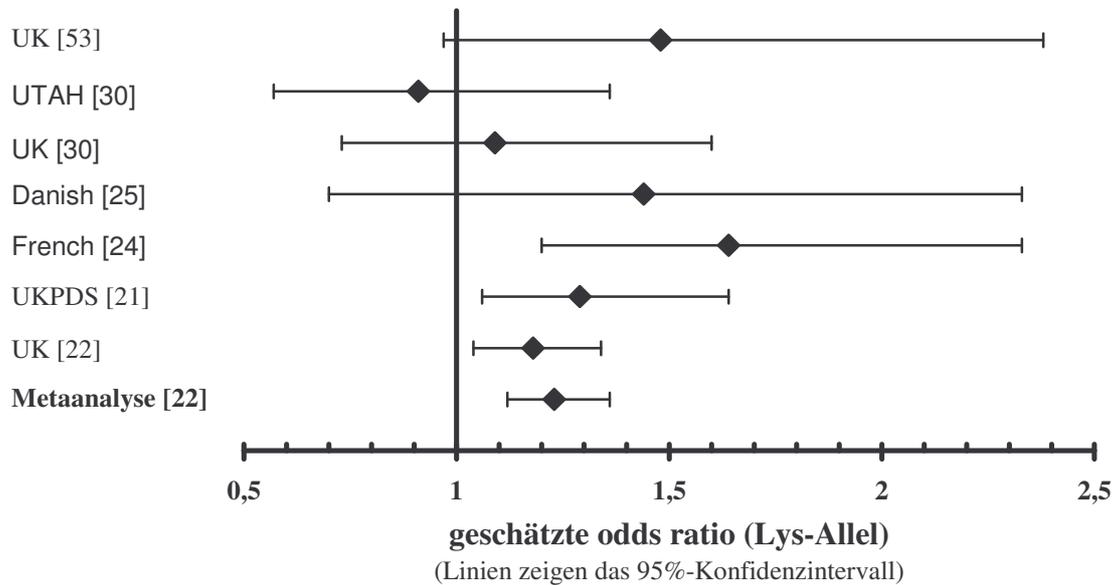
## 1.5 E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen

Genlokus des KIR6.2-Gens ist das menschliche Chromosom 11p15.1 [29]. Das kodierte Protein, die KIR6.2-Untereinheit eines ATP-sensitiven Kaliumkanals, besteht aus 390 Aminosäuren mit zwei Transmembrandomänen [40]. Im KIR6.2-Gen sind bis dato 3 Punktmutationen (E23K, L270V, I337V) beschrieben worden, denen ein potentieller Einfluß auf die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 zugeschrieben wird [24; 53]. L270V und I337V scheinen jedoch nach einer neueren Studie keine Auswirkungen auf die Eigenschaften von  $K_{ATP}$ -Kanäle zu besitzen [54].

Beim E23K-Polymorphismus handelt es sich um eine Substitution der Base Guanin durch die Base Adenin im Codon 23 mit der Folge, daß bei der Proteinbiosynthese die saure Aminosäure Glutamat (E) durch die basische Aminosäure Lysin (K) in der Nähe der ATP-Bindungsstelle [67] im zytoplasmatischen  $NH_2$ -Ende der Tertiärstruktur des KIR6.2-Proteins ersetzt wird (Lys<sup>23aag</sup> für Glu<sup>23gag</sup>) [30].

Aufgrund seiner hohen Allelfrequenz von ca. 34 % bei Kaukasiern [56] besitzt der E23K-Polymorphismus eine potentielle Bedeutung für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. Allerdings wurde ein tatsächlicher Einfluß von E23K auf die Glukosehomöostase in der Literatur bisher kontrovers diskutiert. In einigen Veröffentlichungen [25; 30; 53] wurde eine Verbindung des Lysin-Allels im Codon 23 des KIR6.2-Gens mit einem erhöhten Diabetesrisiko verneint. Eine Metaanalyse [24] dieser zuvor erwähnten 3 Studien, eine Teilstudie der UKPDS [21], eine vor kurzem erschienene Studie [22] und eine zusammenfassende Metaanalyse [22] aller oben erwähnten Studien konnten dagegen eine deutlich erhöhte Frequenz des homozygoten E23K-Polymorphismus in Zusammenhang mit einem Diabetes mellitus Typ 2 zeigen und lassen somit eine Verbindung von E23K mit der Pathogenese dieser Stoffwechselerkrankung vermuten.

**Abb. 1.2:** Assoziation des E23K-Polymorphismus mit Diabetes mellitus Typ 2 anhand der odds ratios der einzelnen Fall-Kontroll-Studien [22]



## 1.6 Problemstellung und Studienplanung

Bereits frühere Studien lassen eine Assoziation des E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen mit der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 vermuten. Mit der vorliegenden Studie soll ein möglicher Einfluß dieses Polymorphismus auf die Glukosehomöostase bei Personen untersucht werden, welche nicht an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind. Genetisch determinierte Stoffwechselveränderungen im Stadium vor der Manifestation einer Erkrankung sind häufig nur geringgradig und somit sehr schwierig nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Studie eine große Anzahl an Probanden mit einem oGTT bzw. hyperglykämischen Clamp untersucht, um mögliche Dysfunktionen als Folgen des E23K-Polymorphismus mit Einfluß auf die Glukosetoleranz, die Insulinsensitivität, die Regulation der Insulin- und / oder Glukagonsekretion nachweisen zu können und damit Hinweise auf die beteiligten Pathomechanismen zu erhalten, die eventuell zur Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 beitragen.

## **2 *Material und Methoden***

### **2.1 Rahmenbedingungen**

Die Versuche fanden im Rahmen des Projektes “Tübinger Familienstudie für Diabetes mellitus Typ 2” statt. Ein Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen lag vor. Alle Probanden wurden über die jeweiligen Untersuchungen, deren mögliche Risiken, ihre Durchführung sowie ihr Ziel mündlich und schriftlich im Vorfeld unterrichtet. Über genetische Untersuchungen wurde gesondert schriftlich wie mündlich aufgeklärt. Die Teilnehmer hatten zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit, ihr schriftlich erteiltes Einverständnis vollständig oder teilweise zurückzuziehen und die Untersuchung abubrechen.

### **2.2 Probanden**

#### **2.2.1 Teilnahmevoraussetzung**

Zur Teilnahme an einem oralen Glucosetoleranztest (oGTT) wurden Probanden gesucht, welche selbst nicht an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt waren. Eine diesbezüglich positive Familienanamnese bei ihnen war erwünscht, stellte jedoch kein obligates Einschlusskriterium dar. Als allgemeine Ausschlusskriterien wurden formuliert:

- diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM)
- positive GAD-Antikörperbestimmung
- Einnahme von Medikamenten, welche bekanntermaßen einen Einfluß auf die Blutzuckerregulation haben
- Erkrankungen des GI-Traktes, welche eine Malabsorption zur Folge hätten
- Schwangerschaft

- weniger als 3 Monate zurückliegende Entbindung und / oder Stillperiode

### 2.2.2 Teilnehmer

Die folgenden beiden Tabellen zeigen die Daten der Teilnehmer entsprechend ihres Genotyps im Codon 23 des KIR6.2-Gens. Sie sind als Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes ( $M \pm SEM$ ) angegeben.

**Tab. 2.1:** Daten der Teilnehmer am oralen Glukosetoleranztest (oGTT) nach ihrem Genotyp im Codon 23 des KIR6.2-Gens

Genotyp	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys	p*	p**
Anzahl (m/w)	111 (37/74)	151 (52/99)	36 (10/26)	1.00	0.68
IGT / NGT (n)	16 / 95	19 / 132	7 / 29	1.00	0.44
Alter (Jahre)	39 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2	0.24	0.37
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.0 $\pm$ 0.7	26.8 $\pm$ 0.5	27.0 $\pm$ 1.1	0.16	0.52
WHR <sup>+</sup>	0.87 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.01	0.85 $\pm$ 0.01	0.56	0.24
Plasmaglukose (mM)					
basal	5.1 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.04	5.1 $\pm$ 0.1	0.50	0.78
t = 120 min	5.9 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.3	0.23	0.23
Plasmainsulin (pM)					
basal	60 $\pm$ 5	60 $\pm$ 4	54 $\pm$ 9	0.83	0.57
t = 120 min	354 $\pm$ 30	362 $\pm$ 23	357 $\pm$ 55	0.85	0.96
Plasmaglukagon (ng/l)					
basal	63 $\pm$ 2	67 $\pm$ 2	66 $\pm$ 4	0.23	0.57
t = 120 min	51 $\pm$ 2	54 $\pm$ 2	55 $\pm$ 3	0.08	0.14

<sup>+</sup> waist-to-hip ratio = Taillen-Hüftumfang-Quotient

p\* Glu/Glu vs. X/Lys (t-Test), p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys (t-Test)

**Tab. 2.2:** Daten der Teilnehmer am hyperglykämischen Clamp nach ihrem Genotyp im Codon 23 des KIR6.2-Gens

Genotyp	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys	p*	p**
Anzahl (m/w)	31 (12/19)	31 (17/14)	13 (7/6)	0.18	0.36
IGT / NGT (n)	7 / 24	5 / 26	4 / 9	0.83	0.57
Alter (Jahre)	38 ± 3	39 ± 2	41 ± 3	0.59	0.48
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.1 ± 1.0	26.1 ± 0.7	24.8 ± 0.8	0.56	0.84
WHR <sup>+</sup>	0.84 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.86 ± 0.02	0.16	0.33
Plasmaglukose <sup>#</sup> (mM)	5.1 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.1 ± 0.2	0.21	0.88
Plasmainsulin <sup>#</sup> (pM)	52 ± 8	44 ± 4	38 ± 5	0.19	0.26
Plasmaglukagon <sup>#</sup> (ng/l)	68 ± 3	68 ± 4	60 ± 4	0.58	0.13

<sup>+</sup> waist-to-hip ratio = Taillen-Hüftumfang-Quotient

<sup>#</sup> angegeben sind die jeweiligen basalen Konzentrationen

p\* Glu/Glu vs. X/Lys (t-Test), p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys (t-Test)

## 2.3 Versuchsablauf

### 2.3.1 Oraler Glucosetoleranztest (oGTT)

Alle Teilnehmer hatten vor Beginn des oGTT eine Nahrungskarenz von mindestens 10 Stunden eingehalten. In den Tagen zuvor waren sie aufgefordert, sich entsprechend ihren üblichen Gewohnheiten zu ernähren. Der Test fand jeweils morgens im Zeitraum von 8.30 Uhr bis 12.00 Uhr statt. Rauchen, Nahrungsaufnahme und körperliche Anstrengungen wurden von den Probanden in diesem Zeitraum vermieden.

Zu Beginn erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung der basalen Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin, C-Peptid und Glukagon. Nach oraler

Gabe von 75 g Glucose in 300 ml Wasser, erfolgten im Abstand von jeweils 30 Minuten bis zu einer Gesamtdauer von 120 Minuten weitere Blutentnahmen zur Bestimmung der oben genannten Parameter.

### 2.3.2 Hyperglykämischer Clamp

Dieser Test wurde ebenfalls an einem Vormittag durchgeführt. Die Probanden waren aufgefordert, ihre üblichen Essgewohnheiten im Vorfeld nicht zu verändern und 12 Stunden vor Testbeginn eine Nahrungskarenz einzuhalten. Rauchen, Nahrungsaufnahme und körperliche Anstrengungen waren während der Testdurchführung nicht gestattet.

Jeder Proband erhielt zwei periphere Venenverweilkatheter. Zur Blutabnahme wurde eine Vene am Handrücken punktiert. Eine Arterialisierung des venösen Blutes wurde mit der "heated-hand"-Technik erreicht, für welche zwei Heizkissen verwendet wurden [39]. Für die im folgenden aufgeführten Infusionen wurde eine Vene des kontralateralen Armes punktiert.

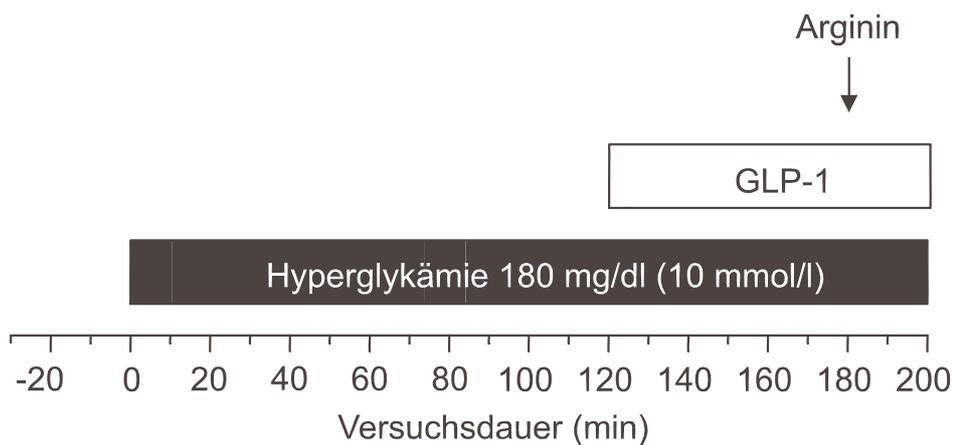
Um zu Beginn den Plasmaglukosespiegel auf 10 mmol/l anzuheben, wurde eine 20%-ige Glukoselösung als Bolus ( $\text{Glukosebolus (mg)} = \text{Körpergewicht (kg)} \cdot \text{gewünschtem Anstieg der Blutglukosekonzentration (mg/dl)} \cdot 1.5$ ) über 1 Minute injiziert. Für die Dauer der Untersuchung wurde der Plasmaglukosespiegel durch Anpassung einer kontinuierlichen intravenösen Glukoseinfusion bei 10 mmol/l fixiert (engl.: to clamp = (ein)spannen, (fest)klemmen). Zur Kontrolle erfolgte alle 5 Minuten die Bestimmung des Plasmaglukosespiegels.

