

Vitamin-D-Rezeptor-Gen-Polymorphismen und Knochenstoffwechsel bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Katja Weismüller
aus Hadamar

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik III
des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. R. Bretzel

Gutachter: Prof. Dr. Stracke

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Katz

Tag der Disputation: 01.12.2003

Gewidmet meinen Eltern

EINLEITUNG	4
1.1 TYP 1-DIABETES MELLITUS (DM 1)	4
1.1.1 ALLGEMEINES	4
1.1.2 GENETISCHE FAKTOREN BEI TYP 1-DIABETES MELLITUS	4
1.1.3 AUTOIMMUNPROZESSE TYP 1-DIABETES MELLITUS	5
1.1.4 KNOCHENVERÄNDERUNGEN BEI TYP 1-DIABETES MELLITUS	6
1.2 KNOCHENSTOFFWECHSEL	8
1.2.1 KNOCHENSPEZIFISCHE ALKALISCHE PHOSPHATASE (BAP)	8
1.2.2 OSTEOCALCIN (OC)	8
1.2.3 PARATHORMON (PTH)	9
1.2.4 C-TERMINALES PROPEPTID DES TYP-1-KOLLAGENS (PICP)	10
1.2.5 DPD-CROSSLINKS	11
1.3 VITAMIN D	12
1.3.1 KNOCHENEFFEKTE	12
1.3.2 IMMUNSUPPRESSIVE WIRKUNG	12
1.4 VITAMIN-D-REZEPTOR (VDR)	13
1.4.1 WIRKUNGSMECHANISMUS	13
1.4.2 VDR-GEN	14
1.4.3 VDR-GEN-POLYMORPHISMEN	14
1.4.3.1 VDR-GEN-POLYMORPHISMEN UND KNOCHENDICHTE	15
1.4.3.2 VDR-GEN-POLYMORPHISMEN UND KNOCHENSTOFFWECHSEL	17
1.4.3.3 VDR-GEN POLYMORPHISMEN UND TYP 1-DIABETES MELLITUS	19
2.FRAGESTELLUNG	21
3.MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 PATIENTEN	22
3.2 VERGLEICHSKOLLEKTIV	22
3.3 KNOCHENSTOFFWECHSEL	23
3.3.1 KNOCHENSPEZIFISCHE ALKALISCHE PHOSPHATASE (BAP)	23
3.3.2 OSTEOCALCIN (OC)	23
3.3.3 PARATHORMON (PTH)	24

3.3.4 CARBOXYTERMINALES PROPEPTID DES TYP-1-KOLLAGENS (PICP)	24
3.3.5 DESOXYPYRIDINOLIN-CROSSLINKS (DPD-CROSSLINKS)	25
3.3.6 25-OH-VITAMIN D	25
3.4 KREATININ	25
3.5 HbA1c	26
3.6 GENOTYPISIERUNG	26
3.6.1 DNA-EXTRAKTION	26
3.6.2 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	27
3.6.3 BESTIMMUNG DER RESTRIKTIONSFRAGMENTPOLYMORPHISMEN (RFLPs)	30
3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG	33
 4 ERGEBNISSE	 34
4.1 HÄUFIGKEIT DER VDR-GEN-ALLELE BEI TYP-1-DIABETIKERN UND KONTROLLKOLLEKTIV	34
4.2 BIOCHEMISCHE MARKER DES KNOCHENSTOFFWECHSELS	38
4.3 METABOLISCHE KONTROLLE UND KNOCHENSTOFFWECHSEL	40
4.4 VDR-GEN-ALLELE UND KNOCHENSTOFFWECHSEL	40
4.5 KNOCHENSTOFFWECHSEL UND GESCHLECHT	44
4.6 KNOCHENSTOFFWECHSEL BEI TYP 1-DIABETIKERN UND KONTROLLKOLLEKTIV	49
 5.DISKUSSION	 50
5.1 DISKUSSION DER METHODIK	50
5.1.1 PROBENAUFBEREITUNG	50
5.1.2 AUSWAHL DER MESSPARAMETER	51
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	53
5.2.1 VDR-POLYMORPHISMEN	53
5.2.2 PARAMETER DES KNOCHENSTOFFWECHSELS	57
 6.ZUSAMMENFASSUNG	 63
 7.LITERATURVERZEICHNIS	 65
 8.ANHANG	 74

8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
8.2 TABELLENVERZEICHNIS	75
8.3 ABKÜRZUNGEN	76
9 DANKSAGUNG	78
10 LEBENSLAUF	79

1 Einleitung

1.1 Typ 1-Diabetes mellitus (DM 1)

1.1.1 Allgemeines

Typ 1-Diabetes mellitus (DM 1) oder Insulin-Dependent Diabetes mellitus (IDDM) ist eine chronische Erkrankung des Kohlenhydratstoffwechsels, der eine durch Autoimmunprozesse ausgelöste Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zugrunde liegt ³. Im Zuge einer Erkrankung an Typ 1-Diabetes mellitus können zahlreiche Folgeerkrankungen auftreten, wie z.B. diabetische Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie, Mikro- und Makroangiopathie.

Die Inzidenz der Erkrankung im Kindesalter beträgt in Nordeuropa 20-30/100 000 Einwohner pro Jahr, in Großbritannien und Irland 15-19/100 000 Einwohner pro Jahr und in Mittel- und Südeuropa erkranken z. T. weniger als 10/ 100 000 Einwohner pro Jahr neu. Bezüglich des Auftretens des Typ 1-Diabetes mellitus besteht also ein deutliches Nord-Süd-Gefälle ⁴⁴. Die Erkrankung tritt vor allem bei Kaukasiern und in Populationen mit einem großen Anteil an kaukasischem Genmaterial auf ³⁷. Die Unterschiede bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung sind durch unterschiedliche genetische Dispositionen in den jeweiligen Populationen zu erklären, sowie auch durch Ernährungsgewohnheiten und andere Umweltfaktoren ³.

Prinzipiell kann ein Typ 1-Diabetes mellitus auch in höherem Lebensalter auftreten, doch liegt der Höhepunkt der Inzidenz um das 12. Lebensjahr ¹⁸, was den Typ 1-Diabetes mellitus oft zu einer quasi lebenslangen Erkrankung macht.

1.1.2 Genetische Faktoren bei Typ 1-Diabetes mellitus

Die Suszeptibilität für Typ 1-Diabetes mellitus ist erblich bedingt, was sich in einem erhöhtem Erkrankungsrisiko innerhalb betroffener Familien, verglichen mit dem Erkrankungsrisiko von Familien, in denen Typ 1-Diabetes mellitus bei keinem Mitglied aufgetreten ist, ausdrückt ³.

Hauptsächlich ist der Major Histocompatibility Complex (MHC) auf Chromosom 6 mit einer genetischen Prädisposition zu Typ 1-Diabetes mellitus assoziiert. Der MHC codiert Human Leucocyte Antigen (HLA), wobei MHC I HLA A, B, C und MHC II HLA DP, DQ und DR codiert. HL-Antigene finden sich auf allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus, hierbei sind die einzelnen Merkmale bestimmten Zelltypen zugeordnet. Bei Untersuchungen an hellhäutigen Typ 1-Diabetikern zeigte sich, dass bei 95% HLA DR3 oder HLA DR4 vorlag, während dies nur bei 45% der gesunden hellhäutigen Bevölkerung der Fall war. HLA DR11 und HLA DR15 scheinen dagegen einen protektiven Effekt gegenüber Typ 1-Diabetes mellitus zu haben ^{3,18}.

Weitere Genorte, die mit Typ 1-Diabetes mellitus in Verbindung gebracht werden, sind Gene auf Chromosom 11, die in der Nähe der Gene, die für Insulin ^{7,55} und Insulin-like Growth Factor II (IGF II) kodieren, liegen, sowie Gene, die für den „Transporter Involved in Antigen Presentation“ (TAP) kodieren, einen Peptidtransporter ³.

Auch ein Genort auf Chromosom 2q31 und die Genregion, die für humanes Interleukin 1 (IL-1) kodiert, scheinen mit Typ 1-Diabetes mellitus assoziiert zu sein ¹⁸.

1.1.3 Autoimmunprozesse Typ 1-Diabetes mellitus

Histologische Untersuchungen der endokrinen Anteile des Pankreas (Langerhans-Inseln) bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus zeigen eine nahezu vollständige Zerstörung der insulinsezernierenden Beta-Zellen, während alle anderen Zelltypen des endokrinen Pankreas (Alpha-, Delta- und PP-Zellen) erhalten sind ³. Ferner findet sich in den Langerhans-Inseln von Typ 1-Diabetikern ein entzündliches Infiltrat, das vorwiegend aus CD8-Zellen sowie einer variablen Anzahl von CD4-Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen und natürlichen Killer-Zellen besteht. Das histologische Bild der Langerhans-Inseln bei Typ 1-Diabetes mellitus zeigt also eine Insulitis ³. Die Erkrankung wird also durch eine T-Zell-abhängige Autoimmuninsulitis hervorgerufen, die zu einer Zerstörung der Langerhans-Inseln und im weiteren Verlauf zu einem Insulinmangel führt ⁷⁰.

Bei einer großen Anzahl von Patienten, bei denen Typ 1-Diabetes mellitus erstmals diagnostiziert wurde, sind Autoantikörper (Auto-Ak) gegen Insulin im

Serum feststellbar. Hierbei sind vor allem zwei Arten von Auto-Ak hervorzuheben: zytoplasmatische Inselzell-Auto-Ak, die in 70-80% von neu diagnostiziertem Typ 1-Diabetes mellitus zu finden sind, aber nur mit einer Häufigkeit von 0,5% bei gesunden Personen, und Insulin Auto-Ak, die bei ca. 50% der neu diagnostizierten Typ-1-Diabetiker im Serum zu finden sind, bevor eine Gabe exogenen Insulins erfolgte³.

In den Langerhans-Inseln von Patienten, die im Rahmen einer Ketoazidose verstorben waren, fand sich Interferon α . Viren induzieren die Produktion von Interferon α , welches die Expression von HLA-Molekülen stimuliert und chemotaktisch auf Lymphozyten wirkt³.

Zur Autoimmunpathogenese des Typ 1-Diabetes mellitus existieren zwei Hypothesen. Eine Hypothese geht von einer Immunantwort gegen virale Proteine, die eine Aminosäuresequenz mit Beta-Zell-Proteinen gemeinsam haben, aus, was die Infiltration der Langerhans-Inseln mit CD8-Zellen erklären würde. Die andere Hypothese postuliert eine Infektion der Beta-Zellen, die eine Entzündungsreaktion mit Mediatorfreisetzung und entzündlicher Infiltration hervorruft³.

1.1.4 Knochenveränderungen bei Typ 1-Diabetes mellitus

Im Tiermodell für lange bestehenden Diabetes mellitus, BB – Ratten (BB = Biobreeding) mit spontanem Diabetes mellitus, zeigt sich ein vermindertes trabekuläres Knochenvolumen sowie eine gestörte Osteoblastenfunktion bzw. –anzahl, was sich u.a. in erniedrigten Konzentrationen von Osteocalcin, einem Osteoblastenprodukt, im Serum ausdrückt¹⁰⁹. 1989 hatten Verhaeghe et al.¹¹⁰ bereits gezeigt, dass die Veränderungen bezüglich der Osteoblastenfunktion bzw. der Osteoblastenanzahl nicht durch ein geringeres Körpergewicht von diabetischen Ratten zu erklären sind. Ferner konnte eine verminderte Resistenz des Femurs von BB – Ratten gegen äußere Krafteinwirkung demonstriert werden¹⁰⁹. Unter Insulintherapie verbesserten sich die Knochenstoffwechselsituation, dabei u.a. auch die Werte für Osteocalcin, bei BB – Ratten¹¹¹.

Messungen der Knochendichte (Bone Mineral Density, BMD) bei Typ 1–Diabetikern zeigen z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Eine verminderte BMD bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden

Kontrollpersonen fanden u.a. Miazgowski und Czekalski ⁸⁰, Compston et al. ¹⁷, Krakauer et al. ⁶⁹, Hui et al. ⁵⁶ und Hampson et al. ⁴⁹, während Olmos et al. ⁸⁶ bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus eine normale BMD fanden. Allerdings können Unterschiede bezüglich Vorhandensein oder Ausmaß einer verringerten BMD durch unterschiedliche Meßverfahren und unterschiedliche Patientenkollektive bedingt sein. Es gibt auch Hinweise darauf, dass eine niedrige BMD bei Typ 1 – Diabetikern mit einem geringerem Lebensalter, längerer Diabetesdauer und höherer Insulindosis einhergeht ⁶⁵.

Auch bezüglich verschiedener Knochenstoffwechselfparameter liegen z.T. widersprüchliche Ergebnisse vor. Kayath et al. ⁶⁵ fanden bei Typ 1-Diabetikern Parathormon (PTH) im Normbereich und gesamten alkalischen Phosphatase (gAP) oberhalb des Normbereichs. Eine Erhöhung der gAP bei Patientinnen mit Typ 1-Diabetes mellitus im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv fanden Gallacher et al. ³⁶. Pedrazzoni et al. ⁸⁹ fanden PTH und Osteocalcin (OC) bei Typ 1-Diabetikern im Vergleich zu einem Normalkollektiv erniedrigt. Erniedrigte Osteocalcinwerte fanden Pietschmann et al. ⁹⁰ lediglich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus, bei denen bereits eine Mikroangiopathie vorlag, während bei Typ 1-Diabetikern, die diese Komplikation nicht hatten, bezüglich der OC - Werte kein Unterschied zu einem Kontrollkollektiv feststellbar war. Die PTH – Werte von Patienten und Kontrollkollektiv zeigten keine Unterschiede. PTH im Normbereich fanden auch Auwerx et al. ⁴ bei Typ 1-Diabetes mellitus. Die Untersuchung von Olmos et al. ⁸⁶ ergab erhöhte Werte für die gesamte alkalische Phosphatase (gAp) und erniedrigte Werte für OC bei Typ 1-Diabetikern im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv. Bouillon et al. ¹⁰ fanden ebenfalls ein erniedrigtes OC bei Typ 1-Diabetes mellitus im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen, und keine Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden hinsichtlich knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (BAP) und PICP (Carboxyterminal Extension Peptide of Procollagen). Höhere Werte für OC bei Typ 1-Diabetes mellitus fanden Miazgowski und Czekalski ⁸⁰.

In einer Verlaufsstudie von Bonfanti et al. ⁸ mit Kindern, die an Typ 1-Diabetes mellitus erkrankt sind, zeigte sich 3 Monate nach Manifestation der Krankheit ein signifikanter Anstieg des PICP verglichen mit dem Ausgangswert, sowie 3 und 12 Monate nach Manifestation erhöhte PICP – Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Guarneri et al. ⁴⁷ fanden erniedrigte Werte für OC

bei Kindern und Jugendlichen zum Zeitpunkt der Manifestation von Typ 1-Diabetes mellitus im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen. Nach 15 – tägiger Insulintherapie konnten diesbezüglich keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen festgestellt werden. OC und PTH waren bei den Kindern mit Typ 1-Diabetes mellitus nach 15 Tagen Therapie signifikant höher als zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation.

1.2 Knochenstoffwechsel

1.2.1 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)

Die im Serum meßbare alkalische Phosphatase (AP) ist kein einheitliches Enzym, sondern es handelt sich vielmehr um gewebespezifische Isoenzyme aus Leber, Knochen, Dünndarm oder Plazenta. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase steigt bei alternden Patienten an, v.a. bei postmenopausalen Frauen ¹⁹, sie ist dabei aber wenig sensitiv und spezifisch. Daher ist es gerade beim älteren Patienten oft schwierig zu entscheiden, ob der Anstieg der gAP auf hepatobiliäre Erkrankungen, Medikamenteneinnahme oder Osteomalazie zurückzuführen ist.