Nach 120 Minuten erfolgte die intravenöse Gabe des Inkretins GLP-1 (glucagon-like-peptide) zunächst als Bolus ( $\text{Bolus} = 0.6 \text{ pmol/kg KG}$ ) und anschließend als intravenöse Erhaltungsdosis ( $\text{Infusionsrate} = 1.5 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) für die Dauer weiterer 80

Minuten. Zum Zeitpunkt 180 Minuten wurde zusätzlich ein intravenöser Bolus von 5g der Aminosäure Arginin über 45 Sekunden appliziert.

Blutentnahmen zur Bestimmung der Insulin-, C-Peptid-, Glukagon- und Glukosekonzentrationen im Plasma erfolgten nach -30, -15, -5, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 182.5, 185, 187.5, 190 und 200 Minuten. Mittelwerte der Konzentrationen zu den Zeitpunkten  $t = -30$  min,  $t = -15$  min und  $t = -5$  min wurden als basale Konzentrationen definiert.

**Abb. 2.1:** Versuchsaufbau des hyperglykämischen Clamps



## 2.4 Verwendete Medikamente

### 2.4.1 Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)

<i>Glukoselösung:</i>	Name:	Dextro <sup>®</sup> O.G-T.
	Hersteller:	F. Hoffmann-La Roche AG, Mannheim

## 2.4.2 Hyperglykämischer Clamp

*Kochsalzlösung:* Name: NaCl-Lösung 0,9%  
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,  
Bad Homburg  
Verwendung: Trägermedium für GLP-1  
Lösung

*Glukoselösung:* Name: Glucosteril® 20%  
Hersteller: Fresenius Kabi GmbH,  
Bad Homburg

*Glukagon-like-Peptide-1 (7-36 Amid):* Hersteller: Polypeptide Laboratories  
GmbH, Wolfenbüttel

Trockensubstanz wurde für Infusionszwecke in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

*1 M-L-Argininhydrochlorid-Lösung:* Hersteller: Pharmacia & Upjohn GmbH,  
Erlangen

## 2.5 Analytik

### 2.5.1 Aufbereitung der Blutentnahmen

Die Bestimmung der Plasmaglukose erfolgte jeweils sofort nach der Blutentnahme. Für die Bestimmung von Insulin, Glukagon und C-Peptid wurde EDTA-Blut abgenommen. Den Proben für die Plasmaglukagonbestimmung wurde zusätzlich der Proteaseninhibitor Trasylol® (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) zugefügt. Alle Proben

wurden sofort auf Eis gelagert und nach Testende bei 4°C und 4000 upm 7 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde bis zur jeweiligen Bestimmung bei -20°C eingefroren.

### 2.5.2 Verfahren zur Bestimmung der einzelnen Blutparameter

Die Bestimmung der folgenden Parameter im Plasma erfolgte bei oGTT und hyperglykämischen Clamp unter Verwendung der aufgeführten Testverfahren:

*Glukose:*       Gerät:            YSI 2300 STAT plus  
                  Hersteller:    Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA  
                  Testprinzip:    Enzymatisches Testverfahren (Glukose-Oxidase)

*Insulin:*       Hersteller:    Abbott Laboratories, Tokio, Japan  
                  Testprinzip:    Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA)

*Glukagon:*     Hersteller:    Linco Research, St. Charles, USA  
                  Testprinzip:    Radioimmunoassay (RIA)

*C-Peptid:*     Hersteller:    Byk-Sangtec, Dietzenbach  
                  Testprinzip:    Radioimmunoassay (RIA)

### 2.5.3 Genotypisierung

Nach Amplifikation von DNA-Fragmenten im Bereich des KIR6.2-Gens mit spezifischen Primern durch PCR, wurde das Vorliegen des Polymorphismus mittels bidirektionaler Sequenzierung untersucht.

*Sequenzierung:*   Testname:        ABI PRISM 310  
                  Hersteller:    Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
                  Testprinzip:    Dye terminator cycle sequencing ready kit

*Primer:* Kodierender Strang: 5'-GAA TAC GTG CTG ACA CGC CT-3'  
 Komplementärstrang: 5'-CAG CTG CAC AGG AAG AAG GAC AT-3'

## 2.6 Berechnungen

### 2.6.1 Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)

*Insulinsensitivität:* wurde nach dem von Matsuda vorgeschlagenen Index geschätzt [38]:

$$\text{Insulinsensitivität} = \frac{10000}{\sqrt{(\text{BZ}_{\text{basal}} \cdot \text{Ins}_{\text{basal}}) \cdot (\text{Mean}_{\text{BZ}} \cdot \text{Mean}_{\text{Ins}})}}$$

$\text{BZ}_{\text{basal}}$  = Plasmaglukosekonzentration basal (mmol/l)

$\text{Ins}_{\text{basal}}$  = Plasmainsulinkonzentration basal (pmol/l)

$\text{Mean}_{\text{BZ}}$  = mittlere Plasmaglukosekonzentration (mmol/l)

$\text{Mean}_{\text{Ins}}$  = mittlere Plasmainsulinkonzentration (pmol/l)

*Glukagonssuppression ( $\Delta \text{Gluk}_x$ ):*  $\Delta \text{Gluk} = \text{Gluk}_0 - \text{Gluk}_x$

Für die Plasmaglukose (BZ)-, Plasmainsulin (Ins)- und Plasmaglukagonverläufe (Gluk) wurden teilweise die  $\text{AUC}_x$  und  $\text{AUC}_{\text{inc}_x}$  berechnet.  $\text{AUC}_x$  beschreibt die Fläche unter der jeweiligen oGTT-Verlaufskurve, welche durch Addition einzelner, trapezförmiger Teilflächen ermittelt wurde. Die inkrementale Fläche wurde als  $\text{AUC}_{\text{inc}_x}$  bezeichnet.

$$\text{AUC}_x = 30 \cdot \left( \frac{1}{2} X_0 \cdot X_{30} \cdot X_{60} \cdot X_{90} \cdot \frac{1}{2} X_{120} \right)$$

$$\text{AUC}_{\text{inc}_x} = \text{AUC}_x - 4 \cdot 30 \cdot X_0$$

### 2.6.2 Hyperglykämischer Clamp

Die Insulin ( $Ins_x$ )-, C-Peptid- ( $CP_x$ ) und Glukagonkonzentrationen ( $Gluk_x$ ) wurden in die in Tabelle 2.3 aufgeführten Phasen gegliedert und als Mittelwerte der jeweiligen Plasmakonzentrationen für das entsprechende Zeitintervall angegeben [20]:

**Tab. 2.3:** Gliederung der Insulin- ( $Ins_x$ ), C-Peptid- ( $CP_x$ )- und Glukagonkonzentrationen ( $Gluk_x$ ) in verschiedene Phasen während des hyperglykämischen Clamps

Phase	Zeitintervall
1. Phase ( $X_{Pha1}$ ):	2.5 bis 10 Minuten
2. Phase ( $X_{Pha2}$ ):	80 bis 120 Minuten
GLP-1 1. Phase ( $X_{GLP\_P1}$ ):	125 bis 130 Minuten
GLP-1 2. Phase ( $X_{GLP\_P2}$ ):	160 bis 180 Minuten
Maximale Insulinsekretionsphase ( $X_{Ins\_max}$ ):	182.5 bis 190 Minuten

*Insulinsekretionsrate (ISR):* wurde mittels Dekonvolution aus Plasma-C-Peptid-Konzentrationen und standardisierten kinetischen Parametern errechnet [15; 69].

*Insulinsensitivität:* wurde als Insulinsensitivitätsindex (ISI) für das Zeitintervall 80 bis 120 Minuten bestimmt [20]:

$$ISI = \frac{\text{mittlere Glukoseinfusionsrate } (\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})}{\text{Plasmaglukosekonzentration (mmol/l)}}$$

$$\text{Glukagonsuppression} = \frac{\text{Gluk}_{\text{Pha1}}}{\text{Gluk}_{\text{basal}}}$$

$$\text{Gluk}_{\text{basal}} = \text{Plasmaglukagonspiegel basal (ng/l)}$$

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software JMP (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Soweit nicht anders angegeben, werden die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( $M \pm \text{SEM}$ ) dargestellt. Um eine Normalverteilung für statistische Analysen zu erzielen, wurden nicht normalverteilte Parameter logarithmiert. Heterozygote (Glu/Lys) und homozygote (Lys/Lys) Träger des E23K-Polymorphismus wurden zu einer Gruppe (X/Lys) zusammengefaßt. Statistische Vergleiche zwischen Wildtyp (Glu/Glu) und X/Lys bzw. Wildtyp und homozygotem Polymorphismus (Lys/Lys) erfolgten, sofern nicht anders angegeben, mit Hilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben nach Student. Ein p-Wert  $\leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant bewertet.

### 3 *Ergebnisse*

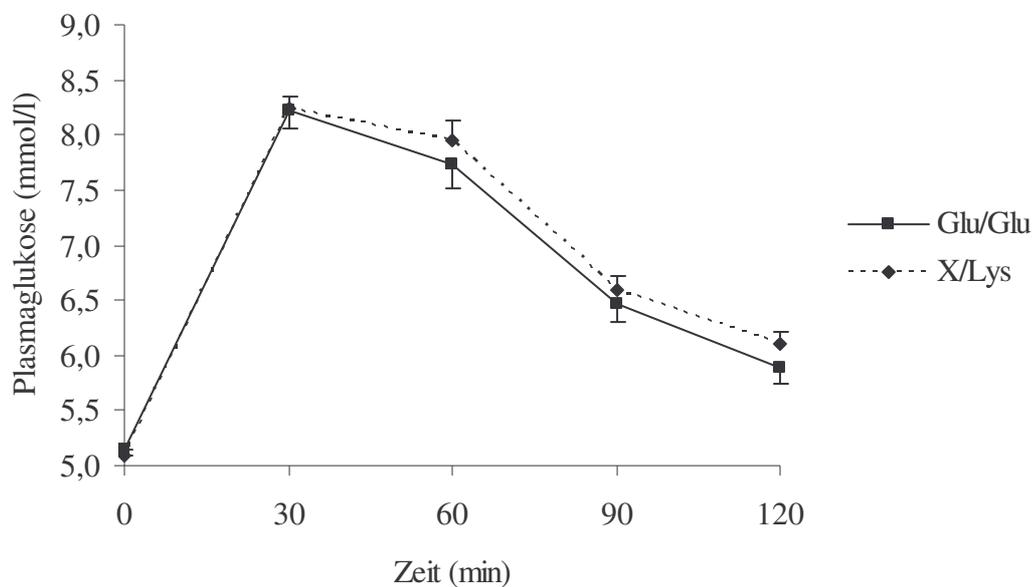
#### 3.1 **Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)**

##### 3.1.1 **Plasmaglukose**

Die basalen Plasmaglukosekonzentrationen zeigen keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0.50$ ) zwischen den beiden Gruppen Glu/Glu und X/Lys (s. Tab 5.1).

Nach Glukosebelastung steigen die Plasmaglukosespiegel bei beiden Gruppen zunächst auf ein Maximum bei  $t = 30$  min ( $8.2 \pm 0.2$  mmol/l in Glu/Glu vs.  $8.1 \pm 0.1$  mmol/l in X/Lys,  $p = 0.93$ ) und fallen anschließend kontinuierlich auf Werte kleiner 7 mmol/l nach  $t = 120$  min ( $p = 0.23$ ) ab (s. Tab. 5.1).