Bei einer Erhöhung der gAP ist hierfür meistens ein Anstieg der Leber- oder Knochen-AP verantwortlich. Die beiden Isoenzyme werden durch ein einziges Gen codiert und unterscheiden sich nur durch posttranslationale Modifikationen. Die knochenspezifische alkalische Phosphatase ist ein sensitiver Marker für einen verstärkten Knochenumsatz. Die Bestimmung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase ist deshalb gerade bei der Frage nach osteoporotischen Veränderungen mit einem oft nur diskret veränderten Knochenumsatz der gAP vorzuziehen. Deshalb spielt in der Praxis die Differenzierung zwischen diesen beiden Formen der AP die größte Rolle ^{51,107,114}.

1.2.2 Osteocalcin (OC)

Osteocalcin ist ein Peptid, das aus 49 Aminosäuren besteht. Es ist eines der wichtigsten nicht-kollagenen Proteine des Knochens. An den Positionen 17, 21

und 24 besitzt es drei Gamma-Carboxyglutamat-Reste und wird deswegen auch als Bone Gla-Protein oder BGP bezeichnet.

Die OC-Biosynthese wird durch Vitamin D₃ stimuliert und ist ohne Vitamin K nicht möglich. OC wird von Osteoblasten während des Knochenanbaus gebildet und primär in die Knochenmatrix eingebaut, jedoch gelangt auch ein Teil des gebildeten Osteocalcin in das periphere Blut. Das zirkulierende Osteocalcin besteht zu einem wesentlichen Anteil aus einem N-terminalen Fragment, das bei Spaltung des intakten Moleküls entsteht, und intaktem OC. Da die Halbwertszeit im Blut relativ kurz ist, ca. 5 Minuten, reflektiert der OC-Spiegel im Serum die Neusynthese des Proteins, wodurch die Osteocalcin-Bestimmung ein wertvolles Werkzeug zur Abschätzung des Knochenstoffwechsels ist. Da Osteocalcin ausschließlich durch Osteoblasten gebildet wird, repräsentiert es die Aktivität der Zellen, die für die Knochenneubildung verantwortlich sind^{41,76,22,29}. Histomorphometrische Untersuchungen belegen, daß Osteocalcin ein valider Marker des Knochenumsatzes ist²⁴.

Ca. 30% der Patienten mit postmenopausaler Osteoporose zeigen einen beschleunigten Knochenstoffwechsel (sog. high-turnover-Osteoporose), wobei hier in der Regel hochnormale bis erhöhte OC-Spiegel gemessen werden. Bei Patienten mit niedrigem Knochenumsatz (sog. low-turnover-Osteoporose) finden sich normale bis leicht erniedrigte Osteocalcinwerte⁹⁸.

1.2.3 Parathormon (PTH)

Intaktes und biologisch aktives Parathormon ist ein Polypeptid bestehend aus 84 Aminosäuren. Es wird gebildet in den Glandulae Parathyroideae als größeres Vorläufermolekül, das aus 115 Aminosäuren besteht und als Präproparathormon bezeichnet wird. Daraus entsteht ein Zwischenprodukt, das Proparathormon aus 90 Aminosäuren. Durch weitere proteolytische Modifikation entsteht hieraus schließlich das Parathormon. Die Halbwertszeit des intakten PTH liegt im peripheren Blut im Bereich von wenigen Minuten, wodurch es zu einem geeigneten Parameter für die metabolisch aktiven PTH-Mengen wird. Durch hepatische Degradation entstehen mehrere Fragmente, wobei sich in der Zirkulation das carboxyterminale (C-terminale) Fragment

findet, das aminoterminal (N-terminale) Teilstück ist nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar ⁹⁸.

PTH spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Unterschreitet der Serumkalziumspiegel die engen Grenzen des optimalen Bereichs, wird durch PTH Kalzium aus dem Knochen mobilisiert, vermehrt im Dünndarm aufgenommen und vermindert renal ausgeschieden ^{93,42,64}. Außerdem wird die Sekretion von PTH auch durch 1,25-(OH)-Vitamin D reguliert ⁹⁸.

PTH weist ein pulsatile Sekretionsmuster auf. Darüber hinaus besteht ein zirkadianer Rhythmus mit höheren Werten am Abend und nachts ⁹⁸.

1.2.4 C-terminales Propeptid des Typ-1-Kollagens (PICP)

Die von den Osteoblasten gebildete Knochenmatrix besteht aus Kollagen Typ 1. Dieses wird als hochmolekulares, lösliches Vorläufermolekül Prokollagen von den Osteoblasten sezerniert. Extrazellulär erfolgt die proteolytische Spaltung der amino- und carboxyterminalen Propeptide dieses Vorläufermoleküls. Diese Extensionspeptide, auch C- und N-terminale Propeptide genannt, stehen in einem stöchiometrischen Verhältnis zum gebildeten Kollagen.

Aufgrund unterschiedlicher immunochemischer Eigenschaften der verschiedenen Kollagentypen können Propeptide des Typ-I-Kollagens von Propeptiden anderer Kollagenarten unterschieden werden ⁹⁸.

Das PICP ist ein trimeres Glykoprotein mit einer Molekülgröße von mehr als 100 kD. Das Peptid wird durch Disulfidbrücken zwischen den Ketten stabilisiert. Das PICP, das bei der Bildung der Knochenmatrix abgespalten wird, ist im Serum nachweisbar und spiegelt die Osteoblastenaktivität wieder. Auch hier liegt wie bei anderen Parametern des Knochenstoffwechsels ein zirkadianer Rhythmus vor. In der Nacht werden hohe PICP-Spiegel gemessen, am Nachmittag hingegen niedrige ⁹⁸. Die Höhe des PICP-Spiegels korreliert sowohl mit histomorphometrischen Anbauparametern als auch mit anderen biochemischen Markern des Knochenbaus, wie Osteocalcin und knochenspezifische alkalische Phosphatase ^{88,99,79,23,29}. Dennoch ist die Wertigkeit des PICP hinsichtlich der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung noch nicht abschließend geklärt ⁹⁸.

1.2.5 DPD-Crosslinks

Ungefähr 90% der organischen Knochenmatrix bestehen aus Typ-I-Kollagen. Dieses wird durch spezifische Moleküle quervernetzt, wodurch die Stabilität des extrazellulären Kollagenfasernetzes gewährleistet wird. Die spezifischen Moleküle sind beim reifen Typ-I-Kollagen Pyridinium-Crosslinks, wozu Pyridinolin (PYR) und Deoxypyridinolin (DPD) zählen. PYR kommt im Knochen und Knorpel sowie weiteren Bindegeweben vor, während DPD ausschließlich im Knochen in relevanten Mengen zu finden ist. Während der Knochenresorption wird Kollagen abgebaut und DPD entsteht auf enzymatischem Wege durch Wirkung der Lysyloxidase an der Aminosäure Lysin. Bei resorptiven Vorgängen am Knochen fällt DPD an, gelangt in die Zirkulation und wird unverändert renal ausgeschieden. Die Werte für DPD, die im Urin gemessen werden, müssen entsprechend dem Kreatininwert im Urin korrigiert werden. DPD-Crosslinks fallen ausschließlich beim Prozeß der Kollagenresorption an und finden sich fast ausschließlich im Knochen ⁹⁸. Die Ausscheidung von DPD-Crosslinks korreliert gut mit der Kalziumkinetik des Knochenumsatzes und mit der Histomorphometrie des Knochens ²⁵. Die Tatsache, daß die Ausscheidung von DPD im Urin nicht durch Ernährungsgewohnheiten beeinflusst wird, macht es zu einem Parameter, der es erlaubt, resorptive Knochenumbauvorgänge abzuschätzen ^{23,113}.

Bei Gesunden liegt die DPD-Ausscheidung innerhalb relativ enger Grenzen. Bei postmenopausalen Frauen und Männern im höheren Lebensalter sind steigende DPD-Konzentrationen im Urin zu messen. Die Ausscheidung der DPD-Crosslinks unterliegt einer zirkadianen Rhythmik mit höheren Werten in den frühen Morgenstunden und niedrigeren Werten am Nachmittag. Bei Knochenerkrankungen mit einem high-turnover ist die DPD-Ausscheidung deutlich gesteigert, während bei Osteopathien mit niedrigem Knochenumsatz die Exkretion normal oder sogar erniedrigt sein kann ⁹⁸.

1.3 Vitamin D

1.3.1 Knocheneffekte

Vitamin D₃ ist wichtig für eine normale Knochenstruktur und für die homöostatische Kontrolle des Serumkalziumspiegels. Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃) ist der aktive Metabolit von Vitamin D₃ ⁶².

Vitamin D₃ entsteht zum größten Teil in der Haut durch den Einfluß ultravioletter Strahlung aus 7-Dehydrocholesterol, wodurch Prävitamin D₃ (Calciol) entsteht, welches durch Hydroxylierung in Leber und Niere in Calcitriol umgewandelt wird.

In vitro wurde gezeigt, daß Calcitriol auch an der Regulation von Differenzierung und Funktion spezialisierter Zellen, wie Knochenzellen, beteiligt ist ⁶².

Es konnte gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor Cbfa1 ein spezifischer Faktor der Osteoblastendifferenzierung ist, dessen Expression durch Behandlung mit Calcitriol gesteigert werden kann ⁶².

Skjodt et al. ¹⁰⁰ konnten an kultivierten Knochenzellen eine durch Calcitriol stimulierte Zellproliferation nachweisen. Durch höhere Dosen Calcitriol wurde die Osteocalcinsynthese der Knochenzellen, die spontan kein Osteocalcin produzierten, stimuliert. Die Proliferation der kultivierten Knochenzellen wurde durch die höheren Calcitrioldosen gehemmt.

Während die Serumspiegel des 25-OH-Vitamin D Aufschluß über die Versorgungslage des Organismus mit Vitamin D geben, erfolgt mit Bestimmung des 1,25-(OH)-Vitamin D der Nachweis des metabolisch aktiven Metaboliten ⁹⁸.

1.3.2 Immunsuppressive Wirkung

Außer seinem Einfluß auf den Knochenstoffwechsel hat Calcitriol auch antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften ⁶². Von entscheidender Rolle sind hier die Expression von Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) auf der Oberfläche von Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten im peripheren Blut, sowie die Inhibierung der Proliferation von T- und B-Lymphozyten und die Hemmung der IL-2- und IFN- γ -Sekretion von T-Lymphozyten durch Calcitriol ⁶².

Bereits 1986 konnte durch Manolagas et al.⁷⁵ gezeigt werden, daß aktivierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes 1,25(OH)₂Vitamin-D₃-Rezeptoren exprimieren und daß die Zellproliferation durch Calcitriol inhibiert werden kann.

Vanham et al.¹⁰⁶ zeigten die calcitriolinduzierte Unterdrückung der Proliferation von stimulierten unseparierten T-Lymphozyten und CD4-Zellen. Dieser Effekt trat bei Inkubation der Zellen mit Calcitriol und IL-2 nicht auf.

IL-12, das von myelomonozytischen Zellen produziert wird, spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von T-Helfer-1-Zellen, die an der Pathogenese von chronischen entzündlichen Autoimmunkrankheiten beteiligt sind. Calcitriol hemmt die IL-12-Produktion durch aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen, was sich in einer verminderten Produktion von mRNA und einer herabgesetzten Transkriptionsrate zeigt²¹.

Lemire und Archer⁷² zeigten an einem Mausmodell für T-zell-vermittelte Autoimmunitätsreaktionen (murine experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis, EAE), daß die Gabe von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Entstehung dieser Erkrankung bei immunisierten Mäusen verhindert.

Ebenso konnte in vivo bei NOD-Mäusen, die spontan eine autoimmune Insulitis entwickeln, in deren Verlauf ein autoimmuner Diabetes mellitus auftritt, ein präventiver Effekt der Langzeitbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Bezug auf die Entwicklung der Erkrankung nachgewiesen werden⁷⁷.

1.4 Vitamin-D-Rezeptor (VDR)

1.4.1 Wirkungsmechanismus

Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren. Er reguliert die Gentranskription positiv und negativ durch Bindung an hexamere kernbindende Strukturen in der Promotor-Region von Zielgenen, sogenannte Vitamin-D-responsive-Elemente (VREs). Der VDR besitzt, wie alle Mitglieder dieser Rezeptor-Familie, fünf funktionelle Domänen, von denen DBD (DNA-bindende Domänen) und verschiedene Regionen von LBD (Liganden-bindende Domänen) einschließlich der C-terminalen AF-2-Domäne gut untersucht sind⁶².

Calcitriol passiert die Zellmembran nach Bindung an Vitamin-D-bindendes-Protein (DBP). Durch schnelle nicht-genomische Wirkungen von Calcitriol kommt es zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen und Aktivierung von Second-Messenger-Systemen, die in Interaktion mit dem Zellkern treten. Ligandenaktivierung führt zu Phosphorylierung des VDR und nukleärem Transport. Dort homodimerisiert der VDR oder er heterodimerisiert mit einem RXR (Retinoid X – Rezeptor) genannten Faktor, um mit VREs in Promotoren bestimmter Gene interagieren zu können. Die ligandeninduzierte Heterodimerisierung von VDR und RXR scheint die Wechselwirkung mit DNA zu verstärken, während die funktionelle Bedeutung des VDR-Homodimers noch unklar scheint ⁶².

Die VDR-Aktivität hängt jedoch nicht nur von dem Vorhandensein eines optimalen Liganden ab, sondern auch von verschiedenen Second-Messenger-Systemen, welche die Phosphorylierung oder Stabilität des Rezeptors beeinflussen ¹¹.

1.4.2 VDR-Gen

Das VDR-Gen befindet sich auf Chromosom 12 und neuere Arbeiten deuten auf eine zentromerische Lage des VDR-Gens auf diesem Chromosom hin ¹⁰⁴.

Das VDR-Gen besteht aus 1281 Nukleotiden, die das VDR-Protein codieren, das aus 427 Aminosäuren besteht. Diesem Abschnitt geht eine nicht-codierende Sequenz aus 115 Basenpaaren voran. Ferner besteht das VDR-Gen noch aus einer 3,2 kb großen Region am 3'-Ende, die nicht translatiert wird (UTR = untranslated region). Das VDR-Gen verfügt über 11 Exons, die zusammen mit den dazwischenliegenden Introns mehr als 75 kb umspannen. Die nicht-codierende Region am 5'-Ende beinhaltet drei Exons, 1A, 1B und 1C, während die verbleibenden Exons das Translationsprodukt codieren ⁶².

1.4.3 VDR-Gen-Polymorphismen

Für das VDR-Gen sind verschiedene Längen-Polymorphismen von Restriktionsfragmenten (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) bekannt. Hierbei sind im Bereich der Introns am 3'-Ende die polymorphen Abschnitte gelegen, die durch die Restriktionsenzyme BsmI, TaqI und ApaI

gespalten werden, wobei die Polymorphismen BsmI und ApaI in Intron 8 und TaqI in Exon 9 gelegen sind ^{82,57}. Ein weiterer Polymorphismus, der mittels Spaltung durch das Restriktionsenzym FokI am 5'-Ende identifiziert wird, befindet sich im Bereich der Translationsinitiation (Startcodon), weshalb dieser Polymorphismus auch als Startcodon-Polymorphismus (SCP) bezeichnet wird ^{5,2,50,46}.

1.4.3.1 VDR-Gen-Polymorphismen und Knochendichte

Um den Einfluß von genetischen und umweltbedingten Faktoren auf die Knochendichte abzuschätzen, sind eine Vielzahl von Studien mit monozygoten und dizygoten Zwillingen durchgeführt worden. Hierbei wird davon ausgegangen, daß Unterschiede in der Knochendichte bei monozygoten Zwillingen allein auf umweltbedingte Faktoren zurückzuführen sind, da eine 100%ige genetische Identität besteht, während Unterschiede bei dizygoten Zwillingspaaren durch genetische und umweltbedingte Faktoren hervorgerufen sein können ⁶⁷. Zwillingsstudien von mehreren Untersuchern zeigen einen ausgeprägten Effekt genetischer Faktoren auf die Knochendichte sowohl an peripheren als auch an axialen Anteilen des Skeletts ^{67,26,91,101}.

Da die Osteocalcinproduktion und Kollagensynthese durch Calcitriol über den VDR reguliert werden, ist die Struktur des VDR-Gens möglicherweise an den genetischen Einflüssen auf die Knochendichte beteiligt. Auf dieser Hypothese basieren die zahlreichen Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und Knochendichte ⁶⁷.

Morrison et al. ⁸¹ beschreiben für den BsmI-Polymorphismus, daß dizygote Zwillinge mit dem gleichen VDR-Genotyp fast genauso ähnliche Knochendichten haben wie monozygote Zwillinge, während die Knochendichte sich bei den dizygoten Zwillingspaaren um bis zu 20% unterschied, wenn verschiedene Genotypen vorlagen. Es zeigte sich hier eine Assoziation des Genotyps BB (Abwesenheit der Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BsmI) mit niedriger Knochendichte, was auch bei den dizygoten Zwillingspaaren Ausdruck fand.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie von Fleet et al. ³³ mit prämenopausalen weißen und schwarzen amerikanischen Frauen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen BsmI-

Genotypen bei den beiden Rassen. In der Gesamtgruppe war die Knochendichte bei Probanden mit dem Genotyp BB geringer als bei Probanden mit den Genotypen Bb und bb.

Hingegen konnten Looney et al.⁷⁴ bei einer Population mit ausgeprägter Osteoporose keine Häufung des Genotyps BB im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe finden.

Salamone et al.⁹⁶ fanden bei prämenopausalen Frauen einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des bb-Genotyps und niedriger Knochendichte, während der BB- und Bb-Genotyp mit höherer Knochendichte einhergingen.

Ferrari et al.³² untersuchten ebenso den BsmI-Polymorphismus und fanden hier bei präpubertären und adoleszenten Mädchen eine niedrigere Knochendichte bei Vorliegen des Genotyps BB als bei den Genotypen Bb und bb. Bei prämenopausalen Frauen konnten hingegen keine Unterschiede bezüglich Knochendichte und verschiedenen VDR-Genotypen gesehen werden. In einer Studie mit postmenopausalen monozygoten und dizygoten Zwillingen¹⁰² zeigt sich ein Zusammenhang des Genotyps tt (Vorhandensein der Schnittstelle für die Endonuklease TaqI) des TaqI-Polymorphismus mit niedriger Knochendichte.

Riggs et al.⁹⁵ sahen in einem Kollektiv aus jungen gesunden Frauen und postmenopausalen osteoporotischen Frauen eine altersabhängige Assoziation zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und Knochendichte, und zwar dahingehend, daß der Effekt des Genotyps bei jungen Frauen ausgeprägter war, während bei den osteoporotischen postmenopausalen Frauen keine Unterschiede hinsichtlich bestimmter Genotypen zu erkennen waren. Hohe Knochendichte war bei den jungen Frauen mit dem Genotyp TT (oder aa oder bb) und niedrige Knochendichte im Bereich des Femurhalses war mit dem Genotyp tt (oder AA oder BB) assoziiert. Hustmeyer et al.⁵⁸ hingegen konnten bei einer Studie mit nordamerikanischen monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren keinen Zusammenhang zwischen Knochendichte und VDR-Gen-Polymorphismen (BsmI und TaqI, sowie Apal) sehen.

Ebenso analysierten Garnero et al.³⁹ ein Kollektiv aus gesunden, prämenopausalen Frauen hinsichtlich VDR-Gen-Polymorphismen mittels der Restriktionsendonukleasen BsmI, TaqI und Apal. Auch hier konnte keine

Assoziation zwischen dem VDR-Genotyp und der Knochendichte nachgewiesen werden.

Bei prämenopausalen japanischen Frauen konnten Arai et al.² einen Zusammenhang zwischen dem FokI-VDR-Polymorphismus und der Knochendichte zeigen. Hierbei ging der Genotyp ff mit geringerer Knochendichte als der Genotyp FF einher.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie von Gross et al.⁴⁵ mit postmenopausalen Frauen aus einer mexikanisch-amerikanisch-kaukasischen Population. Auch hier ging der Genotyp ff mit deutlich verringerter Knochendichte einher.

In einer Studie mit prämenopausalen weißen und schwarzen amerikanischen Frauen konnten Harris et al.⁵⁰ keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Rasse und FokI-Genotyp einerseits und Knochendichte andererseits entdecken. Allenfalls konnte eine Tendenz bei Frauen mit dem Genotyp ff zu einer geringeren Knochendichte festgestellt werden, sofern die Gruppe als Ganzes betrachtet wurde.

In der OFELY-Studie mit prämenopausalen französischen Frauen zeigte sich hingegen kein Zusammenhang zwischen FokI-Polymorphismen und der Knochendichte²⁸. Ferner zeigte sich der FokI-Genotyp auch unabhängig vom Bsml-Genotyp.

Auch Ferrari et al.³¹ konnten keinen Zusammenhang zwischen FokI-VDR-Gen-Polymorphismen und Knochendichte finden, weder für präpubertäre Mädchen noch für prämenopausale Frauen.

Zusammenfassend sind die Aussagen bezüglich des Zusammenhangs zwischen VDR-Genotypen und Knochendichte bisher widersprüchlich. Der Grund hierfür könnte in der Tatsache liegen, daß zumindest der Einfluß des Bsml-Polymorphismus offenbar altersabhängig zu sein scheint und vorwiegend bei prämenopausalen Frauen zu signifikanten Unterschieden in der Knochendichte führt. Weiterhin scheint der Einfluß der VDR-Polymorphismen von der Kalziumaufnahme mit der Nahrung abhängig zu sein³².

1.4.3.2 VDR-Gen-Polymorphismen und Knochenstoffwechsel

Die Knochendichte ist das Ergebnis von Auf- und Abbauvorgängen am Knochen. Der Umfang dieser Veränderungen des dynamischen Systems

Knochen kann mit bestimmten Parametern des Knochenstoffwechsels erfaßt werden ⁶⁷.

Der genetische Einfluß auf den Knochenstoffwechsel wurde, wie auch schon bei der Knochendichte, durch Zwillingsstudien mit monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren gezeigt. Hervorzuheben ist hier eine Studie von Kelly et al. ⁶⁶ mit australischen Zwillingspaaren. Hierbei zeigte sich, daß die Höhe der Werte für Osteocalcin, ein Osteoblastenprodukt, im Serum stark durch genetische Einflüsse bestimmt wird.

Garnero et al. ³⁸ zeigten in einer Studie mit monozygoten und dizygoten postmenopausalen Zwillingspaaren, daß ein ausgeprägter genetischer Einfluss auf verschiedene Marker des Knochenstoffwechsels besteht. Dies gilt v.a. für Osteocalcin, die knochenspezifische alkalische Phosphatase und PICP. Ein Trend konnte hier auch für die Crosslinks gezeigt werden.

Morrison et al. ⁸² zeigten, dass die VDR-Genotypen BB und AA mit signifikant höheren Osteocalcinwerten bei knochengesunden australischen Probanden einhergingen, während bei den VDR-Genotypen bb und aa niedrigere Osteocalcinspiegel vorlagen.

In einer Studie mit postmenopausalen Frauen konnten Garnero et al. ⁴⁰ keinen Zusammenhang zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und dem Knochenstoffwechsel zeigen. Es wurden die Polymorphismen BsmI, ApaI und TaqI sowie als Knochenstoffwechselformparameter Osteocalcin und PICP als Aufbauparameter und NTX, CTX und Pyrilink-D als Abbauparameter untersucht. Ebenso bestand kein Zusammenhang zwischen VDR-Genotyp und Knochendichte.

Garnero et al. ³⁹ fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen VDR-Genotypen und Knochenstoffwechsel bei gesunden prämenopausalen französischen Frauen. Die untersuchten Polymorphismen waren BsmI, TaqI und ApaI, die untersuchten Knochenstoffwechselformparameter waren Osteocalcin, PICP, knochenspezifische alkalische Phosphatase, NTX und Crosslaps. Ebenso fand sich im Rahmen dieser Studie keine Assoziation zwischen VDR-Polymorphismen und Knochendichte.

1.4.3.3 VDR-Gen Polymorphismen und Typ 1-Diabetes mellitus

Vitamin D hat immunmodulatorische Eigenschaften, was sich in Versuchen mit NOD-Mäusen, einem Tiermodell für Typ 1-Diabetes mellitus, gezeigt hat. Mathieu et al.⁷⁷ konnten zeigen, daß die Gabe von Vitamin D bei diesen Tieren die Entwicklung einer Autoimmuninsulitis und die konsekutive Entstehung eines Typ 1-Diabetes mellitus verhinderte.

Boucher et al.⁹ zeigten in einer Studie mit in England lebenden Bangladeschi, dass bei Personen mit hohem Risiko, einen Typ 1-Diabetes mellitus zu entwickeln, die Vitamin-D-Spiegel im Serum erniedrigt waren.

Ebenfalls in einer Studie mit in London lebenden Bangladeschi mit Risiko zur Entwicklung eines Typ 2-Diabetes mellitus konnte ein Zusammenhang zwischen Insulinsekretion und VDR-Genotypen gesehen werden. Hitman et al.⁵⁴ untersuchten VDR-Polymorphismen für die Restriktionsendonukleasen BsmI, ApaI und TaqI. Nur für den ApaI-Polymorphismus wurde ein Effekt auf die Insulinsekretion bei den untersuchten Personen gesehen, und zwar ging der Genotyp aa mit niedriger Insulinsekretion einher, während sich für den Genotyp AA eine hohe und für den Genotyp Aa eine mittlere Insulinsekretion fanden.

In einer Studie mit in London lebenden Indern, die an Typ 1-Diabetes mellitus erkrankt waren, und deren Eltern, konnten McDermott et al.⁷⁸ zeigen, dass die VDR-Genotypen Bb und bb gehäuft bei den erkrankten Studienteilnehmern vorlagen. Für die Polymorphismen TaqI und ApaI konnte kein gehäuftes Auftreten bestimmter Genotypen bei Typ 1-Diabetikern nachgewiesen werden.

Hauache et al.⁵² untersuchten in einer Studie mit brasilianischen Typ-1-Diabetikern die Häufigkeit bestimmter VDR-Genotypen mit Hilfe des BsmI-Polymorphismus sowie die Knochendichte bei diesen Patienten. Hierbei zeigte sich, daß bei den Typ 1-Diabetikern eine niedrigere Knochendichte vorlag als bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Verteilung der VDR-Genotypen nach dem BsmI-Polymorphismus unterschied sich bei den Diabetikern nicht von der bei den Gesunden. Es zeigte sich allerdings, dass innerhalb der Diabetikergruppe der Genotyp BB mit niedrigerer Knochendichte und kürzerer Erkrankungsdauer einherging als die Genotypen Bb und bb.

In einer Studie mit taiwanesischen Typ 1-Diabetikern¹⁴, zeigte sich eine Assoziation bestimmter VDR-Gen-Polymorphismen mit Typ 1-Diabetes mellitus. Hierzu wurde die Häufigkeit der einzelnen VDR-Genotypen für die

Polymorphismen BsmI, ApaI und TaqI bei Typ 1-Diabetikern mit der Häufigkeit bei einer Kontrollgruppe aus gesunden Personen verglichen. Hierbei traten die Genotypen BB und Bb signifikant häufiger bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus auf als bei den gesunden Kontrollpersonen. Ebenso bestand ein Trend, wenn auch keine Signifikanz erreicht wurde, für ein häufigeres Auftreten der Genotypen AA und Aa bei Typ 1-Diabetikern.

Pani et al.⁸⁷ untersuchten Haplotypen der VDR-Polymorphismen bei Familien, in denen mindestens ein Mitglied an Typ 1-Diabetes mellitus erkrankt war. Hierbei zeigte sich, daß die Haplotypen At und Bt mit einem erhöhten Risiko an Typ 1-Diabetes mellitus zu erkranken einhergingen, während die Haplotypen AT und at protektiv gegenüber der Erkrankung zu wirken scheinen. Die stärkste Suszeptibilität für die Erkrankung zeigte sich für den Haplotypen Bat.

2.Fragestellung

Hinsichtlich des Auftretens bestimmter VDR-Gen-Polymorphismen und einem veränderten Knochenstoffwechsel sowie der Assoziation mit Typ 1-Diabetes mellitus zeigen die vorhandenen Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse.

Für die vorliegende Arbeit wurden Parameter des Knochenstoffwechsels und VDR-Gen-Polymorphismen an einem Kollektiv von 75 Typ 1-Diabetikern und 57 gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen bezüglich der Verteilung von VDR-Gen-Polymorphismen?
2. Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen hinsichtlich der Knochenstoffwechselfparameter?
3. Korreliert die Höhe des HbA1c bei Typ 1-Diabetikern mit Parametern des Knochenstoffwechsels?
4. Unterscheiden sich Knochenstoffwechselfparameter bei Typ-1-Diabetikern bei Betrachtung getrennt nach Männern und Frauen im Vergleich mit den Parametern des Knochenstoffwechsels bei gesunden Kontrollpersonen?
5. Unterscheiden sich die verschiedenen VDR-Genotypen hinsichtlich der Höhe der biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels?

3.Material und Methoden

3.1 Patienten

Einbezogen in die Studie wurden 75 Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus (32 Frauen, 43 Männer) mit einem mittlerem Alter von $33,6 \pm 10,8$ Jahren. Der Typ 1-Diabetes mellitus wurde anhand der WHO-Kriterien diagnostiziert (Alberti und Zimmet, 1998).

Bei den weiblichen Typ 1-Diabetikern wurde der menopausale Status dokumentiert.

Die durchschnittliche Dauer des Typ 1-Diabetes mellitus betrug $126,2 \pm 125,7$ Monate (Umfang 2 bis 596 Monate), das durchschnittliche Alter bei Manifestation des Diabetes betrug $23,2 \pm 11,8$ Jahre.

Es bestanden bei keinem Patienten zusätzliche Erkrankungen oder Medikationen, die den Knochenumsatz beeinflussen.

Das Einverständnis zur Teilnahme an dieser Untersuchung wurde nach Information von allen Teilnehmern eingeholt.

3.2 Vergleichskollektiv

Als Kontrollgruppe dienten 57 Personen, die bezüglich Alter und Geschlechtsverteilung der Patientengruppe angepaßt waren. Bei den Kontrollpersonen handelte es sich um Mitarbeiter der Klinik, sowie um Patienten, die die Klinik wegen eines allgemeinen Gesundheits-Check-up besuchten, aber letztendlich gesund waren und um Patienten, deren Erkrankungen den Knochenstoffwechsel nicht beeinflussen und nicht zu den Autoimmunerkrankungen gerechnet werden. Ferner wurden auch von keinem Untersuchungsteilnehmer der Kontrollgruppe Medikamente eingenommen, die den Knochenumsatz beeinflussen.

Das Einverständnis zur Teilnahme an dieser Untersuchung wurde nach Information von allen Teilnehmern eingeholt.

3.3 Knochenstoffwechsel

3.3.1 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)

Die Aktivität der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (BAP) im Serum wurde mit einem Enzymimmunoassay (EIA) – Kit (Alkphase-B, Metra Biosystems, Mountain View, CA, USA) bestimmt. Während der Erstinkubation bindet das in den Standards, Kontrollen bzw. in den Proben vorliegende BAP an den in den Kavitäten auf der Mikrotiterplatte gebundenen monoklonalen Maus-anti-BAP-Antikörper. Durch mehrmaliges Waschen wird ungebundenes BAP aus den Proben entfernt.

Nach Zugabe von p-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat wird das an den Antikörper gebundene BAP während einer 30-minütigen Inkubation zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt. Nach Abbruch der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von Stopplösung (1 M NaOH) erfolgt die Messung der Enzymaktivität im Enzymimmunoassay-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm, wobei die gemessene optische Dichte (OD) zur BAP-Aktivität direkt proportional ist.

Die Kreuzreaktivität dieses Kits mit der in der Leber gebildeten alkalischen Phosphatase wurde von verschiedenen Autoren untersucht, und umfaßt in diesen Studien einen Bereich zwischen 3-20% ^{92,43,51,107,114,113}.