**Abb. 3.1:** Plasmaglukosekonzentrationen im oGTT

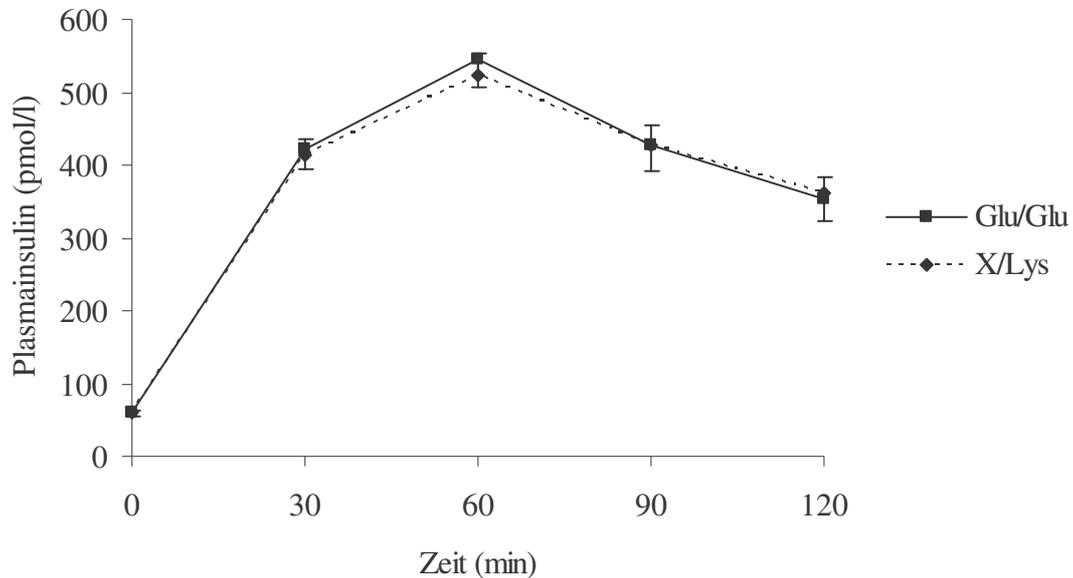


Dabei lässt sich jedoch ein signifikant größerer Anstieg der Plasmaglukosekonzentration, berechnet als inkrementale Fläche unter der Plasmaglukosekurve ( $AUC_{inc\_BZ}$ ), nach Korrektur für die Kovariaten Alter, BMI und WHR bei Trägern des Lys-Allels im Codon 23 des KIR6.2-Gen im Vergleich zur Glu/Glu-Gruppe ( $221 \pm 14 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in Glu/Glu vs.  $240 \pm 11 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in X/Lys,  $p = 0.034$ ) feststellen. Dieser Unterschied zeigt sich insbesondere auch bei der Untergruppe jener Teilnehmer, welche am oGTT und am hyperglykämischen Clamp teilnahmen ( $196 \pm 32 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in Glu/Glu vs.  $298 \pm 26 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in X/Lys,  $p = 0.016$ ).

### 3.1.2 Plasmainsulin

Die Plasmainsulinkonzentrationen unterscheiden sich signifikant weder zu Beginn in den basalen ( $p = 0.83$ ) noch in den maximalen Konzentrationen bei  $t = 60 \text{ min}$  ( $546 \pm 38 \text{ pmol/l}$  in Glu/Glu vs.  $532 \pm 32 \text{ pmol/l}$  in X/Lys,  $p = 0.65$ ) zwischen Trägern des E23K-Polymorphismus und der Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf lassen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen (s. Tab. 5.2).

Gleiches gilt für die Fläche unter der Plasmainsulinkurve ( $AUC_{Ins}$ ) als Ausdruck des Anstiegs der Plasmainsulinkonzentration. Sie unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant nach Korrektur für die Kovariate BMI zwischen Trägern des Polymorphismus und homozygoten Wildtyp-Allelträgern ( $48.1 \pm 3.2 \text{ nmol/l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in X/Lys vs.  $47.2 \pm 2.4 \text{ nmol/l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in Glu/Glu,  $p = 0.45$ ).

**Abb. 3.2:** Plasmainsulinkonzentrationen im oGTT

### 3.1.3 Insulinsensitivität

Die Insulinsensitivität wurde wie beschrieben mit der Formel nach Matsuda aus den Plasmaglukose- und Plasmainsulिनwerten des oGTT berechnet. Nach Korrektur für die Kovariaten Alter, BMI und WHR zeigen sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen Trägern des E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen und der Glu/Glu-Gruppe ( $17.9 \pm 1.0$  U in Glu/Glu vs.  $17.3 \pm 0.8$  U in X/Lys,  $p = 0.52$ ).

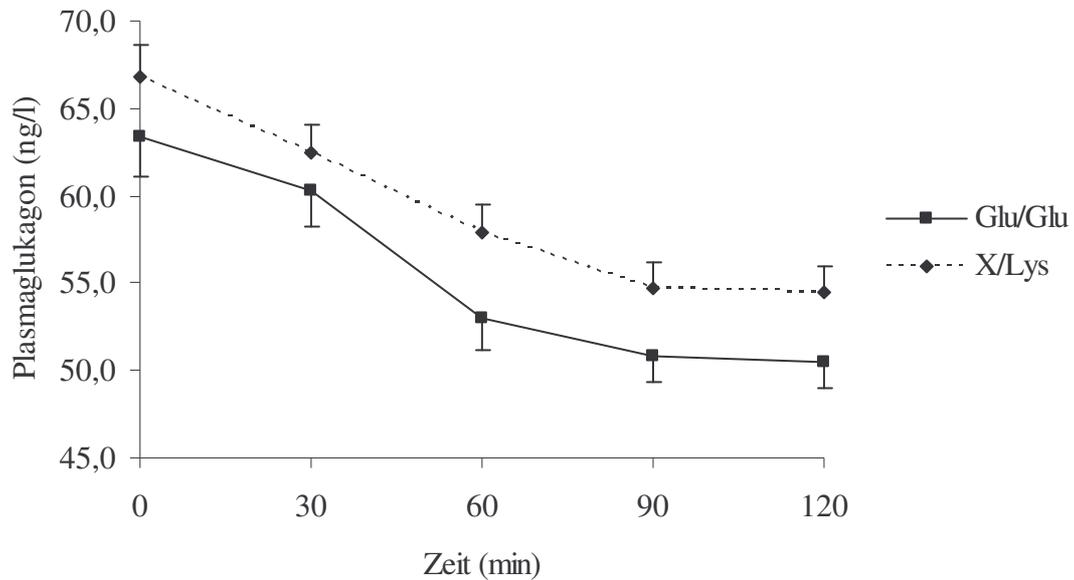
### 3.1.4 Plasmaglukagon

Ebenfalls die basalen Glukagonwerte lassen bei Trägern des Polymorphismus sowie der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0.23$ ) erkennen. Im weiteren Verlauf sinken die Glukagonwerte bei beiden Gruppen zunächst ohne statistisch signifikanten Unterschied kontinuierlich ab. Nach  $t = 60$  min läßt sich ein kleiner Unterschied zwischen Glu/Glu und X/Lys ( $53 \pm 2$  ng/l in Glu/Glu vs.  $58 \pm 2$  ng/l in

X/Lys,  $p = 0.044$ ) ermitteln, welcher jedoch im weiteren Verlauf nach  $t = 90$  min ( $p = 0.09$ ) und  $t = 120$  min ( $p = 0.08$ ) nicht mehr signifikant ist (s. Tab. 5.3).

Allerdings zeigt sich bei Trägern des Polymorphismus im KIR6.2-Gen nach Korrektur für die Kovariaten Alter, BMI und WHR eine signifikant vergrößerte  $AUC_{\text{Glu}}$  ( $6631 \pm 214 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in Glu/Glu vs.  $7070 \pm 165 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in X/Lys,  $p = 0.023$ ) im Vergleich zum homozygoten Wildtyp.

**Abb. 3.3:** Plasmaglukagonkonzentrationen im oGTT

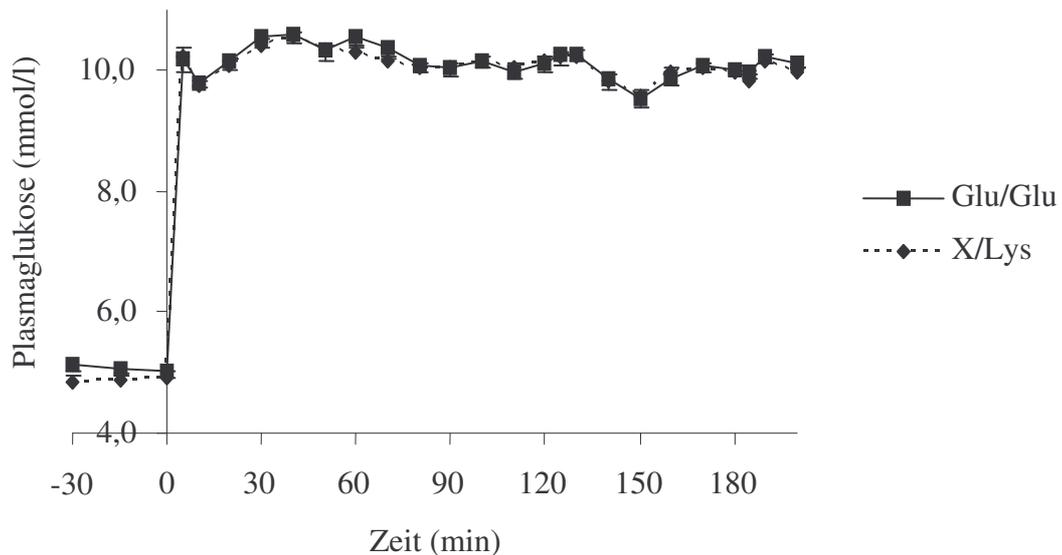


## 3.2 Hyperglykämischer Clamp

### 3.2.1 Plasmaglukose

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, wurde der Plasmaglukosespiegel während des hyperglykämischen Clamp auf den Zielwert 10 mmol/l eingestellt ( $10.14 \pm 0.04$  mmol/l in Glu/Glu vs.  $10.09 \pm 0.03$  mmol/l in X/Lys,  $p = 0.37$ ).

**Abb. 3.4:** Plasmaglukosekonzentrationen im hyperglykämischen Clamp

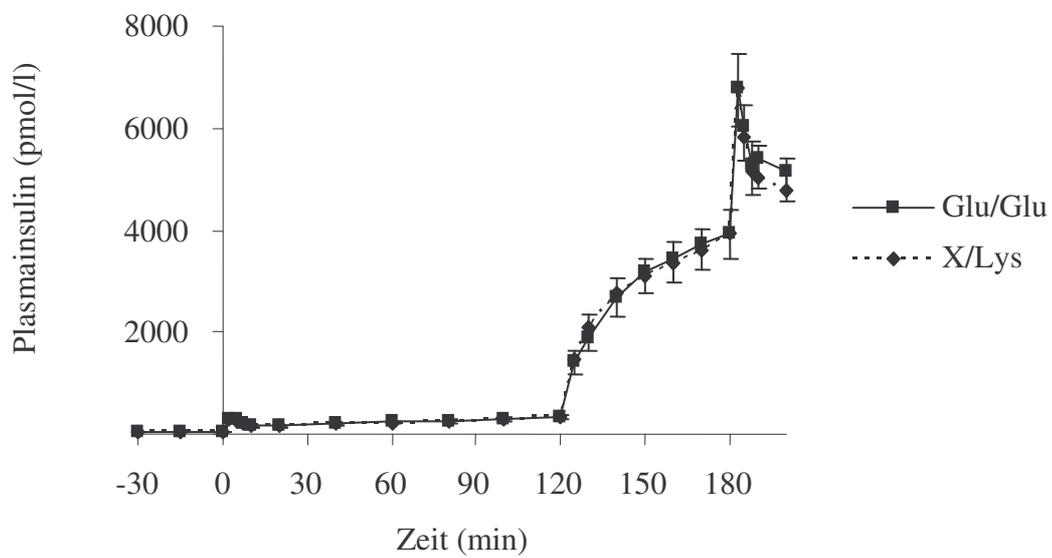


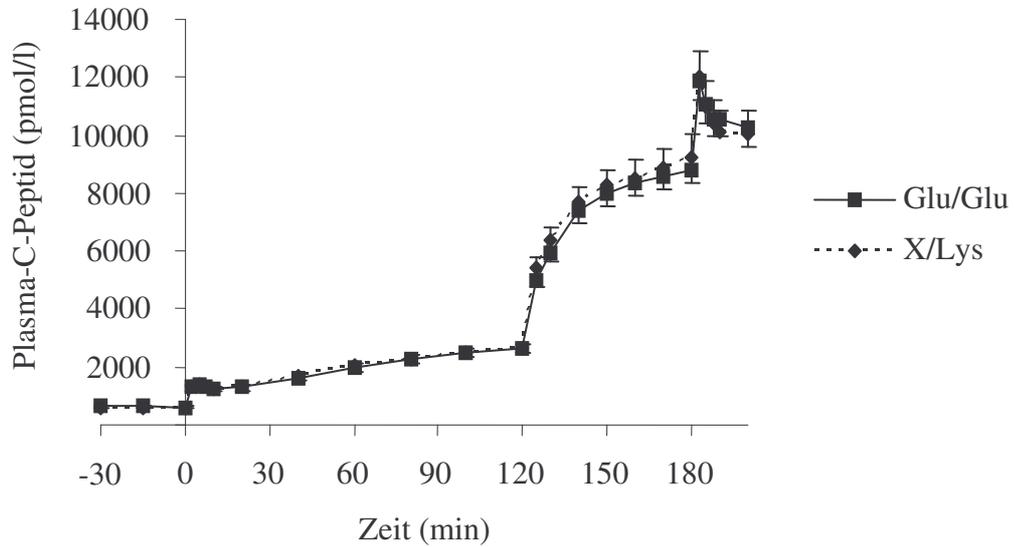
### 3.2.2 Plasmainsulिन und Plasma-C-Peptid

Weder bei den basalen Konzentrationen ( $\text{Ins}_{\text{basal}}$   $p = 0.19$ ,  $\text{CP}_{\text{basal}}$   $p = 0.58$ ) noch in der ersten ( $\text{Ins}_{\text{Pha1}}$   $p = 0.76$ ,  $\text{CP}_{\text{Pha1}}$   $p = 0.98$ ) und zweiten Phase ( $\text{Ins}_{\text{Pha2}}$   $p = 0.89$ ,  $\text{CP}_{\text{Pha2}}$   $p = 0.97$ ), als Folge der andauernden Hyperglykämie, können signifikante Unterschiede der Insulinantwort zwischen Trägern des E23K-Polymorphismus und Wildtyp-Allelträgern festgestellt werden (s. Tab. 5.4 und Tab. 5.6).

Nach Kombinationsstimulation der Insulinsekretion durch Hyperglykämie, GLP-1 und Arginin lassen sich für die resultierenden, maximalen Plasmainsulinkonzentrationen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ( $\text{Ins}_{\text{Ins\_max}}$   $p = 0.84$ ,  $\text{CP}_{\text{Ins\_max}}$   $p = 0.91$ ) zwischen den beiden Gruppen Glu/Glu und X/Lys erkennen.

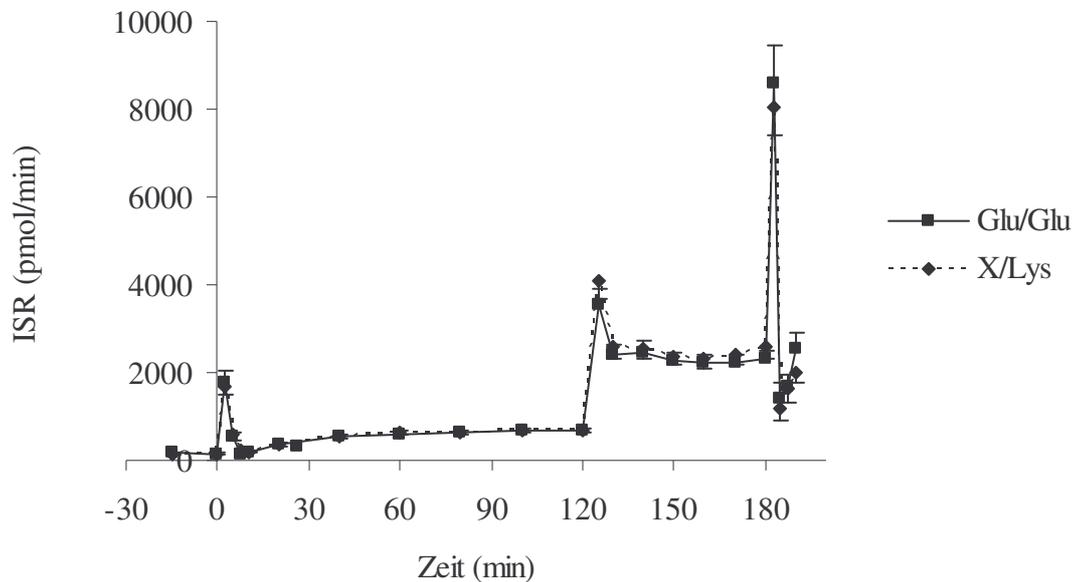
**Abb. 3.5:** Plasmainsulinkonzentrationen im hyperglykämischen Clamp



**Abb. 3.6:** Plasma-C-Peptidkonzentrationen im hyperglykämischen Clamp

### 3.2.3 Insulinsekretion

Die Insulinsekretionsraten (ISR) zeigen jeweils zu Beginn der einzelnen Stimulationsstufen einen peak. Weder für  $ISR_{\text{Pha1}}$  ( $p = 0.85$ ),  $ISR_{\text{GLP}_1}$  ( $p = 0.38$ ) noch für die maximale Insulinsekretionsrate ( $ISR_{\text{Ins}_{\text{max}}}$ ,  $p = 0.38$ ) lassen sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen Trägern des E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen und der Kontrollgruppe mit homozygotem Wildtypallel nachweisen (s. Tab. 5.5).

**Abb. 3.7:** Insulinsekretionsraten (ISR) im hyperglykämischen Clamp

### 3.2.4 Insulinsensitivität

Auch der Insulinsensitivitätsindex (ISI) läßt nach Korrektur für die Kovariate BMI keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Glu/Glu und X/Lys ( $0.15 \pm 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{l}$  in Glu/Glu vs.  $0.16 \pm 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{l}$  in X/Lys,  $p = 0.51$ ) erkennen.

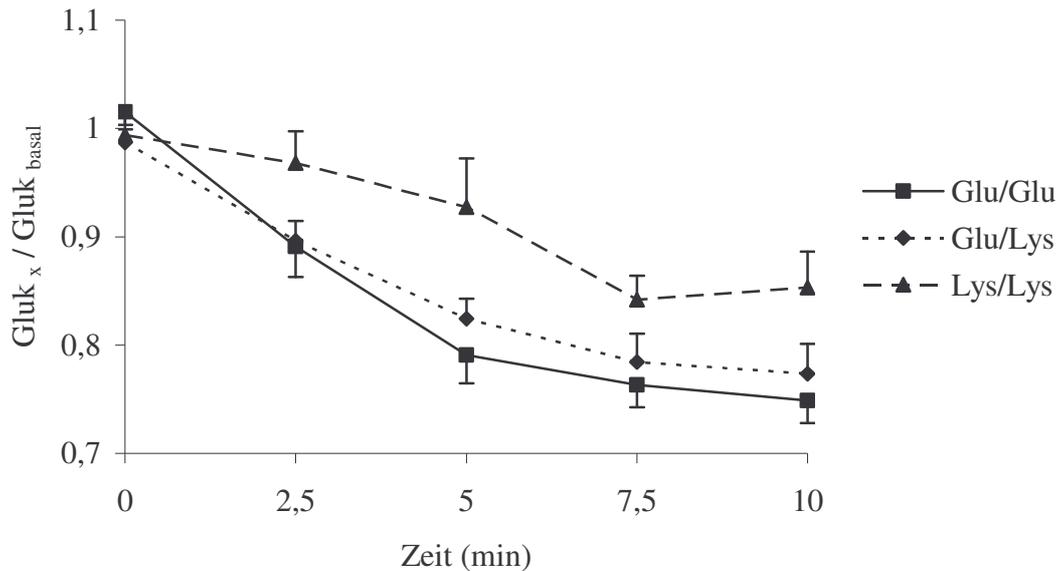
### 3.2.5 Plasmaglukagon

Die basalen Plasmaglukagonkonzentrationen zeigen keinen Unterschied zwischen Trägern des Lys-Allels und homozygoten Wildtyp-Allelträgern im KIR6.2-Gen ( $68 \pm 3 \text{ ng/l}$  in Glu/Glu vs.  $68 \pm 4 \text{ ng/l}$  in X/Lys,  $p = 0.58$ ).

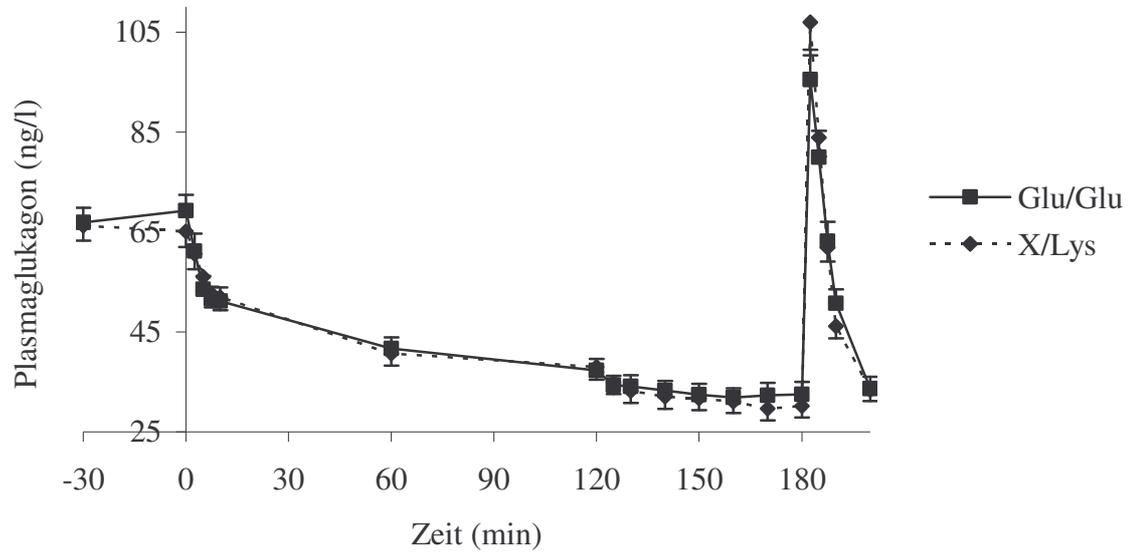
Allerdings läßt sich in Phase 1, als Folge der Hyperglykämie, eine statistisch signifikant verminderte Glukagonsuppression bei homozygoten Trägern des E23K-

Polymorphismus im KIR6.2-Gen gegenüber dem Wildtyp ( $20 \pm 2 \%$  in Glu/Glu,  $18 \pm 2 \%$  in Glu/Lys,  $10 \pm 3 \%$  in Lys/Lys,  $p = 0.01$  ANOVA) nachweisen (s. Tab. 5.8).

**Abb. 3.8:** Plasmaglukagonkonzentrationen in Relation zu  $\text{Gluk}_{\text{basal}}$  in Phase 1



In den anschließenden vier Phasen fallen die Plasmaglukagonkonzentrationen bei Trägern des Lys-Allels im KIR6.2-Gen und der Kontrollgruppe infolge der anhaltenden Hyperglykämie und Stimulation durch GLP-1 weiter ab, während die maximale Plasmaglukagonkonzentration aus der zusätzlichen Applikation von Arginin resultiert. Dabei zeigt sich in keiner dieser Phasen ein weiterer statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen Glu/Glu und X/Lys ( $\text{Gluk}_{\text{Pha2}}$   $p = 0.84$ ,  $\text{Gluk}_{\text{GLP\_P1}}$   $p = 0.95$ ,  $\text{Gluk}_{\text{GLP\_P2}}$   $p = 0.54$ ,  $\text{Gluk}_{\text{Ins\_max}}$   $p = 0.66$ ) (s. Tab. 5.7).

**Abb. 3.9:** Plasmaglukagonkonzentrationen im hyperglykämischen Clamp

## 4 *Diskussion*

### 4.1 **Plasmaglukose**

Die primäre Fragestellung bei der Suche nach einer möglichen ätiologischen Bedeutung einer Variablen für die Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 richtet sich zunächst auf einen eventuellen Nachweis einer reduzierten Glukosetoleranz in Abhängigkeit zu der zu untersuchenden Veränderung. Bei Trägern des E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen lassen sich in dieser Studie erwartungsgemäß im Vergleich zu einer Kontrollgruppe keine quantitativ unterschiedlichen absoluten Plasmaglukosekonzentrationen während des oGTT nachweisen, da ein manifester Diabetes mellitus Typ 2 als Ausschlusskriterium galt. Insbesondere liegen die Plasmaglukosekonzentrationen für die Zeitpunkte  $t = 0$  min und  $t = 120$  min im Bereich der Norm.

Allerdings zeigt sich auch in dieser Studie an nicht an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Personen eine deutlich erhöhte inkrementale AUC ( $AUC_{inc\_BZ}$ ) als Hinweis auf eine eingeschränkte Glukosetoleranz bei Trägern des Lys-Allels im Codon 23 des KIR6.2-Gens im Vergleich zum homozygoten Wildtyp. Damit steht dieses Ergebnis im Einklang mit früheren Studien [21; 24] bzw. einer Metaanalyse [22], die eine Verbindung des homozygoten E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen zur Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 zeigen konnten.

Herauszufinden sind nun die möglichen Pathomechanismen als Folge von E23K, die zu dieser eingeschränkten Glukosetoleranz führen. Das theoretisch erwägare Spektrum an Mechanismen ist groß, da  $K_{ATP}$ -Kanäle auf unterschiedlichen Ebenen in zahlreiche Regulationen der Glukosehomöostase eingebunden sind.

## 4.2 Insulinsekretion

Wie bereits erwähnt wurde, nehmen ATP-sensitive Kaliumkanäle eine zentrale Stellung in der Kaskade für die Regulation der Insulinsekretion ein [8; 42]. Bei einem in der Theorie naheliegenden Pathomechanismus des E23K-Polymorphismus könnte es sich somit um eine insuffiziente Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas handeln.