3.3.2 Osteocalcin (OC)

Intaktes Osteocalcin im Serum wurde mittels eines zweiseitigen immunoradiometrischen Assay (IRMA) – Kit (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA) und durch eine immunoluminometrische Methode (Immulite – Diagnostic Products Corporation, CA, USA) bestimmt ³⁰. Da beide Methoden eine hohe Konkordanz zeigten, wurden für die Auswertung nur die mit der immunoradiometrischen Methode, die auch in der gängigen Literatur beschrieben wird ^{41,76,22,29}, ermittelten Werte herangezogen. Hierbei wird eine Serumprobe gleichzeitig mit einem biotinbeladenen Antikörper, dem radioaktiv markierten Antikörper und einem avidinummantelten Kunststoffkugelnchen inkubiert. Das in der Probe enthaltene Osteocalcin bindet an die beiden Antikörper und wird von ihnen wie in einem Sandwich eingeschlossen. Dieses „Sandwich“ bindet dann an das Kunststoffkugelnchen. Nach dem Ende der

Inkubationszeit wird die Probe gewaschen, um ungebundene Antikörper und andere Partikel zu entfernen. Mittels eines Gamma-Counters wird dann die Radioaktivität der Kügelchen gemessen. Die Radioaktivität des Antikörperkomplexes ist der Menge an Osteocalcin in der Probe direkt proportional.

3.3.3 Parathormon (PTH)

Intaktes parathyreoidales Hormon (Parathormon, PTH) wurde mit einem immunoradiometrischen Assay (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA) bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine Methode, die bereits von mehreren Autoren beschrieben wurde^{93,42,64}. Hierbei wird die Probe gleichzeitig mit zwei Antikörpern inkubiert, der eine Antikörper befindet sich auf Kunststoffkügelchen und bindet am PTH-Molekül C-terminal und in einer Mitteregion, der andere Antikörper bindet ausschließlich N-terminal und ist radioaktiv markiert. Die Antikörper und das PTH bilden einen „Sandwich“-Komplex. Nach dem Ende der Inkubationszeit folgt ein Waschschriff, um überflüssige Antikörper und eventuell vorhandene andere Partikel zu entfernen. Die Radioaktivität des an die Kunststoffkügelchen gebundenen Komplexes wird mit Hilfe eines Gamma-Counters gemessen. Die gemessene Radioaktivität ist dem Gehalt der Probe an intaktem PTH direkt proportional.

3.3.4 Carboxyterminales Propeptid des Typ-1-Kollagens (PICP)

PICP wurde im Serum mittels eines Sandwich-Immunoassay quantitativ bestimmt (Prolagen-C-IEMA, Metra Biosystems, Palo Alto, CA, USA). Die Proben werden in mit Anti-PICP-beschichtete (Maus, monoklonal) Kavitäten von Mikrotiterplatten pipettiert und dort inkubiert. Anschließend werden ungebundene Reaktionspartner in einem Waschschriff entfernt. Dann erfolgt ein zweiter Inkubationsschriff mit einem polyklonalen Anti-PICP-Kaninchenantikörper. Auch hier folgt wieder ein Waschschriff. An den Kaninchenantikörper bindet das Enzymkonjugat (Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt an alkalische Phosphatase). Ein erneutes Waschen folgt. Anschließend wird als Substrat p-Nitrophenyl-Phosphat hinzugefügt, das durch das gebundene Enzym in einer 30minütigen Inkubationszeit zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt

wird, dessen optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wird, die der Konzentration von PICP in der Probe direkt proportional ist ¹¹².

3.3.5 Desoxypyridinolin-Crosslinks (DPD-Crosslinks)

Um die resorptiven Vorgänge am Knochen abzuschätzen, wurde Deoxypyridinolin (DPD) im Urin bestimmt. Hierbei wurde eine immunoluminometrische Methode, die auf einem kompetitiven Immunoassay basiert ⁹⁷, verwendet (Immulate Pyrilinks-D™, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Dabei wurde das im Urin gemessene DPD auf den Kreatininwert im Urin bezogen.

3.3.6 25-OH-Vitamin D

25-OH-Vitamin D (25-OH-D) wurde mit einem kompetitiven Protein-Bindungs-Assay (ImmunDiagnostik, Bensheim, Deutschland) mit der modifizierten Methode nach Haddad et al. ⁴⁸ bestimmt. Dieser Testkit arbeitet nach dem Prinzip eines kompetitiven Proteinbindungsassay. Das 25-OH-Vitamin D der Probe konkurriert mit dem zugesetzten Tracer (³H 25-OH-Vitamin D um die Bindung an das Vitamin D-bindende Protein (VDBP, Gc-Globulin). Da *in vivo* das gesamte zirkulierende 25-OH-Vitamin D an VDBP gebunden vorliegt, müssen die Proben mit Acetonitril präzipitiert werden, um den Analyt freizusetzen. Der Überstand kann dann ohne weitere Vorbehandlung im Test eingesetzt werden. Im ersten Schritt werden Tracer und Probe bzw. Standard pipettiert. Im zweiten Schritt wird dann das Vitamin D Bindungsprotein hinzugegeben. Das 25-OH- Vitamin D der Probe kompetitiert mit dem Tracer um die spezifische Bindung an das VDBP. Mit steigender Analyt-Konzentration in der Probe wird weniger VDBP über den Tracer gebunden. Ungebundener Tracer wird über Aktivkohle gebunden und abzentrifugiert. Die verbliebene Radioaktivität des Überstandes wird im Beta-Counter gezählt.

3.4 Kreatinin

Kreatinin-Werte im Serum und im Urin wurde mittels eines kinetischen Farbtests (Jaffé-Methode) ermittelt. Hierbei wird der Probe zunächst

Natronlauge hinzugefügt, in einem zweiten Schritt dann Pikrinsäure. Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelb-orange gefärbten Komplex, dessen Farbintensität, die direkt proportional der Kreatininkonzentration ist, photometrisch gemessen wird.

3.5 HbA_{1c}

HbA_{1c} wurde mittels HPLC bestimmt, wobei ein HbA_{1c}-Recorder-Pack für Diamat™-Analyzer verwendet wurde (BIO-RAD Laboratories GmbH München, Deutschland).

3.6 Genotypisierung

3.6.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der genomischen DNA wurde mit Standardmethoden aus peripheren Leukozyten des Blutes durchgeführt. Die Erythrozyten wurden durch Zugabe von 9 ml Solution A (0,32 M Saccharose, 0,01 M Tris-Puffer, 5 mM MgCl und 1% Triton X) zu 3 ml EDTA-Blut lysiert. Diese Mischung wurde 10 Minuten lang auf Eis gekühlt und dabei vermischt, anschließend 15 Minuten bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Pellet mit 3 ml Solution A gewaschen. Auch hier wurde der Überstand wieder vorsichtig abgesaugt. Das Pellet ist in diesem Zustand bei –80°C lagerbar oder kann sofort weiter verarbeitet werden.

Zur Proteolyse wurde das Pellet in 1,5 ml SE-Puffer (Natrium-EDTA-Puffer, 25 nM EDTA, 75 mM NaCl, pH 8) gelöst. Hierzu wurden 10 µl Proteinase K (Konzentration 10mg/ml) und 200 µl SDS 10% gegeben. Dies wurde dann über Nacht, mindestens jedoch 1,5 h, bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Nach beendeter Inkubationszeit wurde das Proteolyseergebnis mit 500 µl NaCl (6 M) gemischt und diese Lösung 15 s lang mit dem Vortexgerät gemischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 4000 rpm für 15 Minuten bei 20°C. Der hierbei entstandene Überstand (Volumen ca. 5 ml) wurde in ein neues Tube dekantiert und mit 10 ml 100%igem Ethanol mit der Temperatur –20°C durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Das hierbei sichtbar werdende DNA-Knäuel wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette in ein Cap gegeben und einem

weiteren Waschschrift mit 70%igem Ethanol, ebenfalls mit der Temperatur –20°C, unterzogen. Es folgte eine erneute Zentrifugierung. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und Ethanolreste abpipettiert. Die im Cap verbliebene DNA wurde in 200 µl Tris-Puffer (10mM, pH 8) bei 37°C im Wasserbad entspiralisiert und die Lösung dann bei –20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Diese DNA-Stammlösung wurde dann zum Einsatz bei der PCR im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, auch diese verdünnten Lösungen wurden bei –20°C aufbewahrt.

3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann.

Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonukleotidprimer, sogenannte Amplimer. Dabei handelt es sich um kurze einsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (Template) sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Alle diese DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Um diese Synthese zu wiederholen, muß man die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufschmelzen und nach dem Abkühlen der Mischung die Primer wieder binden lassen. Sobald die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde. Dabei dienen auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen so dazu bei, daß bei jedem neuen Zyklus die Konzentration der vervielfältigten Zielsequenzen ansteigt.

Im ersten Zyklus werden zuerst entlang der ursprünglichen Matrize neue DNA-Stränge gebildet. Sie haben noch keine definierte Länge, da die DNA-Polymerase so lange DNA synthetisiert, bis sie entweder von alleine anhält oder vom Beginn einer neuen Vermehrungsrunde unterbrochen wird. Auch im zweiten Zyklus ist die Länge der Negativkopien noch nicht festgelegt. Doch ab

der dritten Runde wird dann nur noch die Zielsequenz gebildet, die durch die Position der Primer in der Originalmatrize vorgegeben ist. Ab dem vierten Zyklus vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell. Ihre Kopienzahl nach Abschluß der Reaktion läßt sich nach der Gleichung $(2^n - 2n) \times x$ berechnen. Hierbei bedeutet n = Anzahl der Vermehrungszyklen, $2n$ = Produkte der ersten zwei Vermehrungszyklen, deren Länge nicht definiert ist und x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize.

Nach 20 PCR-Runden sollte sich die gesuchte DNA 2^{20} fach vermehrt haben, vorausgesetzt, daß die Ausbeute in jeder Runde 100-prozentig ist. Wie effizient eine PCR ist, ist jedoch von Matrize zu Matrize unterschiedlich. Die Effizienz hängt außerdem davon ab, inwieweit man die Methode optimiert hat. Letztlich ist bei Überschuß von DNA die Enzymmenge der begrenzende Faktor für die Reaktion. Die Aktivität des Enzyms nimmt ab, da auch die hitzestabilen DNA-Polymerasen im Laufe mehrerer Zyklen durch die Hitze denaturiert werden. Mit zunehmender Konzentration der gewünschten Stränge vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effizienz der Vervielfältigung, da diese Reaktion mit der Anlagerung der Primer konkurriert (Beschreibung aus: Newton & Graham 1994 ⁸⁵).

Für die vorliegende Untersuchung wurde ein Thermocycler der Firma Hybaid-AGS (Hybaid PCR Sprint, Hybaid-AGS, Heidelberg) verwendet. Bei der verwendeten Taq-Polymerase handelt es sich um AmpliTaq Gold™ und bei dem entsprechenden Puffer um GeneAmp® 10x PCR Gold Buffer (beide Produkte von P.E. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Der für den BsmI-Polymorphismus verwendete Primer hat in sense-Richtung die Sequenz 5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3' und in antisense-Richtung die Sequenz 5'-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3' ⁸¹. Das bei der PCR mit diesen Primern entstehende PCR-Produkt umfaßt 800 bp (bp = Basenpaare).

Für den TaqI-Polymorphismus wurde ein Primer mit der Sequenz 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3' in sense-Richtung und der Sequenz 5'-GCA ACT CT CAT GGC TGA GGT CTC-3' in antisense-Richtung verwendet ¹³. Hierbei entstand ein PCR-Produkt mit der Länge von 740 bp.

Die PCR zur Bestimmung des FokI-Polymorphismus wurde mit Primern durchgeführt, die in sense-Richtung die Sequenz 5'-AGC TGG CCC TGG CAC

TGA CTC TGC TCT-3`und in antisense-Richtung die Sequenz 5`-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC TCC CTC-3` haben ⁴⁶. Das hierbei entstandene PCR-Produkt hatte eine Länge von 265 bp.

Die verwendeten Primer werden hergestellt von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg.

Ferner wurde eine handelsübliche Mischung von dNTPs verwendet (Fisher Scientific GmbH, Nidderau).

Pro PCR-Durchlauf wurden maximal 18 Proben untersucht sowie eine Leerkontrolle, um sicherzustellen, dass keine Kontamination der Reagenzien mit Fremd-DNA vorlag.

Der PCR-Ablauf bestand aus einer Aktivation der Taq-Polymerase bei 94°C für 5 Minuten, dann folgte der zyklische Ablauf mit einem DNA-Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 Minute, Anlagerung der Primer (58°C für 1 Minute bei BsmI, 60°C für 1 Minute bei TaqI und FokI) und Verlängerung der Primer zur Zielsequenz bei 72°C für 1 Minute und 30 Sekunden. Dieser Schritt wurde 45 Mal wiederholt. Abschließend folgte noch ein Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Der Ansatz für die PCR bestand pro Probe jeweils aus 5 µl 10x konzentrierter Puffer, je 12,5 µmol dATP, dCTP, dTTP und dGTP, 10 pmol Primer in sense-Richtung, 10 pmol Primer in antisense-Richtung, 1 Einheit Taq-Polymerase, 1 µl DNA-Lösung (1:20 verdünnt aus der Stammlösung) und 36,8 µl dH₂O.

Das PCR-Produkt wurde mittels einer Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und diese unter UV-Bestrahlung - in diesem Fall wurde ein UV-Transilluminator der Firma AGS, Heidelberg, verwendet - sichtbar macht. Eine Polaroid®-Fotografie des Gels dokumentierte das PCR-Ergebnis.

Um die Größe der sichtbarwerdenden Banden beurteilen zu können, wurde ein Marker, der Markierungen an definierten Stellen (z.B. 100bp, 200bp, etc.) enthält, aufgetragen. Bei der PCR zum BsmI-Polymorphismus zeigte sich ein PCR-Produkt mit der Länge 800 bp, bei der PCR zum TaqI-Polymorphismus ein PCR-Produkt mit 740 bp und bei der PCR zum FokI-Polymorphismus ein PCR-Produkt mit 265 bp.