Im Tierversuch wird diese Vermutung gestützt durch zwei Studien [43; 44] an KIR6.2 knock-out Mäusen bzw. an Mäusen, die eine dominant-negative Mutation im KIR6.2-Gen der Kaliumkanäle der Inselzellen des Pankreas exprimieren. Beide Gruppen zeigten im Vergleich zu einer Kontrollpopulation mit homozygotem Wildtypallel im KIR6.2-Gen einen mit dem Lebensalter der Tiere zunehmend erhöhten Blutglukosespiegel. Möglicherweise ist diese Entwicklung die Folge der ebenfalls in diesen Studien beobachteten verminderten Insulinsekretion in beiden Populationen der gentechnisch veränderten Tiere.

Man muß sich jedoch fragen, in wie weit diese Ergebnisse aus Tierversuchen auch für den Menschen zutreffen. Um eine maximale Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen zu erreichen, wurde für die vorliegende Studie ein hyperglykämischer Clamp durch die parenterale Applikation des Inkretins GLP-1 und der Aminosäure Arginin erweitert. Diese kombinierte Stimulation der Insulinsekretion ist nahezu identisch mit einer in vivo Bestimmung der totalen funktionellen Insulinkapazität pankreatischer  $\beta$ -Zellen [20].

Im Gegensatz zum Tierversuch zeigen sich im Rahmen dieses modifizierten hyperglykämischen Clamps jedoch keine Unterschiede in der Insulin- sowie C-Peptidsekretion zwischen Trägern des E23K-Polymorphismus und der Kontrollgruppe. Dies gilt insbesondere für die Phase der zu erwartenden maximalen Sekretion von Insulin und C-Peptid infolge der erwähnten dreifach kombinierten Stimulation. Somit erscheint es nach den Resultaten dieser Studie unwahrscheinlich, daß das Lys-Allel im

KIR6.2-Gen durch eine insuffiziente glukoseinduzierte Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen im normoinsulinämischen Bereich sowie unter Bedingungen eines deutlich gesteigerten Insulinbedarfes, z.B. bei peripherer Insulinresistenz, beim Menschen zu einer gestörten Glukosetoleranz führt oder zumindest beiträgt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt ebenfalls eine in den letzten Jahren erschienene niederländische Studie, die auch keine Assoziation des E23K-Polymorphismus zu einer insuffizienten glukosestimulierten Insulinsekretion sah [64].

### 4.3 Periphere Insulinwirkung

Vorausgesetzt die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen bleibt zunächst phänotypisch unbetroffen von den Auswirkungen des E23K-Polymorphismus, so stellt sich als nächstes die Frage nach der peripheren Wirkung des Insulins. Dabei ist von Bedeutung, daß die Gesamtheit der Skelettmuskelzellen den quantitativ größten Glukosebedarf des Körpers haben [59]. ATP-sensitive Kaliumkanäle scheinen ebenfalls für die insulinabhängige Glukoseaufnahme in diese Zellen eine Rolle zu spielen [51; 70].

Interessanterweise konnte eine frühere Studie am Menschen sogar einen erhöhten Insulinsensitivitätsindex bei homozygotem Lys-Allel im Codon 23 des KIR6.2-Gens nachweisen [25]. Ähnliches zeigte sich im Tierversuch bei einer Studie an KIR6.2 knock-out Mäusen, die einen gesteigerten plasmaglukosesenkenden Effekt des Insulins im Vergleich zu einer Kontrollpopulation belegen konnte [43].

Allerdings lassen sich die Resultate dieser beiden Veröffentlichungen in der vorliegenden Studie nicht replizieren. Die periphere Insulinwirkung zeigt weder in den einzelnen Phasen des modifizierten hyperglykämischen Clamps noch im oGTT Unterschiede zwischen Trägern des E23K-Polymorphismus und einer Kontrollgruppe. Demnach scheint das Lys-Allel in Position 23 des KIR6.2-Gens nach den Ergebnissen dieser Studie nicht zu elektrophysiologischen Dysfunktionen am Sarkolemm zu führen.

Eine verminderte periphere Insulinwirkung als Pathomechanismus von E23K ist somit eher auszuschließen.

#### 4.4 Plasmaglukagon

Weiter ist bekannt, daß eine insuffiziente hyperglykämische Suppression der  $\alpha$ -zellulären Glukagonsekretion ebenfalls zu einer gestörten Glukosetoleranz beiträgt [34; 58]. Unter den Bedingungen des modifizierten hyperglykämischen Clamps läßt sich interessanterweise eine derartig reduzierte Suppression der Glukagonsekretion bei homozygotem E23K-Polymorphismus in Phase 1 nachweisen. Somit erinnert dieses Resultat an bereits erwähnte Studien [21; 22; 24], die eine Assoziation des homozygoten E23K-Polymorphismus zum Diabetes mellitus Typ 2 zeigen konnten.

Entsprechend scheint sich diese Veränderung ebenfalls in den Ergebnissen des oGTT widerzuspiegeln. Als möglicher Ausdruck einer reduzierten Glukagonsuppression läßt sich hier eine statistisch signifikant vergrößerte  $AUC_{\text{Gluk}}$  bei Trägern des Polymorphismus im Vergleich zur Kontrollgruppe mit homozygotem Wildtypallel im KIR6.2-Gen nachweisen. Jedoch ist dieses Ergebnis des oGTT in Bezug auf die Glukagonsuppression kritisch zu bewerten, da die Plasmaglukosespiegel während des oGTT, im Gegensatz zum hyperglykämischen Clamp, unterschiedlich zwischen den einzelnen Genotypen sind.

## 4.5 Einfluß des homozygoten E23K-Polymorphismus auf die Funktion ATP-sensitiver Kaliumkanäle

### 4.5.1 Integration veränderter KIR6.2-Untereinheiten in $K_{ATP}$ -Kanäle

$K_{ATP}$ -Kanäle besitzen vier - entsprechend der Anzahl ihrer KIR6.2-Untereinheiten - identische und nicht-kooperative Bindungsstellen für ATP. Dabei scheint die Besetzung einer einzigen ATP-Bindungsstelle für die Funktion des Kaliumkanals völlig auszureichen. Eine gleichzeitige Aktivierung mehrerer Untereinheiten durch ATP trägt scheinbar nicht zu einer weiteren Stabilisierung des geschlossenen Zustandes der Kanäle bei [37].

Der E23K-Polymorphismus ist in der Nähe der ATP-Bindungsstelle der KIR6.2-Untereinheit lokalisiert [67] und führt zu einer verminderten Sensitivität der Rezeptorstelle gegenüber ATP [54]. Aus einer heterozygoten Mutation resultieren damit 50 % zumindest in ihrer Funktion eingeschränkte KIR6.2-Untereinheiten ( $KIR6.2_{Lys}$ ). Die zufällige Zusammensetzung von KIR6.2- und SUR-Untereinheiten zur Quartärstruktur der  $K_{ATP}$ -Kanäle führt somit, vorausgesetzt Veränderungen an der SUR-Untereinheit spielen in diesem Zusammenhang keine Rolle, zu insgesamt 16 verschiedenen Kanälen, die man in fünf verschiedene Untergruppen einordnen kann (s. Tab. 4.1). Bei heterozygotem E23K-Polymorphismus ist damit statistisch die Funktion von 20 % aller  $K_{ATP}$ -Kanäle betroffen. Auswirkungen auf den Stoffwechsel sind in diesem Fall nur geringgradig zu erwarten und statistisch möglicherweise nur bei sehr großen Fallzahlen nachzuweisen.

Im Gegensatz dazu betrifft das homozygote Lys-Allel 100 % aller  $K_{ATP}$ -Kanäle. Nach den Ergebnissen dieser Studie scheint sich im Rahmen des Intermediärstoffwechsels gerade der homozygote E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen auf eine reduzierte

hyperglykämische Suppression der Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen des Pankreas und eine daraus resultierende eingeschränkte Glukosetoleranz auszuwirken. Bemerkenswert ist, daß aufgrund der hohen Allelfrequenz von E23K dieser zu vermutende Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 nach Hardy-Weinberg etwa 15 % aller Kaukasier betrifft [56].

$K_{ATP}$ -Kanäle werden jedoch in zahlreichen Geweben exprimiert. Damit bleibt ungeklärt, auf welcher Ebene, zentral oder peripher, eine KIR6.2-Mutation die Regulation der glukoseinduzierten Glukagonsuppression beeinflussen könnte.

**Tab. 4.1:** Untergruppen verschiedener  $K_{ATP}$ -Kanäle bei heterozygotem E23K-Polymorphismus [37]

Untergruppe	Anzahl der Untereinheiten		Funktion als $K_{ATP}$ -Kanal
	KIR6.2 <sub>Glu</sub>	KIR6.2 <sub>Lys</sub>	
I.	4	0	ja
II.	3	1	ja
III.	2	2	ja
IV.	1	3	ja
V.	0	4	eingeschränkt

#### 4.5.2 Nukleotidsensitivität ATP-sensitiver Kaliumkanäle

Adenosintriphosphat (ATP) führt durch Bindung an die KIR6.2-Untereinheit der Kaliumkanäle zur Hemmung des für das Ruhepotential notwendigen Kaliumausstroms aus der Zelle [1; 3; 42]. Die Bindungsfähigkeit des Nukleotids wird dabei durch verschiedene Substrate im Zytosol, u.a. die Nukleotiddiphosphate Adenosindiphosphat

(ADP) und Guanosindiphosphat (GDP), moduliert. Die in diesem Zusammenhang funktionell größte Bedeutung scheint ADP zu besitzen [6]. Seine Wirkung entfaltet es über drei verschiedene Wege [55]. Freies ADP<sup>3-</sup> im Zytosol scheint, analog zu ATP, die Aktivität der K<sub>ATP</sub>-Kanäle zu inhibieren. Im Gegensatz hierzu resultiert aus der Bindung des Mg<sup>2+</sup>-Komplexes des ADP an die SUR1-Untereinheit eine Aktivierung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle mit erleichtertem Kaliumflow. Und schließlich als dritte Wirkungsmöglichkeit führt die Bindung des gesamten MgADP-Komplexes an die KIR6.2-Untereinheit zu einer deutlichen Abnahme der Sensitivität der Kaliumkanäle für inhibitorische Nukleotide und somit ebenfalls zur Aktivierung der Kanäle. Damit entspricht die Bedeutung des MgADP-Komplexes der eines regulatorischen Gegenspielers zum ATP für die Modulation der Funktion von K<sub>ATP</sub>-Kanälen.

#### **4.5.3 Einfluß des E23K-Polymorphismus auf die Nukleotidsensitivität**

In einer jüngeren Studie wurde eine erhöhte spontane Offenwahrscheinlichkeit und eine reduzierte ATP-Sensitivität von K<sub>ATP</sub>-Kanälen *in vitro* in Verbindung zum Lys-Allel im Codon 23 des KIR6.2-Gen beschrieben [54]. Weiter diskutiert sie die Möglichkeit, daß aus diesen Veränderungen eine Erhöhung der (inhibitorischen) Schwellenkonzentration für ATP resultieren könnte, die zu einer Depolarisation der Zellmembran und damit z.B. zur Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen führen würde [54]. Für diese Dysfunktion sind vermutlich verschiedene Mechanismen auf molekulargenetischer Ebene verantwortlich.

Eine aktivierende nukleosiddiphosphatinduzierte Konformationsänderung, welche in physiologischen ATP-sensitiven Kaliumkanälen durch die Interaktion der beiden Untereinheiten SUR und KIR reguliert wird, scheint als Folge des E23K-Polymorphismus erleichtert zu sein [55]. Auch andere Studien konnten zeigen, daß als Folge dieses Polymorphismus eine Verkürzung des „lange geschlossenen Zustandes“ der Kanäle (Refraktärzeit) resultiert. Unter physiologischen Bedingungen bindet ATP während dieser Refraktärzeit an das KIR6.2-Molekül und führt so zu einer Verlängerung dieser Zyklusperiode und damit zur Abnahme des Kaliumflows über

$K_{ATP}$ -Kanäle [17; 18]. Demnach scheint es sich beim Pathomechanismus des E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen zum einen um eine erhöhte Sensibilität der  $K_{ATP}$ -Kanäle für aktivierende Nukleosiddiphosphate und zum anderen um eine verminderte Sensibilität für das inhibitorische ATP zu handeln [55]. Die beobachtete Erhöhung der Schwellenkonzentration für ATP resultiert wahrscheinlich aus der Addition beider Mechanismen.

Beim Menschen sind bereits heute einige Dysfunktionen der beschriebenen Modulationen der Funktion von  $K_{ATP}$ -Kanälen bekannt, denen eine pathophysiologische Auswirkung zugeschrieben wird. So gelten z.B. bestimmte Mutationen in einer der beiden Untereinheiten, SUR oder KIR, mit resultierendem Verlust der Bindungsfähigkeit des aktivierenden  $Mg^{2+}$ -Komplexes an die SUR1-Untereinheit der Kaliumkanäle, als Ursache des PHHI-Syndroms (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy) mit mangelnder metabolischer Regulation, chronischer Depolarisation und unkontrollierter Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen [14]. Möglicherweise tragen ebenfalls ähnliche Pathomechanismen in hypothalamischen Neuronen bzw.  $\alpha$ -Zellen des Pankreas zu einer reduzierten Glukosesensitivität dieser Zellen und damit zu einer verminderten Glukagonsuppression bei, ähnlich den Ergebnissen dieser Studie (s. Kap. 4.4).

In diesem Sinne ist noch zu überprüfen, ob eine verzögerte Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen, in Relation zur höheren Plasmaglukosekonzentration, aus einer erhöhten ATP-Schwellenkonzentration und damit einer verzögerten Inhibition der ATP-sensitiven Kaliumkanäle resultiert. Ein solcher Pathomechanismus erscheint nach den Ergebnissen dieser (s. Kap. 3.2.3) sowie einer früheren Studie [64] jedoch eher unwahrscheinlich. Dabei ist allerdings nicht auszuschließen, daß die in dieser Studie phänotypisch adäquate Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen kompensatorisch über alternative Wege der intrazellulären Signaltransduktion und nicht über  $K_{ATP}$ -Kanäle vermittelt wird.

## **4.6 Auswirkungen veränderter KIR-Untereinheiten auf die Regulation der Glukagonsekretion im Pankreas und ZNS**

### **4.6.1 Histologische Veränderungen im Pankreas**

Neben den z.T. bereits erwähnten funktionellen Veränderungen ließen sich in weiteren Tierversuchen ebenfalls histologische Umgestaltungen der Inselarchitektur des Pankreas feststellen [40; 43; 44]. Bei Studien an Mäusen, die eine dominant-negative Mutation im KIR6.2-Gen exprimierten, zeigte sich, daß mit zunehmendem Lebensalter der Tiere die Insulinsekretion deutlich reduziert wurde und gleichzeitig eine zunehmende Reduktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen stattfand. In ähnlicher Weise ließ sich dies, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt, bei KIR6.2 knock-out Mäusen im Vergleich zu einer Kontrollpopulation nachweisen. Damit scheinen diese Ergebnisse frühere Studien zu bestätigen, die  $K_{ATP}$ -Kanälen einen zytoprotektiven Schutz zuschrieben [5; 66].

Die Reduktion der Anzahl der  $\beta$ -Zellen bei diesen beiden Tiermodellen basierte wahrscheinlich auf einer deutlich erhöhten Apoptoserate [44; 57]. Allerdings versteht man die genauen Hintergründe, die zu dieser erhöhten Apoptoserate führen, bis heute noch nicht vollständig. Elektrophysiologisch konnte für die  $\beta$ -Zellen von Tieren, die eine dominant-negative Mutation im KIR6.2-Gen exprimieren, ein kontinuierlich erhöhtes Ruhepotential sowie eine ständig erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration nachgewiesen werden [44]. Eine solche chronische Zellmembrandepolarisation wurde bereits in früheren Studien an Mäusen mit einer “weaver”-Mutation im KIR6.2-Gen beschrieben. Diese führte bei diesen Tieren zu einem Verlust der Kaliumselektivität der ATP-sensitiven Kaliumkanäle und damit ebenfalls zu einer kontinuierlichen Depolarisation, die als Ursache für einen Zelltod im Zerebellum angesehen wurde [27]. Analog hierzu kam eine weitere Studie zu dem Schluß, daß eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration eine Apoptose der  $\beta$ -Zellen induziert [16]. ATP-sensitive

Kaliumkanäle scheinen durch Regulation des Zellmembranpotentials und der intrazellulären Kalziumkonzentration eine bedeutende Rolle für das Überleben der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu spielen. So ist es wahrscheinlich, daß der Funktionsausfall der  $K_{ATP}$ -Kanäle bei diesen gentechnisch veränderten Tieren über eine kontinuierliche Zellmembrandepolarisation und eine erhöhte basale intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einem Zelltod der  $\beta$ -Zellen beitrug [40].

Es bleibt jedoch auch hier fraglich, in wie weit diese Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen übertragbar sind. In der vorliegenden Studie zeigen sich bei gesunden Probanden in keiner Phase der stimulierten Insulinsekretion Unterschiede zwischen Trägern des Polymorphismus und einer Kontrollgruppe. Somit ist es eher unwahrscheinlich, daß E23K in diesem frühen Stadium über eine erhöhte Apoptoserate der  $\beta$ -Zellen zu einer reduzierten Glukosetoleranz führt. In einem solchen Fall wäre, ähnlich zu den Tierversuchen [43; 44], eine durch eine verminderte Zellzahl bedingte reduzierte Synthese und Sekretion des Insulins bzw. C-Peptids zu erwarten. Allerdings kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, daß in einem späteren Stadium eine erhöhte Apoptoserate der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu einer Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen zumindest beiträgt.

Auswirkungen von Veränderungen im KIR6.2-Gen bleiben im Tierversuch jedoch nicht nur auf  $\beta$ -Zellen des Pankreas beschränkt. Im Gegensatz zur normalen Inselarchitektur ließen sich glukagonsynthetisierende  $\alpha$ -Zellen bei KIR6.2 knock-out Mäusen bzw. bei Tieren mit einer dominant-negativen Mutation des KIR6.2-Gens nicht nur in den peripheren Inselregionen, sondern ebenfalls in zentralen Bereichen nachweisen [40; 43; 44]. In der physiologischen Mikrozirkulation der Langerhans'schen Inseln ist jedoch der  $\alpha$ -zellreiche Rand dem  $\beta$ -zellreichen Zentrum nachgeschaltet [12], wodurch die randständigen  $\alpha$ -Zellen der höchsten Insulinkonzentration im Organismus exponiert werden. Weiter ist ebenfalls bekannt, daß die Glukagonsekretion parakrin durch Insulin über Insulinrezeptoren der  $\alpha$ -Zellen inhibiert werden kann [19; 33]. Dies legt den

Schluß nahe, daß eine veränderte Inselarchitektur zu einer reduzierten relativen Insulinkonzentration an den  $\alpha$ -Zellen führen und daraus eine verminderte parakrine Suppression der Glukagonsekretion durch Insulin resultieren könnte. Dazu paßt, daß sich nach einer Applikation von Insulin bei einer Hyperglukagonämie, die trotz einer Hyperglykämie besteht, die Plasmaglukagonspiegel normalisieren [68]. Additiv könnte sich auswirken, daß die absolute Anzahl der  $\alpha$ -Zellen, im Gegensatz zu den  $\beta$ -Zellen, im Pankreas von Tieren mit einer dominant-negativen Mutation im KIR6.2-Gen leicht, bei KIR6.2 knock-out Mäusen deutlich zunimmt [40].

Besteht jedoch keine Hyperglykämie, so scheinen  $\alpha$ -Zellen des Pankreas, nach Ergebnissen aus Tierversuchen an Hunden, auch bei fehlendem Kontakt zu  $\beta$ -Zellen und absolutem Insulinmangel adäquat mit einer Suppression der Glukagonsekretion auf einen kleinen Glukosereiz zu reagieren. Dies läßt vermuten, daß  $\alpha$ -Zellen auch über ein von  $\beta$ -Zellen und Insulin unabhängiges "glucose-sensing"-System verfügen [62]. Im Rahmen einer, möglicherweise aus der veränderten Morphologie und Interaktion resultierenden, absoluten oder relativen hyperglykämischen Stoffwechsellage in der unmittelbaren Umgebung der  $\alpha$ -Zellen sprechen diese offensichtlich weniger ausgeprägt auf Veränderungen des Plasmaglukosespiegels an. Möglicherweise führt der erhöhte Plasmaglukosespiegel in der Umgebung der  $\alpha$ -Zellen zu einer Herunterregulation des im Detail noch nicht verstandenen "Meßsystems" dieser Zellen für Glukose und damit zur Hemmung der negativen Rückkopplung der plasmaglukoseinduzierten Glukagonsekretion mit relativ erhöhtem Plasmaglukagonspiegel als Folge.

Direkte interzelluläre Kontakte oder bis dato noch unbekannte parakrine Signale zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen scheinen somit für die Ausbildung einer physiologischen Inselarchitektur und Interaktion zwischen den einzelnen Inselzellen notwendig zu sein. Neben den bereits beschriebenen Funktionen kommt ATP-sensitiven Kaliumkanälen dabei offensichtlich auch in der Entwicklung dieser Zelllinien eine wichtige Bedeutung für die korrekte Differenzierung des endokrinen Pankreas zu [40; 43; 44]. Es bleibt jedoch auch hier die Frage, in wie fern zelluläre, histologische und physiologische

Veränderungen, wie sie im Tierversuch aus dem E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen resultieren, auf den Menschen übertragbar sind.

Eine Veränderung der Anzahl an somatostatinsezernierenden  $\delta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln infolge einer Veränderung im KIR6.2-Gen konnte im Tierversuch nicht nachgewiesen werden [40].

#### 4.6.2 ZNS-Regulation der Glukagonsekretion

Eine heterogene Gruppe von  $K_{ATP}$ -Kanälen läßt sich ebenfalls im ZNS nachweisen. So findet sich eine Expression des KIR-Gens z.B. in der Substantia nigra [52], im Neokortex [48], in der Hypophyse [10], im Hippokampus [71] oder im Hypothalamus [9], schwerpunktmäßig jedoch in GR (glucose-responsive) -Neuronen-reichen Regionen [35].

Bereits seit längerem ist die Existenz spezieller GR-Neurone im ZNS bekannt, die regulatorisch auf eine Veränderung des Glukoseangebots reagieren [49]. So läßt sich im ventromedialen Hypothalamus (VMH) eine Subpopulation von Neuronen nachweisen, die Glukose nicht nur als Nährstoff nützt, sondern ebenfalls in Abhängigkeit des Glukoseangebotes die Feuerungsrate ihrer generierten Aktionspotentiale durch Änderung der Aktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen, die aus den Untereinheiten KIR6.2 und SUR1 bestehen [41], reguliert [35; 49]. Weiterhin ist bekannt, daß der Hypothalamus als übergeordnetes Zentrum des vegetativen Nervensystems (VNS) eine zentrale Stellung für die Regulation der Glukosehomöostase besitzt [35]. Dabei scheint die Steuerung einer sympathikoadrenergen Gegenregulation bzw. die Regulation der Sekretion verschiedener plasmaglukosesteigernder Hormone wie Katecholamine, Kortikosteroide, Wachstumshormone oder Glukagon mit der Funktion von  $K_{ATP}$ -Kanälen verbunden zu sein [35; 63; 65]. Die zu beobachtende insuffiziente hyperglykämische Suppression der Glukagonsekretion in Verbindung zum

homozygoten E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen ist somit möglicherweise nicht auf eine periphere, sondern auf eine zentrale Dysregulation zurückzuführen.

Hinweise für eine solche These zeigten sich in Tierversuchen an KIR6.2 knock-out Mäusen [41]. Zum einen konnte in vivo bei diesen Tieren keine Glukagonsekretion als Antwort auf eine iatrogene Neuroglykopenie nachgewiesen werden. Zum anderen führte eine systemische Hypoglykämie in vivo bei KIR6.2 knock-out Mäusen ebenfalls nur zu einer insuffizienten Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen, obwohl sich in vitro bei isolierten Pankreasinseln dieser Tiere eine adäquate Glukagonsekretion als Reaktion auf eine geringe Glukosekonzentration nachweisen ließ. Histologisch ging der totale Verlust der Anpassungsfähigkeit der Aktionspotentialraten an Änderungen des Glukosespiegels von Neuronen des VMH mit einem Mangel an funktionsfähigen  $K_{ATP}$ -Kanälen in der Plasmamembran dieser Zellen bei KIR6.2 knock-out Mäusen einher. ATP-sensitive Kaliumkanäle besitzen anscheinend eine wesentliche Bedeutung für die Kopplung der metabolischen Detektion des Plasmaglukosespiegels zur elektrophysiologischen Aktivität dieser Neurone und damit für metabolische Regulationen des VNS [41]. Möglicherweise führt der Verlust der Expression des KIR6.2-Gens nicht nur im Falle einer Hypoglykämie sondern ebenfalls bei hyperglykämischer Stoffwechsellage zu einer insuffizienten Transduktion zwischen metabolischen und elektrophysiologischen Zellfunktionen. In diesem Fall wäre eine verminderte Glukagonsuppression bei erhöhtem Plasmaglukosespiegel durchaus zu erwarten - ähnlich zu den Ergebnissen des modifizierten hyperglykämischen Clamps.