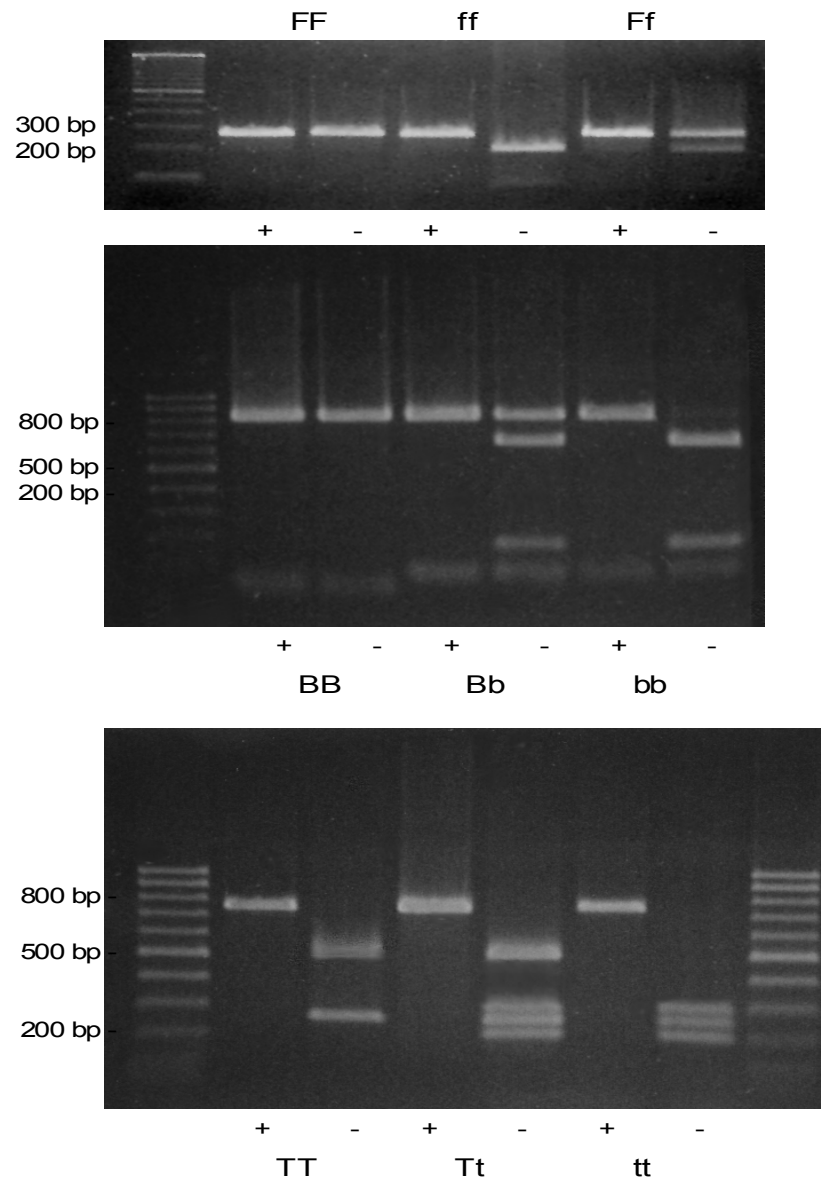
3.6.3 Bestimmung der Restriktionsfragmentpolymorphismen (RFLPs)

Restriktionsendonukleasen spalten DNA an ganz bestimmten Sequenzen. Wird durch Mutation eine Base in einer solchen Erkennungssequenz verändert, spaltet das betreffende Restriktionsenzym an dieser Stelle nicht mehr. Umgekehrt können durch Mutationen auch neue Restriktionsstellen entstehen. Je nach Vorhandensein der jeweiligen für dieses Restriktionsenzym spezifischen Schnittstelle entstehen also unterschiedlich lange Restriktionsfragmente nach Inkubation der DNA mit dem entsprechenden Enzym. Dieser Effekt wird als Längenpolymorphismus von Restriktionsfragmenten bezeichnet. Mittels Gelelektrophorese kann man dann diese Fragmente sichtbar machen.

Die PCR-Produkte zur Bestimmung des BsmI-Polymorphismus wurden über Nacht bei 65°C im Wasserbad mit dem Restriktionsenzym BsmI (Hybaid AGS, Heidelberg, Germany), dessen Schnittsequenz 5'...G A A T G C N...3' bzw. 3'...C T T A C G N...5' lautet, inkubiert. In einem Ansatz befanden sich hierbei 5 µl des mitgelieferten 10x konzentrierten Puffers, 2 µl Enzym (10 Units), 33 µl dH₂O und 10 µl PCR-Produkt. Zur Beurteilung des Restriktionsenzymverdaus erfolgte eine Elektrophorese wie bereits oben beschrieben. Bei homozygoten Proben ergaben sich bei Vorhandensein der Schnittstelle (bb) in der Gelelektrophorese zwei Banden, eine mit der Länge von 650 bp und eine mit 150 bp, bei Abwesenheit (BB) der Schnittstelle zeigte sich eine Bande mit 800 bp Länge, entsprechend dem unverdaulichem PCR-Produkt. Proben von heterozygoten Individuen (bB) zeigten in der Gelelektrophorese drei Banden, und zwar bei der Länge von 800 bp, 650 bp und 150 bp.

Für den TaqI-Polymorphismus wurden die entsprechenden PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym TaqI (Hybaid AGS, Heidelberg, Germany) über Nacht bei 70°C im Wasserbad inkubiert. In einem Ansatz befanden sich hierbei 5 µl des mitgelieferten 10x konzentrierten Puffers, 2 µl Enzym (10 Units), 33 µl dH₂O und 10 µl PCR-Produkt. Die Schnittsequenz von TaqI wird mit 5'...T C A G...3' bzw. 3'...A G T C...5' beschrieben. Bei Proben von homozygoten Individuen waren in der Gelelektrophorese bei Anwesenheit der Schnittstelle (tt) drei Banden mit der Länge 245 bp, 290 bp und 205 bp zu erkennen. Bei homozygoter Abwesenheit der Schnittstelle (TT) waren zwei Banden mit der

Länge 495 bp und 245 bp zu sehen. Die Proben heterozygoter Individuen (tT) zeigten vier Banden mit einer Länge von 495 bp, 290 bp, 245 bp und 205 bp. Zur Bestimmung des FokI-Polymorphismus wurde das Restriktionsenzym FokI (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) für 2 h mit dem entsprechenden PCR-Produkt bei 37°C im Wasserbad inkubiert. In einem Ansatz befanden sich hierbei 5 µl Puffer, 2,5 µl Enzym (10 Units), 32,5 µl dH₂O und 10 µl PCR-Produkt. Die Schnittstelle für FokI lautet 5'...G G A T G (N)₉...3' bzw., 3'...C C T C (N)₁₃...5'. Bei Proben von Individuen, bei denen für das Vorhandensein der betreffenden Schnittstelle Homozygotie (ff) vorlag, zeigten sich in der Gelelektrophorese zwei Banden mit der Länge 196 bp und 69 bp. Bei den für die Abwesenheit der Schnittstelle homozygoten Individuen (FF) zeigte sich eine Bande bei 265 bp. Heterozygotie (fF) war demnach durch das Erscheinen von drei Banden mit 265 bp, 196 bp und 69 bp gekennzeichnet.



3.7 Statistische Auswertung

Es wurde eine explorative Analyse vom Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Verwendung von SPSS 6.1.3 durchgeführt. Eine deskriptive statistische Analyse (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) wurde in beiden Patientengruppen mit allen klinischen und biochemischen Parametern durchgeführt. Die Verteilung von Alter, BMI und Geschlecht bei Patienten und Kontrollen wurde mittels Wilcoxon-Rang-Summen-Test für unverbundene Stichproben und χ^2 -Test verglichen. Ebenso wurde der Vergleich der Parameter des Knochenstoffwechsels zwischen Patienten und Kontrollpersonen sowie zwischen Männern und Frauen mittels Wilcoxon-Rang-Summen-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt; Assoziationen zwischen individuellem VDR-Genotyp und Genotyp-Kombinationen mit klinischen und laborchemischen Daten wurden durch den Kruskal-Wallis-Test abgeschätzt. Korrelationen zwischen biochemischen Parametern des Knochenstoffwechsels in der gesamten untersuchten Gruppe sowie getrennt für Männer und Frauen wurden durch Spearman-Rang-Korrelations-Test abgeschätzt, ebenso die Korrelationen zwischen HbA1c, Krankheitsdauer und Knochenstoffwechselfparametern. Unterschiede in der Verteilung von VDR-Genotypen und Kombinationen von BsmI- und TaqI-Genotypen zwischen Patienten und Kontrollen und zwischen Männern und Frauen sowie Konkordanz zwischen Genotypen wurden mittels χ^2 -Test ermittelt. Da die vorgenommene statistische Analyse explorativen Charakter besitzt, wurden keine Korrekturen für multiples Testen vorgenommen.

Signifikanzniveaus von $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant, $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,01$ als hochsignifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

In der Verteilung von Alter (Man-Whitney-U-Test) und Geschlecht (Chi²-Test) bei Patienten- und Kontrollkollektiv wurde statistisch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden.

	Typ 1-Diabetes mellitus	Kontrollen
Anzahl Frauen (%)	33 (44%)	30 (53%)
Alter Frauen (Jahre)	34,1 ± 11,1	34,8 ± 11,3
Anzahl Männer (%)	42 (56%)	27 (47%)
Alter Männer (Jahre)	33,6 ± 10,4	32,0 ± 10,5

Tabelle 1: Altersverteilung bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

Der mittlere Body Mass Index (BMI) betrug bei Typ-1-Diabetikern $24,0 \pm 3,3$ kg/m² und zeigte keinen signifikanten Unterschied (Man-Whitney-U-Test) zum mittleren BMI von $25,3 \pm 5,3$ kg/m² bei gesunden Kontrollpersonen.

10 Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus zeigten eine Mikroalbuminurie mit einer Albuminexkretion von > 20 mg/l Urin. Die Kreatininwerte im Serum waren bei diesen Patienten jedoch normal und die Knochenstoffwechselfparameter zeigten keinen Unterschied zu denen der Typ-1-Diabetiker ohne Mikroalbuminurie. Aus diesem Grund wurden Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus sowohl mit als auch ohne diese Art von diabetischer Nephropathie zu einer Gruppe zusammengefaßt.

4.1 Häufigkeit der VDR-Gen-Allele bei Typ-1-Diabetikern und Kontrollkollektiv

Die Verteilung der Häufigkeiten des TaqI-Gen-Polymorphismus war mit $p = 0,037$ in den beiden untersuchten Gruppen signifikant unterschiedlich (Chi²-Test), und zwar mit einer größeren Häufigkeit des TT-Genotyps und einem seltenerem Vorkommen des tt-Genotyps bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

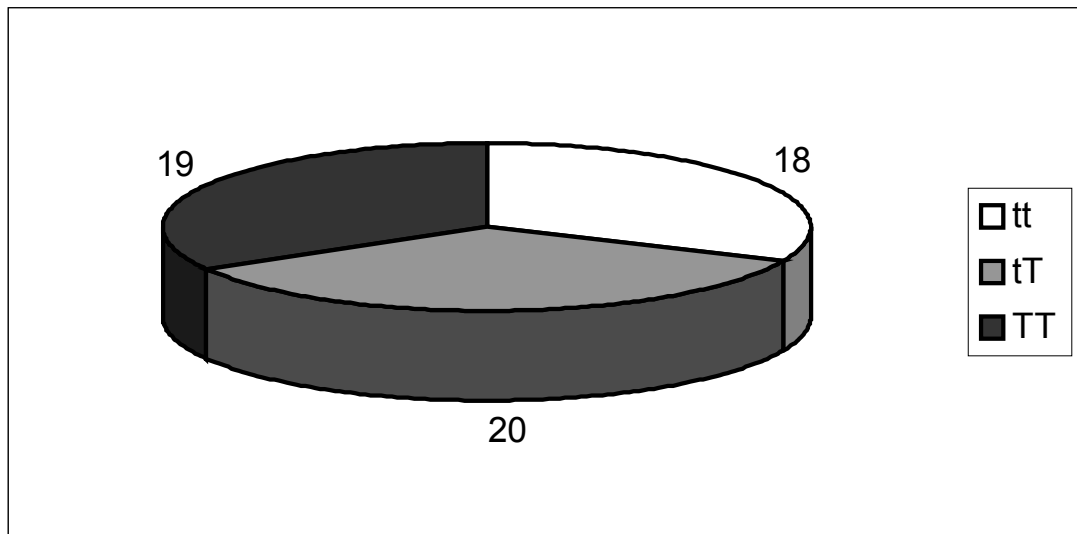


Abbildung 1: Verteilung der TaqI-Genotypen bei gesunden Kontrollpersonen

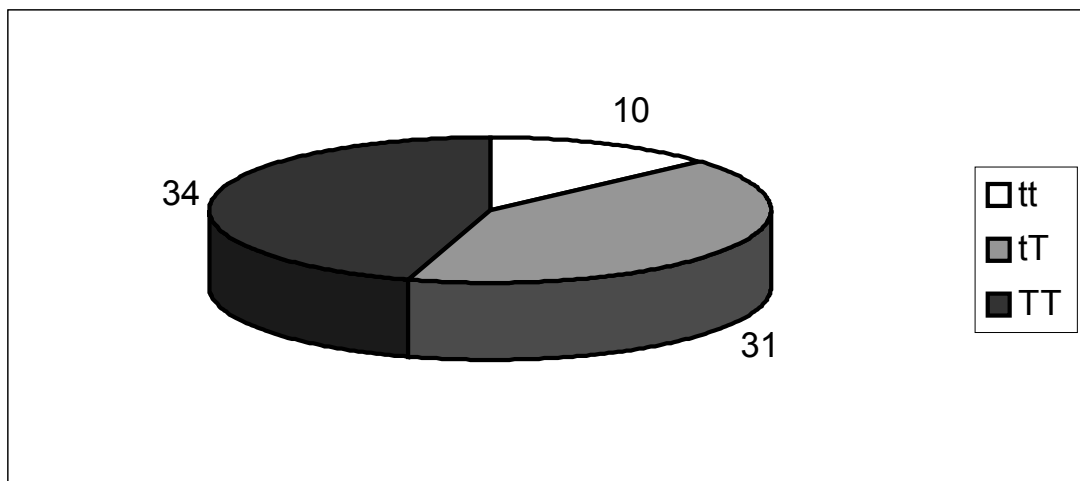


Abbildung 2: Verteilung der TaqI-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus

Bsml - und FokI - Genotypen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Verteilung in den beiden untersuchten Gruppen (Bsml-Polymorphismus $p = 0,185$ und FokI-Polymorphismus $p = 0,279$), allerdings war ein Trend zu einem gehäuftem Vorkommen der Genotypen bb

und FF sowie einer selteneren Inzidenz der Genotypen BB und fF bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 erkennbar.

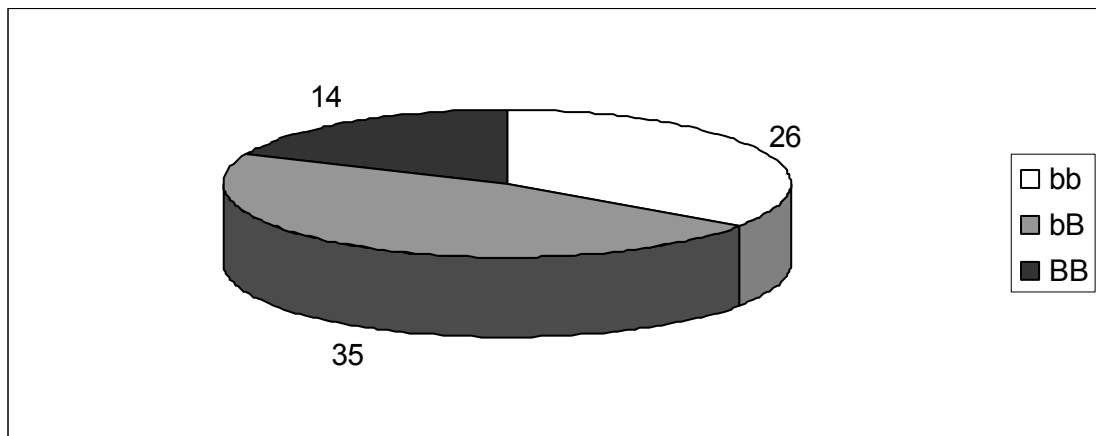


Abbildung 3: Verteilung der BsmI-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus

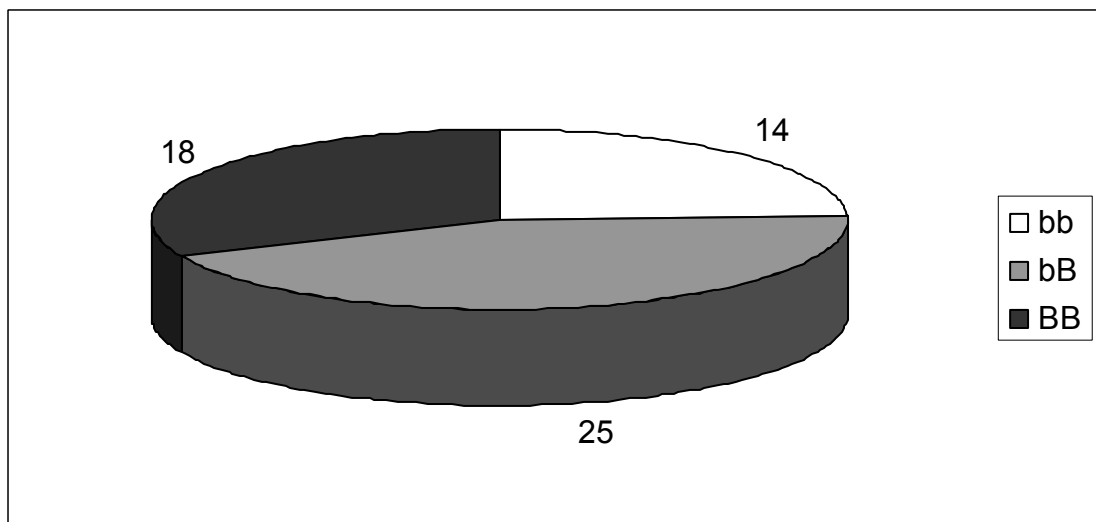


Abbildung 4: Verteilung der BsmI-Genotypen bei gesunden Kontrollpersonen

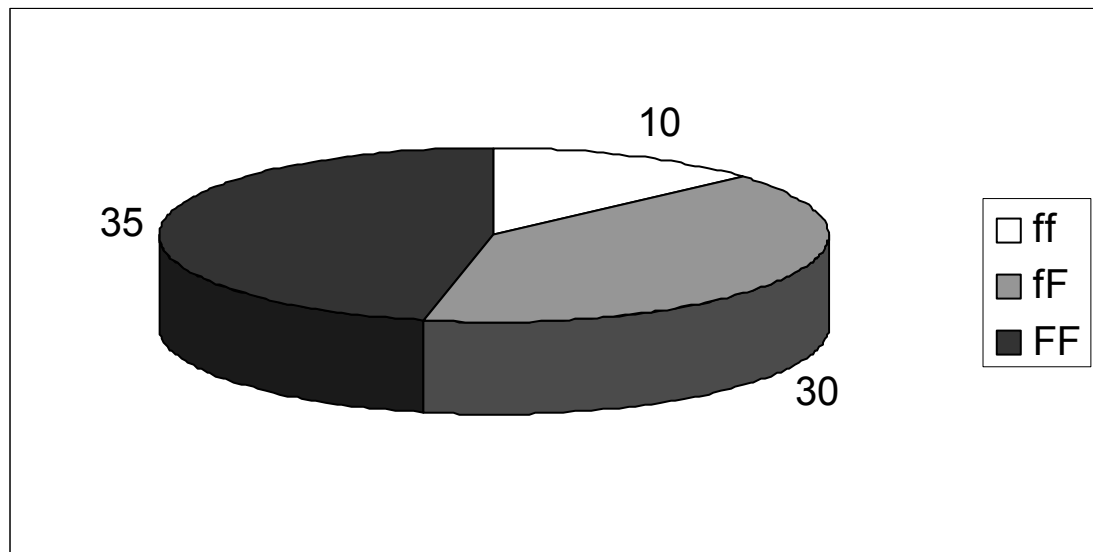


Abbildung 5: Verteilung der FokI-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus

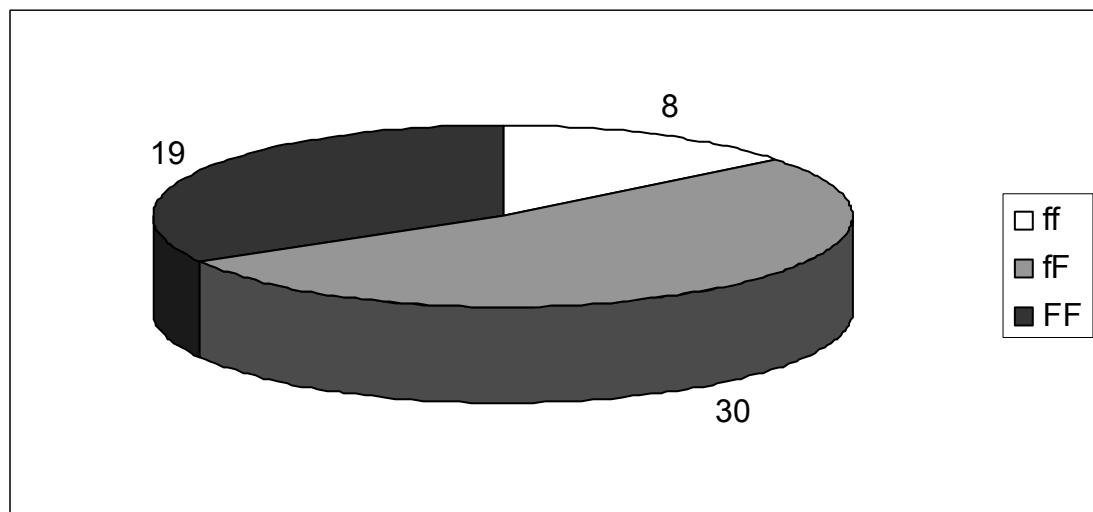


Abbildung 6: Verteilung der FokI-Genotypen bei gesunden Kontrollpersonen

Es wurde eine häufige Assoziation der Allele b und T sowie der Allele B und t beobachtet ($\chi^2 = 105,9$; $p = 0,0001$). Bei Betrachtung von Patienten und gesunden Kontrollpersonen als Gesamtheit zeigte sich, daß 66% der Personen, die homozygot für das T-Allel waren auch homozygot in Bezug auf das b-Allel waren, während umgekehrt 75% der untersuchten Personen, die homozygot bezüglich des t-Allels waren auch Homozygotie hinsichtlich des B-Allels aufwiesen.

Genotyp	Anzahl Diabetes Typ 1 (%)	Anzahl Kontrollen (%)	p-Wert
bb	26 (34,7)	14 (24,6)	0,185
bB	35 (46,7)	25 (43,9)	
BB	14 (18,7)	18 (31,6)	
tt	10 (13,3)	18 (31,6)	0,037
tT	31 (41,3)	20 (35,1)	
TT	34 (45,3)	19 (33,3)	
ff	10 (13,3)	8 (14,0)	0,279
fF	30 (40,0)	30 (52,6)	
FF	35 (46,7)	19 (33,3)	

Tabelle 2: Verteilung der VDR-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

4.2 Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels

Im Gesamtkollektiv zeigte sich eine reziproke Korrelation zwischen Lebensalter und der Höhe der Werte für knochenspezifischen alkalischen Phosphatase ($r = -0,309$; $p < 0,001$), d.h. jüngere Patienten hatten höhere Werte bezüglich dieses Parameters. Die anderen gemessenen Parameter wiesen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der geschlechtlichen und altersspezifischen Verteilung bei gemeinsamer Betrachtung von Typ 1-Diabetikern und Kontrollpersonen auf.

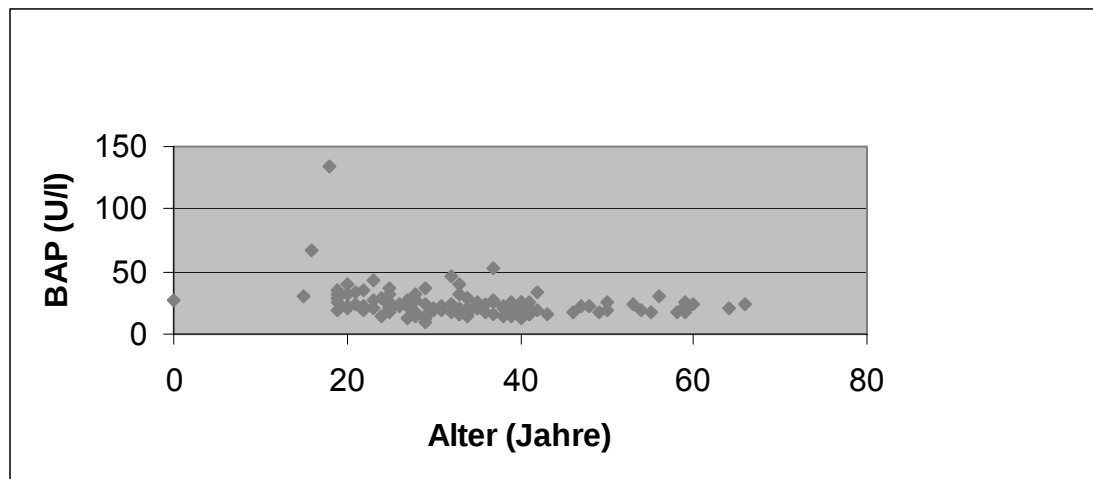


Abbildung 7: Korrelation von BAP und Lebensalter der untersuchten Personen ($r = -0,309$; $p < 0,001$)

Als hochsignifikant erwies sich die Korrelation zwischen PICP und knochenspezifischer alkalischer Phosphatase ($r = 0,5283$; $p < 0,001$) sowie zwischen Osteocalcin und knochenspezifischer alkalischer Phosphatase ($r = 0,5298$; $p < 0,001$).

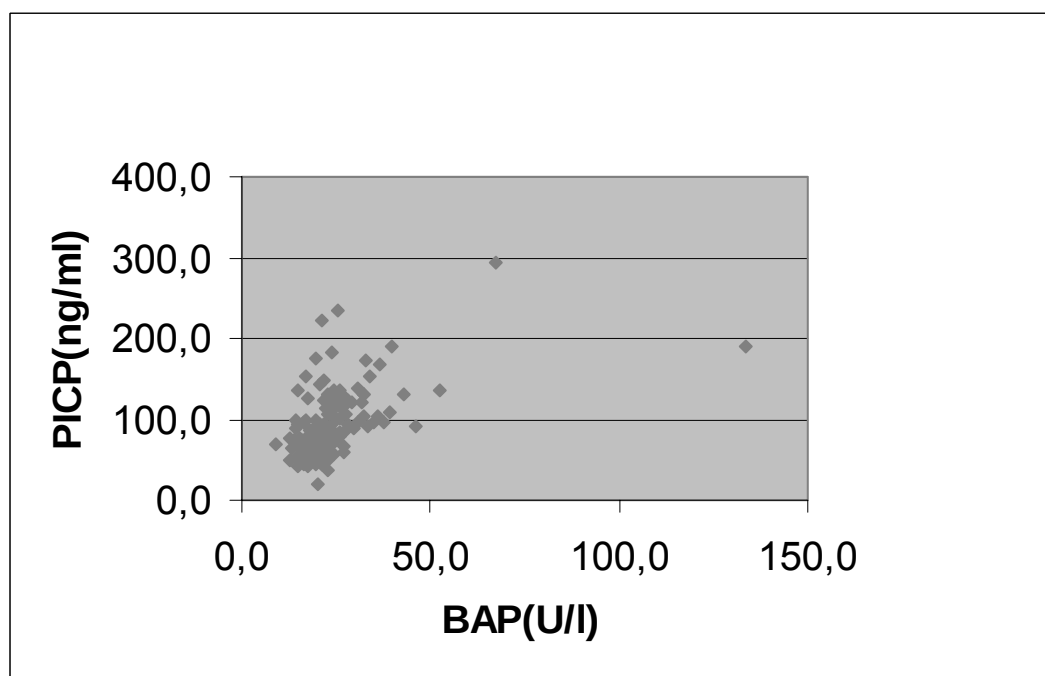


Abbildung 8: Korrelation von BAP und PICP im Gesamtkollektiv ($r = 0,5283$; $p < 0,001$)

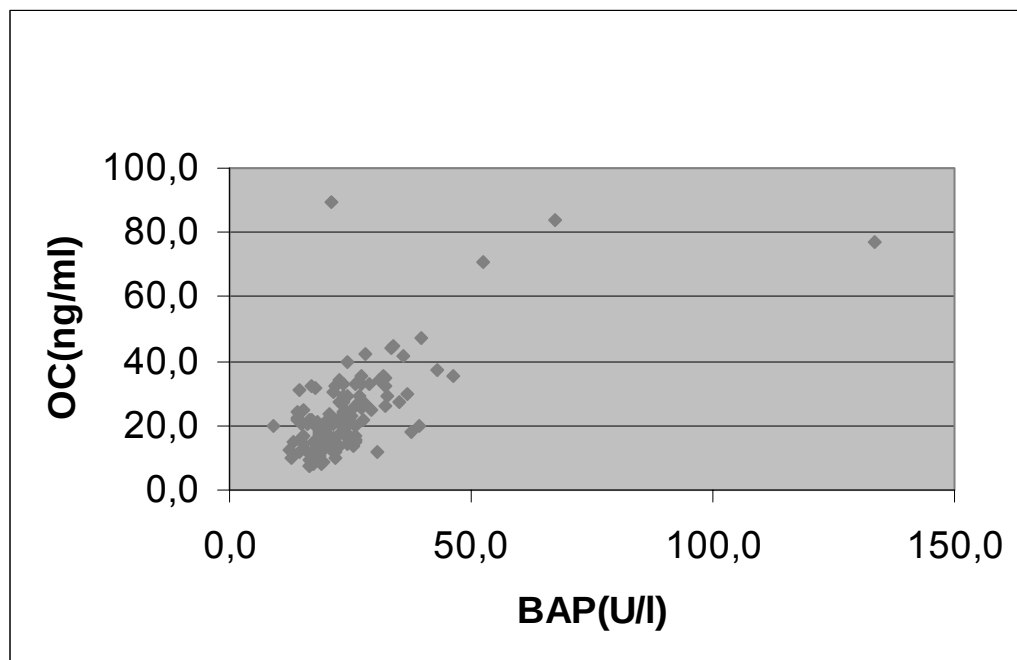


Abbildung 9: Korrelation von BAP und OC im Gesamtkollektiv ($r = 0,5298$; $p < 0,001$)

4.3 Metabolische Kontrolle und Knochenstoffwechsel

Der mittlere Wert für HbA1c betrug bei den diabetischen Patienten (Männer und Frauen insgesamt) $7,6 \pm 1,6$ %. Eine Korrelation dieses Wertes mit der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase, PICP, Osteocalcin, 25-OH-Vitamin D, PTH, DPD-Exkretion im Urin und Diabetesdauer konnte nicht festgestellt werden.

4.4 VDR-Gen-Allele und Knochenstoffwechsel

Der Vergleich der verschiedenen VDR-Genotypen mit den Parametern des Knochenstoffwechsels ergab keine Assoziation bestimmter Genotypen mit Veränderungen des Knochenmetabolismus.