#### **4.7 Schlußfolgerung**

Entsprechend mehreren vorangegangenen Publikationen, die bereits eine Verbindung des homozygoten E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen zum Diabetes mellitus Typ 2 zeigten, ist auch in dieser Studie bei nicht an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Probanden eine eingeschränkte Glukosetoleranz mit einer erhöhten Frequenz des

homozygoten Lys-Allels in Codon 23 verbunden. Allerdings lassen die Resultate des modifizierten hyperglykämischen Clamps vermuten, daß es sich bei dem zugrundeliegenden Pathomechanismus von E23K weder bei physiologischem noch bei deutlich gesteigertem Insulinbedarf, z.B. im Rahmen einer peripheren Insulinresistenz, um eine Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen handelt.

Vielmehr legen die Daten dieser Studie nahe, daß die eingeschränkte Glukosetoleranz die Folge einer verminderten hyperglykämischen Suppression der Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen des Pankreas sein könnte. Die Eigenschaft der Kaliumkanäle, daß die Besetzung einer von vier ATP-Bindungsstellen für die Inhibition des Kanals ausreichend ist, scheint zu erklären, weshalb diese Dysregulation der Glukagonsekretion v.a. bei heterozygotem E23K-Polymorphismus nachzuweisen ist.

$K_{ATP}$ -Kanäle werden in zahlreichen Geweben exprimiert. Möglicherweise spielen nicht nur zelluläre, histologische und physiologische Veränderungen in peripheren Organen, z.B. im Pankreas, sondern auch Dysfunktionen von GR-Neuronen des ZNS eine entscheidende Rolle. Ein wesentliches Merkmal des E23K-Polymorphismus auf molekularer Ebene scheint der Einfluß auf die Nukleotidsensitivität der KIR-Untereinheit und damit auf die Modulation der Funktion von  $K_{ATP}$ -Kanälen zu sein.

## 5 Tabellen

### 5.1 Ergebnisse des oralen Glukosetoleranztests (oGTT)

**Tab. 5.1:** Plasmaglukosekonzentrationen

Zeit (min)	Plasmaglukose (mmol/l)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
0	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.04	5.1 ± 0.1	0.50	0.78
30	8.2 ± 0.2	8.1 ± 0.1	8.6 ± 0.3	0.93	0.23
60	7.7 ± 0.2	7.9 ± 0.2	8.1 ± 0.4	0.42	0.49
90	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.8 ± 0.3	0.63	0.37
120	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.1	6.3 ± 0.3	0.23	0.23

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

**Tab. 5.2:** Plasmainsulinkonzentrationen

Zeit (min)	Plasmainsulin (pmol/l)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
0	60 ± 5	60 ± 4	54 ± 9	0.83	0.57
30	422 ± 28	418 ± 24	394 ± 50	0.82	0.60
60	546 ± 38	532 ± 32	491 ± 67	0.65	0.47
90	428 ± 36	433 ± 31	401 ± 64	0.98	0.70
120	354 ± 30	362 ± 23	357 ± 55	0.85	0.96

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

**Tab. 5.3:** Plasmaglukagonkonzentrationen

Zeit (min)	Plasmaglukagon (ng/l)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
0	63 ± 2	67 ± 2	66 ± 4	0.23	0.57
30	60 ± 2	62 ± 2	62 ± 4	0.41	0.59
60	53 ± 2	58 ± 2	59 ± 3	0.044	0.12
90	51 ± 2	54 ± 2	56 ± 3	0.09	0.14
120	51 ± 2	54 ± 2	55 ± 3	0.08	0.14

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

## 5.2 Ergebnisse des Hyperglykämischen Clamps

**Tab. 5.4:** Plasmainsulinkonzentrationen

Zeit (min)	Plasmainsulin (pmol/l)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
basal	52 ± 8	44 ± 4	38 ± 5	0.19	0.26
1. Phase	241 ± 41	216 ± 23	253 ± 73	0.76	0.89
2. Phase	302 ± 49	283 ± 36	319 ± 104	0.89	0.87
GLP_P1	1652 ± 238	1752 ± 222	1814 ± 448	0.70	0.73
GLP_P2	3700 ± 490	3689 ± 528	3452 ± 873	0.90	0.79
Ins_max	5879 ± 644	5867 ± 742	5294 ± 1177	0.84	0.64

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

**Tab 5.5:** Insulinsekretionsraten (ISR)<sup>#</sup>

Zeit (min)	Insulinsekretionsrate (pmol/min)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
basal	152 ± 15	157 ± 19	147 ± 23	0.95	0.84
1. Phase	648 ± 85	654 ± 48	700 ± 167	0.85	0.76
2. Phase	662 ± 50	674 ± 53	689 ± 134	0.83	0.81
GLP_P1	2291 ± 251	3381 ± 316	3221 ± 569	0.38	0.67
GLP_P2	2262 ± 171	2468 ± 305	2322 ± 320	0.60	0.86
Ins_max	3562 ± 294	3208 ± 328	3207 ± 454	0.38	0.52

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

<sup>#</sup> Werte sind an Alter, BMI und WHR angepaßt

**Tab 5.6:** Plasma-C-Peptidkonzentrationen

Zeit (min)	Plasma-C-Peptid (pmol/l)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
basal	621 ± 50	611 ± 54	521 ± 67	0.58	0.26
1. Phase	1311 ± 114	1314 ± 83	1295 ± 215	0.98	0.94
2. Phase	2463 ± 135	2473 ± 158	2471 ± 395	0.97	0.98
GLP_P1	5493 ± 302	5885 ± 431	5889 ± 932	0.47	0.60
GLP_P2	8590 ± 449	9063 ± 852	8473 ± 1098	0.74	0.91
Ins_max	11022 ± 617	11063 ± 1041	10478 ± 1323	0.91	0.67

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

**Tab. 5.7:** Plasmaglukagonkonzentrationen

Zeit (min)	Plasmaglukagon (ng/l)			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
basal	68 ± 3	68 ± 4	60 ± 4	0.58	0.13
1. Phase	54 ± 3	56 ± 3	53 ± 3	0.81	0.81
2. Phase	37 ± 2	38 ± 3	38 ± 4	0.84	0.93
GLP_P1	34 ± 2	34 ± 3	35 ± 3	0.95	0.83
GLP_P2	32 ± 2	30 ± 3	30 ± 3	0.54	0.61
Ins_max	72 ± 4	76 ± 5	72 ± 4	0.66	0.94

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

**Tab. 5.8:** Plasmaglukagonkonzentration in Relation zu Gluk<sub>basal</sub>

Phase	Gluk <sub>x</sub> /Gluk <sub>basal</sub>			p*	p**
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys		
1. Phase	0.80 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.90 ± 0.03	0.06	0.004
2. Phase	0.55 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.41	0.13
GLP_P1	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.59 ± 0.05	0.65	0.08
GLP_P2	0.48 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.50 ± 0.04	0.60	0.63
Max	1.10 ± 0.07	1.15 ± 0.06	1.25 ± 0.08	0.32	0.19

p\* Glu/Glu vs. X/Lys, p\*\* Glu/Glu vs. Lys/Lys

## 6 Zusammenfassung

ATP-sensitive Kaliumkanäle können u.a. in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen des Pankreas, GR (glucose-responsive) -Neuronen des ventromedialen Hypothalamus, Skelettmuskelzellen sowie verschiedenen anderen für die Glukosehomöostase bedeutenden Zelllinien nachgewiesen werden. Als Kopplungsglieder zwischen metabolischen und elektrophysiologischen Steuerungsprozessen sind sie in zahlreiche periphere wie zentrale Regulationsmechanismen des Glukosestoffwechsels eingebunden. Ihr Aufbau als Heterooktamer besteht aus jeweils vier homologen Untereinheiten eines Sulfonylharnstoff-Rezeptors (SUR) und vier zentral gelegenen homologen KIR-Untereinheiten.

Im Gen der KIR6.2-Untereinheit von ATP-sensitiven Kaliumkanälen sind drei verschiedene Punktmutationen (E23K, L270V, I337V ) bekannt. Allerdings konnte bisher nur für den homozygoten E23K-Polymorphismus, der bei der Proteinbiosynthese einen Austausch der Aminosäure Glutamat durch die Aminosäure Lysin in der Nähe der ATP-Bindungsstelle verursacht, eine Verbindung zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden. Um einen Einfluß von E23K auf die Glukosetoleranz, die Insulinsekretion und Insulinwirkung sowie die Glukagonsekretion bei Probanden, welche selbst nicht an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind, zu prüfen, wurden in dieser Studie insgesamt 298 Personen mit einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) und 75 Personen mit einem modifizierten hyperglykämischen Clamp untersucht, um eine maximale Insulinsekretion zu stimulieren.

Ähnlich zu früheren Veröffentlichungen zeigt sich als Hinweis auf eine eingeschränkte Glukosetoleranz ebenfalls in den Ergebnissen dieser Studie im oGTT eine vergrößerte inkrementale  $AUC_{inc\_BZ}$  für das Lys-Allel im Codon 23 des KIR6.2-Gens ( $221 \pm 14$

mmol · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in Glu/Glu vs. 240 ± 11 mmol · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in X/Lys, p = 0.034). Bei der Suche nach möglichen Erklärungen für diese Dysregulation des Glukosestoffwechsels konnte allerdings weder im oGTT (p = 0.45 für AUC<sub>Ins</sub> Glu/Glu vs. X/Lys) noch bei maximaler Stimulation der Insulinsekretion im modifizierten hyperglykämischen Clamp (p = 0.38 für ISR<sub>Ins\_max</sub> Glu/Glu vs. X/Lys) eine unterschiedliche Insulinsekretion zwischen Trägern von E23K und einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Ähnliches gilt ebenfalls für die periphere Insulinwirkung. Auch hier lassen sich in dieser Studie bei beiden Untersuchungsmethoden keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (oGTT: p = 0.52 Glu/Glu vs. X/Lys; hyperglykämischer Clamp: p = 0.51 Glu/Glu vs. X/Lys) in Bezug auf die periphere Insulinsensitivität feststellen.

Anders ist dies jedoch bei der Betrachtung der Plasmaglukagonsekretion der α-Zellen. Interessanterweise zeigen homozygote Träger des E23K-Polymorphismus in der 1. Phase des hyperglykämischen Clamps eine verminderte hyperglykämische Suppression der Glukagonsekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe (20 ± 2 % in Glu/Glu, 18 ± 2 % in Glu/Lys, 10 ± 3 % in Lys/Lys, p = 0.01 ANOVA). Unter Berücksichtigung methodischer Nachteile des oGTT läßt sich jedoch auch bei dieser Untersuchung eine vergrößerte AUC<sub>Gluk</sub> (6631 ± 214 ng · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in Glu/Glu vs. 7070 ± 165 ng · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in X/Lys, p = 0.023) für das Lys-Allel im Codon 23 des KIR6.2-Gens nachweisen.

Bereits bei Probanden, welche nicht an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind, lassen sich somit Auswirkungen des E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen als eingeschränkte Glukosetoleranz nachweisen. Dabei scheint es sich beim Pathomechanismus weder im normoinsulinämischen Bereich noch bei gesteigertem Insulinbedarf um eine verminderte Insulinsekretion bzw. eine reduzierte periphere Insulinwirkung zu handeln. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich, nach den Ergebnissen dieser Studie, beim homozygoten E23K-Polymorphismus um eine verminderte hyperglykämische Suppression der Glukagonsekretion der α-Zellen. Die

Eigenschaft der Kaliumkanäle, daß allein die Besetzung einer ATP-Bindungsstelle für die Inhibition des Kanals ausreichend ist, scheint zu erklären, weshalb diese Dysregulation der Glukosehomöostase v.a. bei homozygotem Polymorphismus nachzuweisen ist. ATP-sensitive Kaliumkanäle werden jedoch in zahlreichen Geweben exprimiert. Insofern bleibt zu klären, ob Veränderungen an peripheren Organen bzw. an GR-Neuronen des ZNS als Folge des E23K-Polymorphismus wesentliche Bedeutung für die Pathogenese besitzen. Auf molekularer Ebene scheint das Lys-Allel im Codon 23 Einfluß auf die Nukleotidsensitivität der KIR-Untereinheit und damit auf die Modulation der Funktion der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu besitzen.