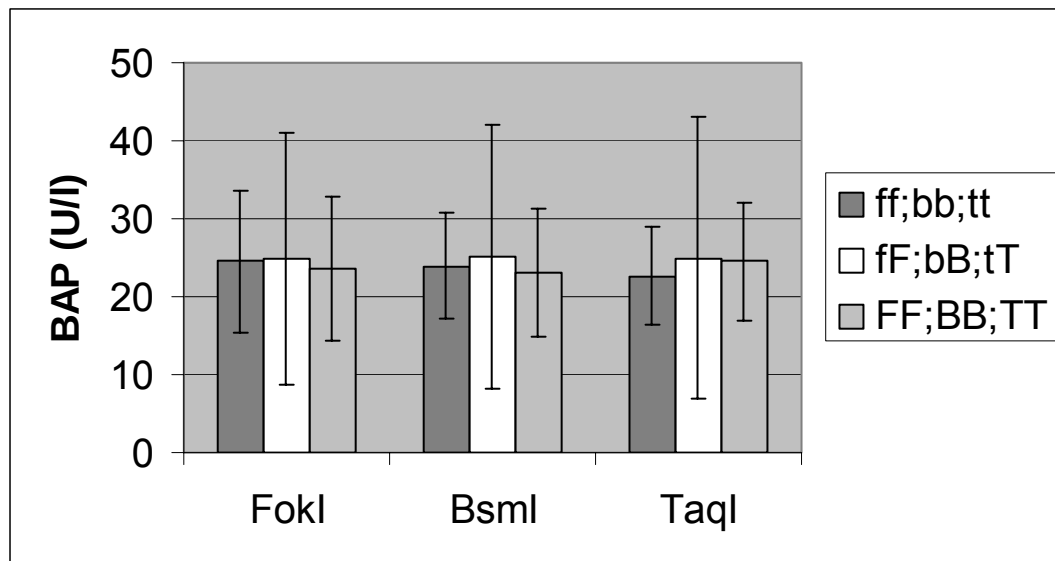


Abbildung 10: BAP bei FokI-, BsmI-, und TaqI-Polymorphismen

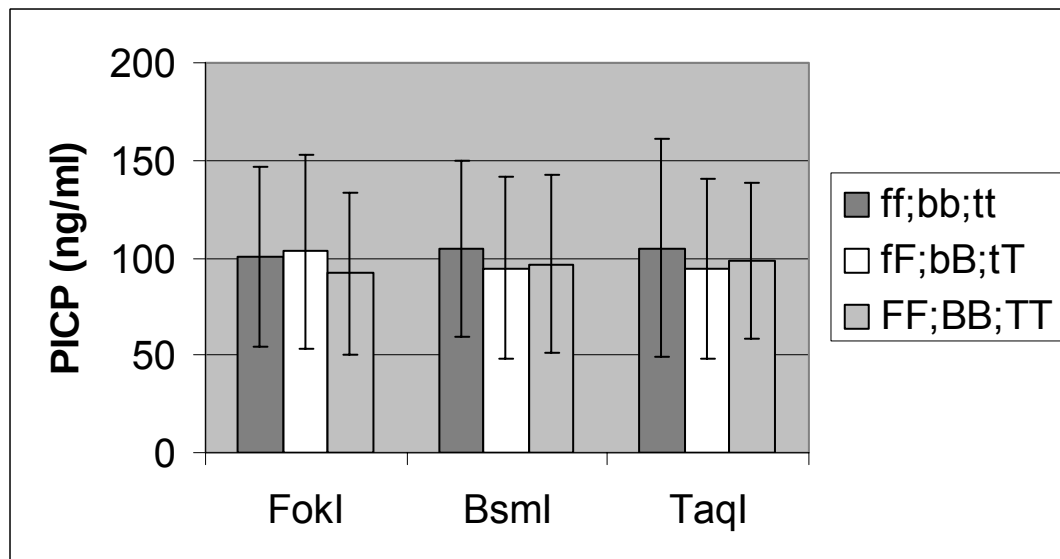


Abbildung 11: PICP bei FokI-, BsmI-, und TaqI-Polymorphismen

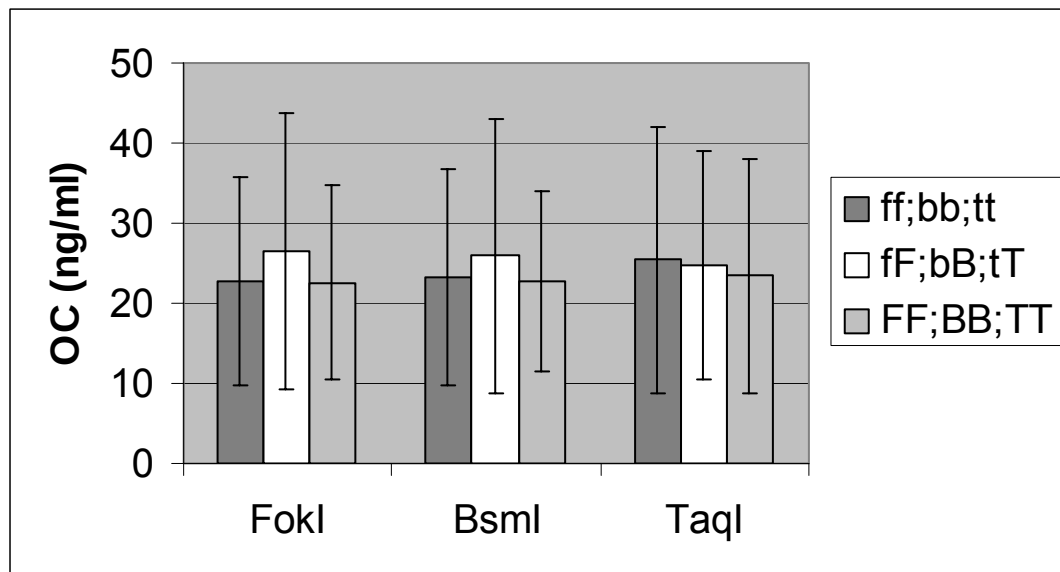


Abbildung 12: OC bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen

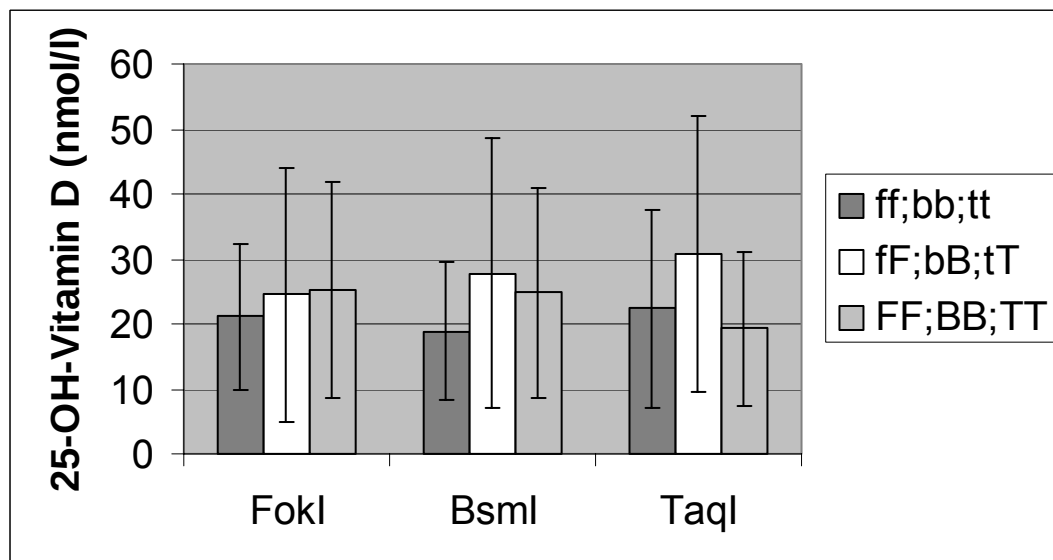


Abbildung 13: 25-OH-Vitamin D bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen

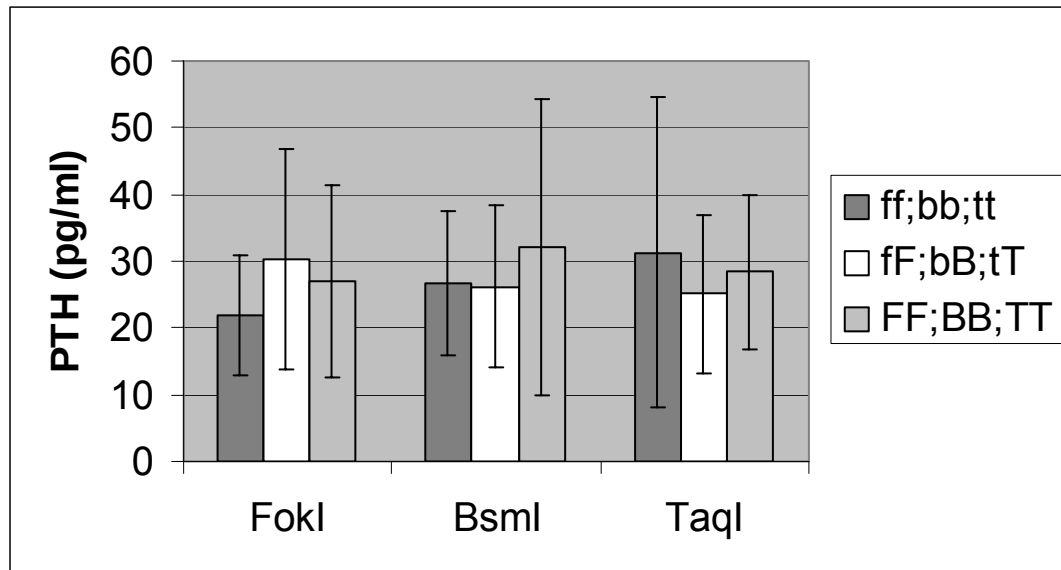


Abbildung 14: PTH bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen

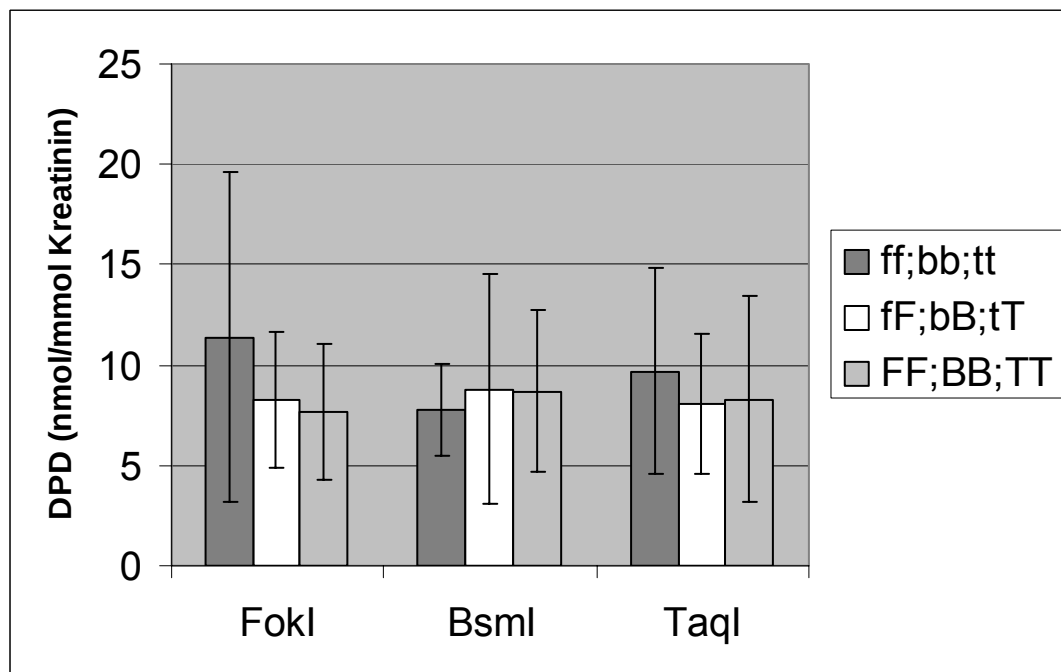


Abbildung 15: DPD-Crosslinks bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen

4.5 Knochenstoffwechsel und Geschlecht

Beim Vergleich der Geschlechter untereinander fiel auf, dass Männer, innerhalb der Grenzen des Normbereichs, einen signifikant höheren Knochenstoffwechsel hatten als Frauen. Dies zeigte sich für die knochenspezifische alkalische Phosphatase ($26,8 \pm 15,5$ U/l bei Männern vs. $21,6 \pm 7,3$ U/l bei Frauen, $p < 0,01$), PICP ($105,0 \pm 45,0$ ng/ml bei Männern vs. $90,7 \pm 46,1$ ng/ml bei Frauen, $p < 0,05$) und Osteocalcin ($27,1 \pm 16,8$ ng/ml bei Männern vs. $21,4 \pm 11,7$ ng/ml bei Frauen, $p < 0,05$).

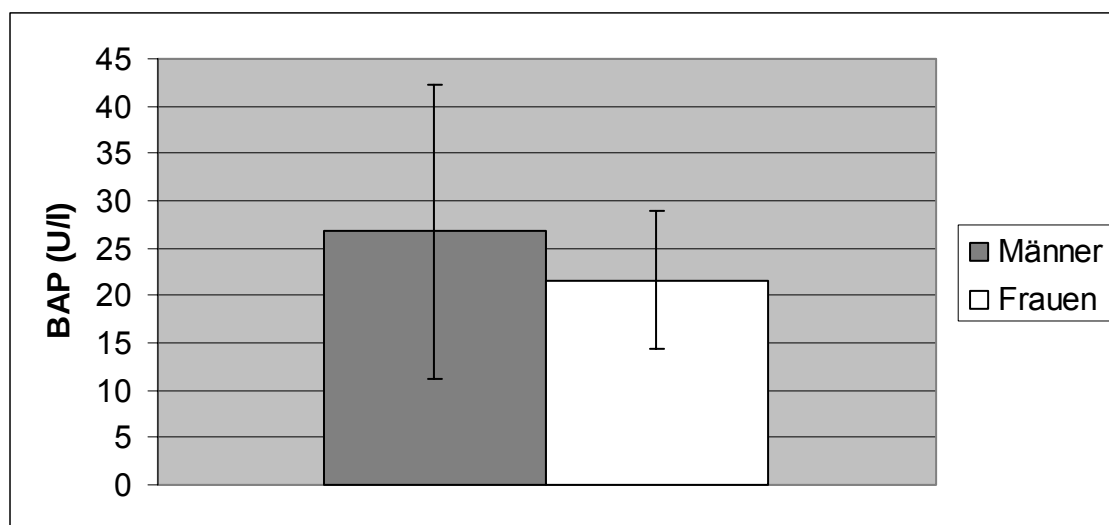


Abbildung 16: BAP im Geschlechtervergleich des Gesamtkollektivs, signifikant höhere Werte bei den untersuchten Männern ($p < 0,001$)

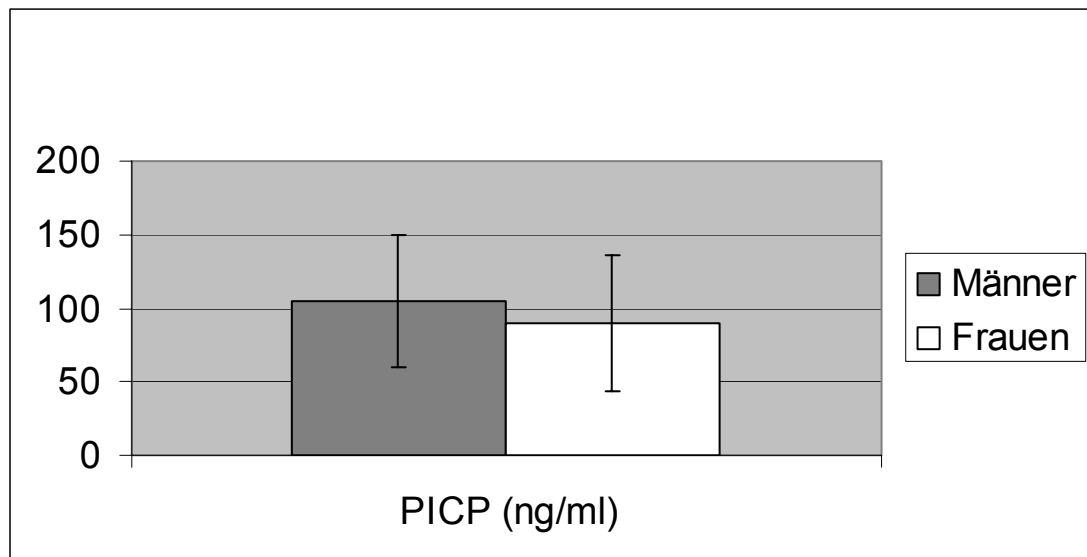


Abbildung 17: OICP im Geschlechtervergleich des Gesamtkollektivs, signifikant höhere Werte bei den untersuchten Männern ($p < 0,05$)

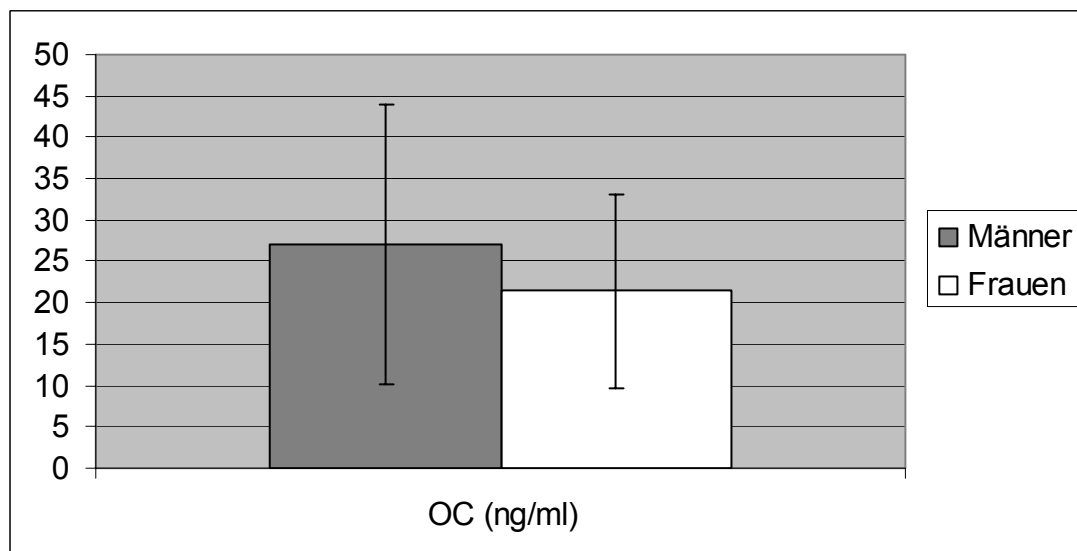


Abbildung 18: OC im Geschlechtervergleich des Gesamtkollektivs, signifikant höhere Werte bei den untersuchten Männern ($p < 0,05$)

In der Gruppe der Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus zeigten sich für die Parameter PICP ($p < 0,01$), BAP ($p < 0,05$), und Osteocalcin ($p=0,05$) signifikant höhere Werte bei den männlichen Patienten im Vergleich zu den

weiblichen Patienten. Bei den weiblichen Typ-1-Diabetikern zeigten sich hingegen signifikant höhere Werte für DPD-Crosslinks ($p < 0,05$) und 25-OH-Vitamin D ($p < 0,05$) im Vergleich mit den Männern. Bei den gesunden Kontrollpersonen zeigten sich signifikant höhere Werte bei den Männern nur bei dem Parameter BAP ($p < 0,05$) und signifikant höhere Werte bei den weiblichen Kontrollpersonen für die Pyridinium-Crosslinks ($p < 0,01$).