## 7 *Anhang*

### 7.1 **Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
AUC <sub>inc</sub>	incremental area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
C-Peptid	connecting peptide
E23K	E23K-Polymorphismus im KIR6.2-Gen
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutamat
GR-Neurone	glucose-responsive neurons [49]
HbA <sub>1c</sub>	glykosilierte Hämoglobin-A-Kette
IGT	impaired glucose tolerance
ISI	Insulinsensitivitätsindex
ISR	Insulinsekretionsrate
K <sub>ATP</sub> -Kanäle	ATP-sensitive Kaliumkanäle
KIR6.2	einwärtsgerichteter Kaliumkanal 6.2
KIR6.2 <sub>Glu</sub>	KIR6.2-Untereinheiten mit Glu-Allel in Position 23
KIR6.2 <sub>Lys</sub>	KIR6.2-Untereinheiten mit E23K-Polymorphismus
Lys	Lysin
M	Mittelwert
NGT	normal glucose tolerance
NIDDM	non-insulin-dependent diabetes mellitus
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
PHHI	persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy

SEM	Standardfehler der Mittelwerte
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VMH	ventromedialer Hypothalamus
VNS	vegetatives Nervensystem
WHR	waist-to-hip ratio
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7.2 Berechnungsformeln

### 7.2.1 Body-Mass-Index (BMI)

$$\text{body - mass - index (BMI)} = \frac{\text{KG}}{\text{KL}^2}$$

KG = Körpergewicht in [kg], KL = Körpergröße in [m]

### 7.2.2 waist-to-hip ratio (WHR)

$$\text{waist - to - hip - ratio (WHR)} = \frac{\text{BU}}{\text{HU}}$$

BU = Bauchumfang in [cm], HU = Hüftumfang in [cm]

## 8 *Literaturverzeichnis*

1. **Aguilar-Bryan L, Clement JP IV, Gonzales G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J** (1998) Toward understanding the assembly and structure of  $K_{ATP}$  channels. *Physiol Rev* 78: 227-245
2. **Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP IV., Boyed AE, Gonzales G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA** (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426
3. **Aguilar-Bryan L, Bryan J** (1999) Molecular biology of ATP-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 20: 101-135
4. **Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, Sharp GW** (1998) Glucose action "beyond ionic events" in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol Sci* 19: 496-499
5. **Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M** (1990) Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Science* 247: 852-854
6. **Ashcroft FM, Gribble FM** (1999) ATP-sensitive  $K^+$  channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42: 903-919
7. **Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ** (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312: 446-448
8. **Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K, Rorsman P** (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55: 54-65
9. **Ashford ML, Boden PR, Treherne JM** (1990) Glucose-induced excitation of hypothalamic neurons is mediated by ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Pflugers Arch* 415: 479-483
10. **Bernardi H, Fosset M, Lazdunski M** (1988) Characterization, purification, and affinity labeling of the brain [ $^3H$ ]glibenclamide-binding protein, a putative neuronal ATP-regulated  $K^+$  channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9816-9820

11. **Bokvist K, Olsen HL, Hoy M, Gotfredsen CF, Holmes WF, Buschard K, Rorsman P, Gromda J** (1999) Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic A-cells. *Pflugers Arch* 438: 428-436
12. **Bonner-Weir S, Orci L** (1982) New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 31: 883-889
13. **Cook DL, Hales CN** (1984) Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 311: 271-273
14. **Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RF, Johnson PR, Aynsley-Green A, Lu S, Clement JP IV., Lindley KJ, Seino S, Aguilar-Bryan L** (1997) Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med* 336: 703-706
15. **Eaton RP, Allen RC, Schade DS, Erickson KM, Standefer J** (1980) Prehepatic insulin production in man: kinetic analysis using peripheral connecting peptide behaviour. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 520-528
16. **Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, Berggren PO** (1998) Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 273: 33501-33507
17. **Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Nichols CG** (2001) ATP interaction with the open state of the K<sub>ATP</sub> channel. *Biophys J* 80: 719-728
18. **Enkvetchakul D, Loussouarn G, Makhina E, Shyng SL, Nichols CG** (2000) The kinetic and physical basis of K<sub>ATP</sub> channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J* 78: 2334-2348
19. **Fehmann HC, Strowski M, Lankat-Buttgereit B, Göke B** (1994) Molecular and functional characterization of insulin receptors present on hamster glucagonoma cells. *Digestion* 55: 214-220
20. **Fritsche A, Stefan N, Hardt E, Schützenauer S, Häring H, Stumvoll M** (2000) A novel hyperglycaemic clamp for characterization of islet function in humans: assessment of three different secretagogues, maximal insulin response and reproducibility. *Eur J Clin Invest* 30: 411-418
21. **Gloyn AL, Hashim Y, Ashcroft SJH, Ashfield R, Wiltshire S, Turner RC** (2001) Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and KIR6.2 with type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53). *Diabet Med* 18: 206-212

22. **Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM** (2003) Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 568-572
23. **Göpel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P** (2000) Regulation of glucagon release in mouse  $\alpha$ -cells by  $K_{ATP}$  channels and inactivation of TTX-sensitive  $Na^+$  channels. *J Physiol* 528: 509-520
24. **Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, Froguel P** (1998) Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying  $K^+$  channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggest a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia* 41: 1511-1515
25. **Hansen L, Echwald SM, Hansen T, Urhammer SA, Clausen JO, Pedersen O** (1997) Amino acid polymorphisms in the ATP-regulatable inward rectifier Kir6.2 and their relationships to glucose- and tolbutamide-induced insulin secretion, the insulin sensitivity index, and NIDDM. *Diabetes* 46: 508-512
26. **Heimberg H, De Vos A, Moens K, Quartier E, Bouwens L, Pipeleers D, Van Schaftingen E, Madsen O, Schuit F** (1996) The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing  $\alpha$ -cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 7036-7041
27. **Hess EJ** (1996) Identification of the *weaver* mouse mutation: the end of the beginning. *Neuron* 16: 1073-1076
28. **Hunter M, Giebisch G** (1988) Calcium-activated K-channels of Amphiuma early distal tubule: inhibition by ATP. *Pflugers Arch* 412: 331-333
29. **Inagaki N, Gono T, Clement JP IV., Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J** (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1170
30. **Inoue H, Ferrer J, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner RC, Elbein SC, Hampe CL, Suarez BK, Inagaki N, Seino S, Permutt MA** (1997) Sequence variants in the pancreatic islet  $\beta$ -cell inwardly rectifying  $K^+$  channel Kir6.2 (Bir) gene: identification and lack of role in Caucasians patients with NIDDM. *Diabetes* 46: 502-507
31. **Kahn CR, Vicent D, Doria A** (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 47: 509-531

32. **Kieffer TJ, Habener JF** (1999) The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 20: 876-913
33. **Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirotani T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M** (1995) Expression of insulin receptor on clonal pancreatic alpha cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. *Diabetologia* 38: 422-429
34. **Larsson H, Berglund G, Ahren B** (1995) Glucose modulation of insulin and glucagon secretion is altered in impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1778-1782
35. **Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH** (2001) Brain glucosensing and the  $K_{ATP}$  channel. *Nat Neurosci* 4: 459-460
36. **Löffler G**: Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. 786-811, In: Löffler G, Petrides P: *Biochemie und Pathobiochemie* 6. Auflage 1998, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
37. **Markworth E, Schwanstecher C, Schwanstecher M** (2000)  $ATP^{4+}$  mediates closure of pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes* 49: 1413-1418
38. **Matsuda M, DeFronzo RA** (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22: 1462-1470
39. **McGuire EA, Helderman JH, Tobin JD, Andres R, Berman M** (1976) Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol* 41: 565-573
40. **Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara Y, Seino S** (2001) Roles of ATP-sensitive  $K^{+}$  channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas. *Diabetes* 50: 48-51
41. **Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S** (2001) ATP-sensitive  $K^{+}$  channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4: 507-512
42. **Miki T, Nagashima K, Seino S** (1999) The structure and function of the ATP-sensitive  $K^{+}$  channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol* 22: 113-123

43. **Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S** (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in  $K_{ATP}$  channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10402-10406
44. **Miki T, Tashiro F, Iwanaga T, Nagashima K, Yoshitomi H, Aihara H, Nitta Y, Gono T, Inagaki N, Miyazaki J, Seino S** (1997) Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative  $K_{ATP}$  channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11969-11973
45. **National Diabetes Data Group** (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28: 1039-1057
46. **Newgard CB, McGarry JD** (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64: 689-719
47. **Noma A** (1983) ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148
48. **Ohno-Shosaku T, Yamamoto C** (1992) Identification of an ATP-sensitive  $K^+$  channel in rat cultured cortical neurons. *Pflugers Arch* 422: 260-266
49. **Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ** (1969) Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222: 282-284
50. **Polonsky KS, Sturis J, Bell GI** (1996) Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334: 777-783
51. **Pulido N, Casla A, Suarez A, Casanova B, Arrieta FJ, Rovira A** (1996) Sulphonylurea stimulates glucose uptake in rats through an ATP-sensitive  $K^+$  channel dependent mechanism. *Diabetologia* 39: 22-27
52. **Roper J, Ashcroft FM** (1995) Metabolic inhibition and low internal ATP activate K-ATP channels in rat dopaminergic substantia nigra neurones. *Pflugers Arch* 430: 44-54
53. **Sakura H, Wat N, Horton V, Millns H, Turner RC, Ashcroft FM** (1996) Sequence variations in the human KIR6.2 gene, a subunit of the beta-cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia* 39: 1233-1236
54. **Schwanstecher C, Meyer U, Schwanstecher M** (2002) KIR6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Diabetes* 51: 875-879

55. **Schwanstecher C, Neugebauer B, Schulz M, Schwanstecher M** (2002) The common single nucleotide polymorphism E23K in Kir6.2 sensitizes pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels toward activation through nucleoside diphosphates. *Diabetes* 51: 363-367
56. **Schwanstecher C, Schwanstecher M** (2002) Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 358-362
57. **Seino S, Iwanaga T, Nagashima K, Miki T** (2000) Diverse roles of  $K_{ATP}$  channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49: 311-318
58. **Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA** (2000) Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4053-4059
59. **Simpson IA, Cushman SW** (1986) Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem* 55: 1059-1089
60. **Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR** (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 316: 736-738
61. **Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT** (1989) Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive  $K^+$  channels in arterial smooth muscle. *Science* 245: 177-180
62. **Starke A, Grundy S, McGarry JD, Unger RH** (1985) Correction of hyperglycemia with phloridzin restores the glucagon response to glucose in insulin-deficient dogs: implications for human diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1544-1546
63. **Steffens AB, Strubbe JH, Balkan B, Scheurink JW** (1990) Neuroendocrine mechanisms involved in regulation of body weight, food intake and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 305-313
64. **'t Hart LM, van Haefen TW, Dekker JM, Bot M, Heine RJ, Maassen JA** (2002) Variations in insulin secretion in carriers of the E23K variant in the KIR6.2 subunit of the ATP-sensitive  $K^+$  channel in the  $\beta$ -cell. *Diabetes* 51: 3135-3138
65. **Taborsky GJ Jr., Ahren B, Havel PJ** (1998) Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycaemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes. *Diabetes* 47: 995-1005

66. **Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y** (1995) Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: regulation by intracellular nucleotides and K<sup>+</sup> channel-opening drugs. *Am J Physiol* 269: C525-C545
67. **Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F, Ashcroft FM** (1998) Molecular determination of K<sub>ATP</sub> channel inhibition by ATP. *EMBO J* 17: 3290-3296
68. **Unger RH** (1985) Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia* 28: 574-578
69. **Van Cauter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS** (1992) Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels. Comparison of individual and standard kinetic parameters for C-Peptide clearance. *Diabetes* 41: 368-377
70. **Wang PH, Moller D, Flier JS, Nayak RC, Smith RJ** (1989) Coordinate regulation of glucose transporter function, number, and gene expression by insulin and sulfonylureas in L6 rat skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 84: 62-67
71. **Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A, Neumcke B** (1999) Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol* 514: 327-341

## **9 Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. M. Stumvoll danke ich für sein Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. med. O. Tschritter und Herrn Privatdozent Dr. med. A. Fritsche für die Unterstützung bei der Durchführung der Studie und für die vielen anregenden und motivierenden Anmerkungen bedanken.

Auch Frau Elke Maerker half mir sehr mit vielen kleinen praktischen Hilfestellungen in der täglichen Praxis. Für die harmonische Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Probanden bedanke ich mich bei Frau Fatimeh Shirkavand, Frau Heike Lutz und Frau Anna Teigeler. Frau Edda-Lilli Wulle danke ich für die studentische Einarbeitung in den Untersuchungsablauf.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Probanden, deren bereitwillige Teilnahme an den Versuchen die Durchführung dieser Studie ermöglichte.

## ***10 Lebenslauf***

### **Persönliche Daten**

Name	Martin Gerhard Holzwarth
geboren	18. November 1975
Geburtsort	Stuttgart
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **Schule**

1982 – 1986	Goldwiesenschule Leinfelden-Echterdingen
1986 – 1992	Immanuel-Kant-Realschule Leinfelden-Echterdingen
1992 – 1995	Werner-Siemens-Schule Stuttgart
1995	Fachgebundene Hochschulreife
1997	Ergänzungsprüfung zum Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Oberschulamt Stuttgart

### **Berufsausbildung / Zivildienst**

1995 – 1996	Zivildienst Malteser Hilfsdienst Stuttgart
1996	Rettungssanitäter DRK KV Esslingen
1997 – 1998	Rettungsassistent DRK KV Esslingen

### **Hochschulausbildung**

10/1998 – 11/2004	Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
9/2000	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
9/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen

2001 – 2002	Famulaturen in: Innere Medizin, Radiologie und Strahlentherapie, Neurologie und Emergency Medicine (Australien)
9/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
10/2003 – 9/2004	Praktisches Jahr am Paracelsuskrankenhaus Ostfildern-Ruit (Wahlfach: Anästhesie) und am Kantonsspital Nidwalden, Stans / Schweiz (Chirurgie)
11/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Ostfildern-Ruit