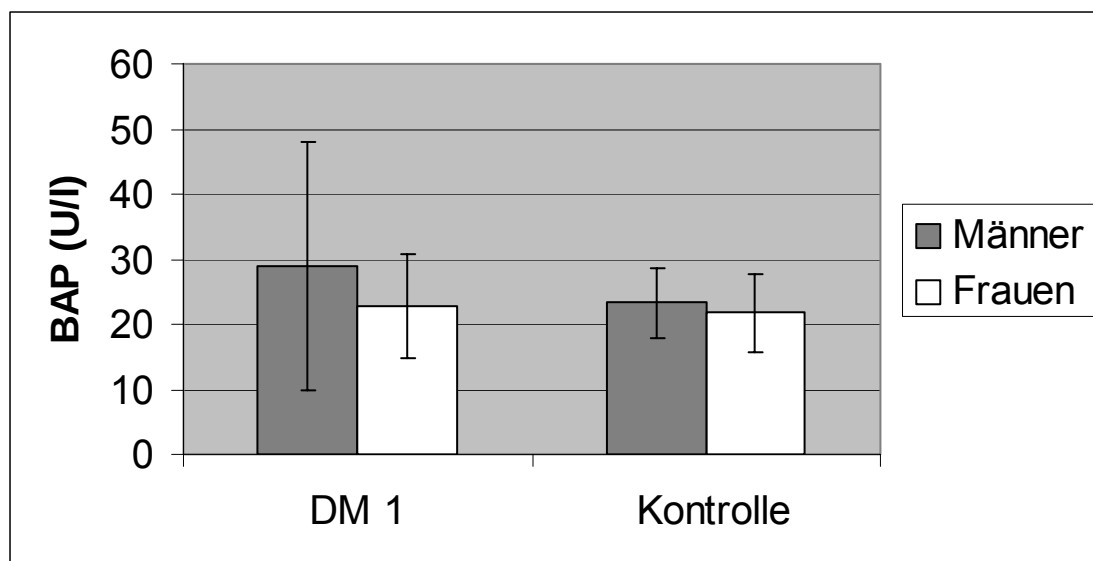


Abbildung 19: BAP im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

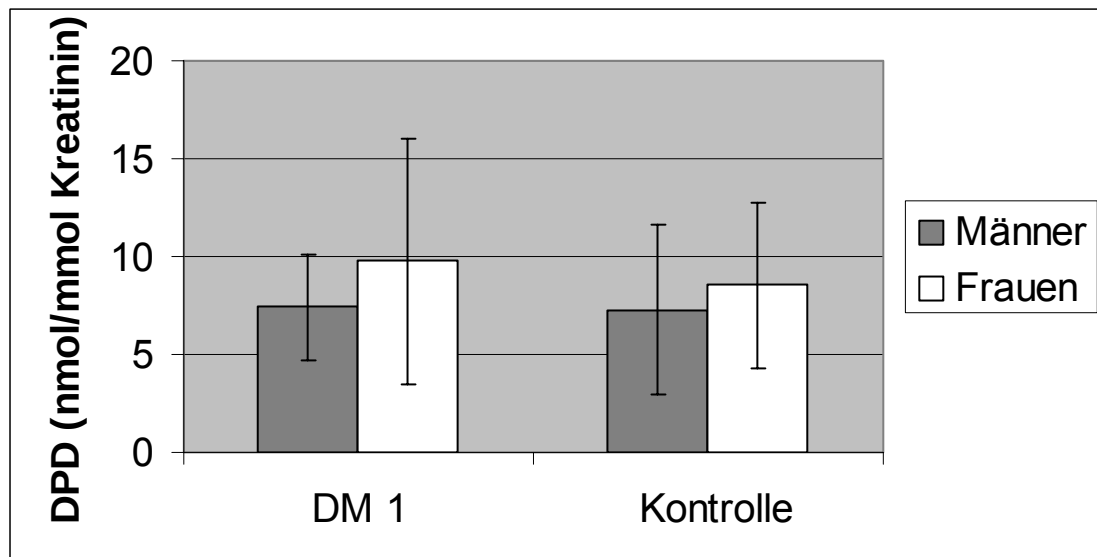


Abbildung 20: DPD-Crosslinks im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

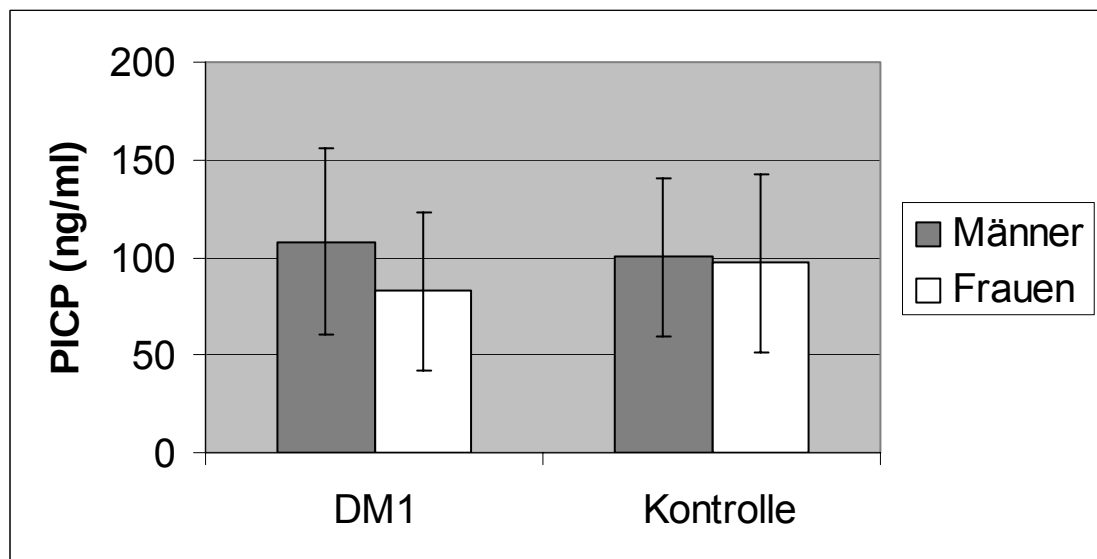


Abbildung 21: PICP im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

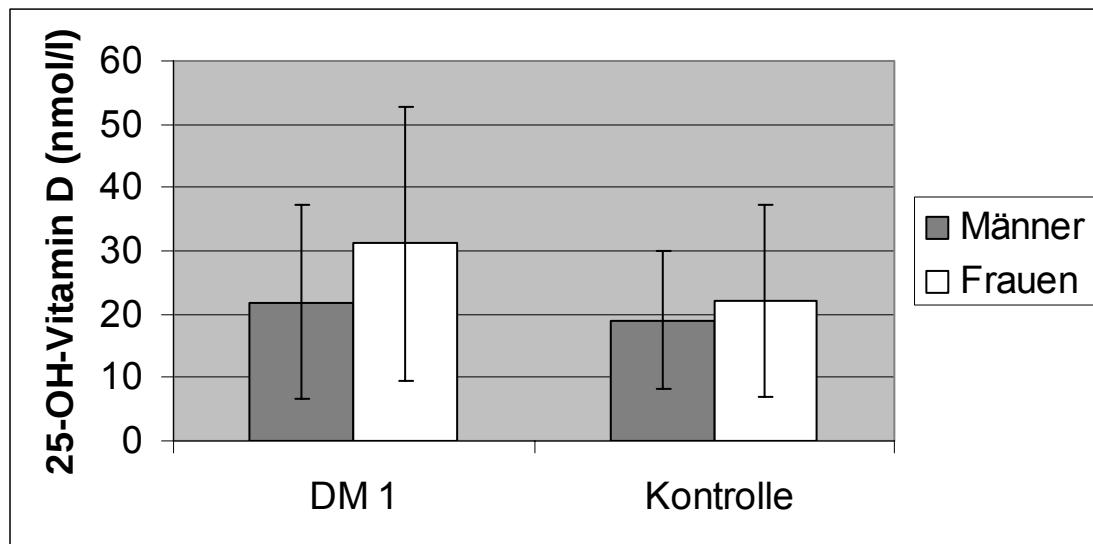


Abbildung 22: 25-OH-Vitamin D im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

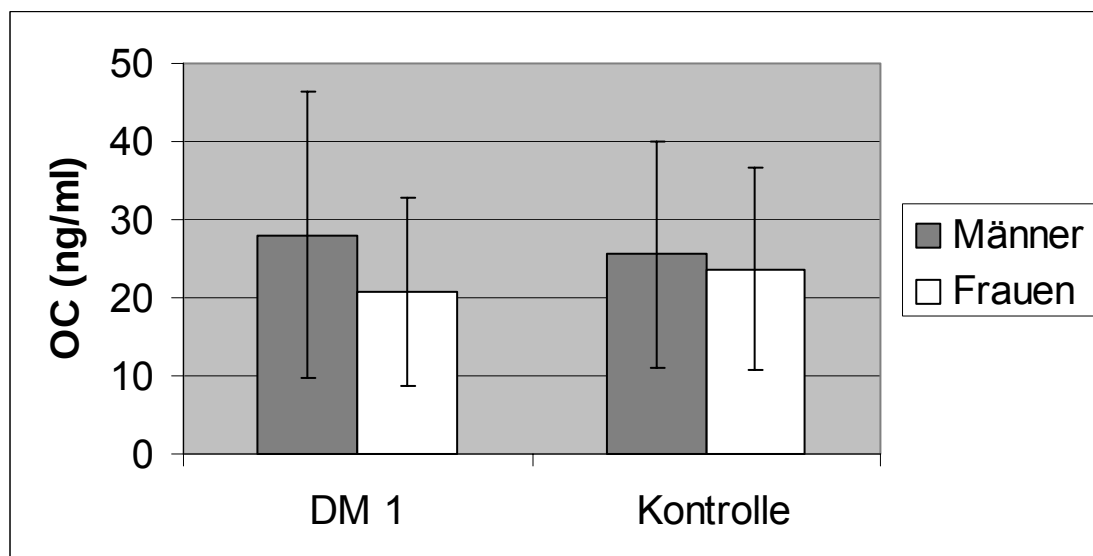


Abbildung 23: OC im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

Für das Parathormon konnten weder in der Gruppe mit Typ-1-Diabetikern noch in der Kontrollgruppe Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern bezüglich der Höhe der PTH-Spiegel nachgewiesen werden.

4.6 Knochenstoffwechsel bei Typ 1-Diabetikern und Kontrollkollektiv

Bei den Patienten, die an Typ 1-Diabetes mellitus litten, zeigte sich ein Trend zu etwas erhöhten Werten der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase im Serum im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Jedoch lagen auch die BAP-Werte der Typ-1-Diabetiker noch im Bereich der Norm. Der mittlere Wert für Patienten mit der Diagnose Typ 1-Diabetes mellitus betrug $26,30 \pm 15,61$ U/l und bei den Kontrollpersonen $21,71 \pm 6,02$ U/l.

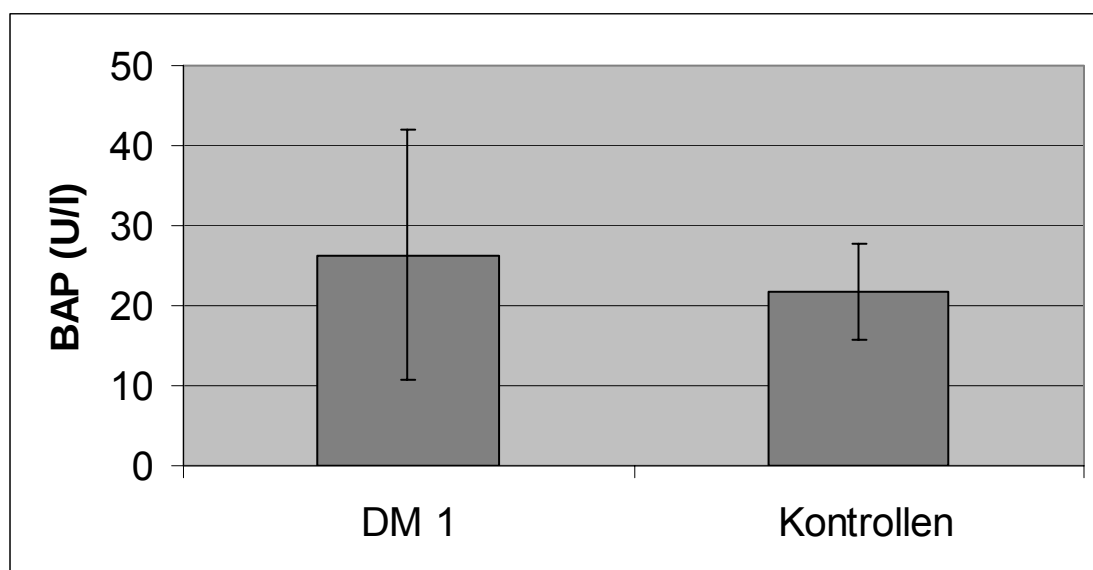


Abbildung 24: BAP bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen

Hinsichtlich der anderen Knochenstoffwechselfparameter konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Typ 1-Diabetes mellitus und Veränderungen im Knochenmetabolismus im Vergleich mit dem gesunden Kontrollkollektiv gesehen werden.

5.Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Probenaufbereitung

Die Materialien, aus denen DNA für die PCR gewonnen werden kann, sind vielfältig. Am häufigsten, wie auch für die vorliegende Arbeit, wird die DNA jedoch aus Blut extrahiert. Die Koagulation des Blutes wird verhindert, indem man das Blut in Röhrchen mit EDTA-Zusatz sammelt. Heparin ist bei der Probengewinnung für eine PCR als Mittel zur Antikoagulation wegen seiner Hemmung der DNA-Amplifizierung nicht geeignet. Auch Porphyrinverbindungen hemmen die PCR deutlich, daher müssen sie durch Lyse der Erythrozyten und anschließende Abzentrifugation der Leukozyten aus dem Probenansatz entfernt werden.

Bei der DNA-Extraktion werden verschiedene Substanzen zur Zellyse und Denaturierung verwandt. Diese Substanzen haben den Nachteil, dass sie konzentrationsabhängig die PCR inhibieren können. Nichtionische Detergentien (z.B. Triton X 100) hemmen die PCR bis zu einer Konzentration von 5% im Allgemeinen nicht. Ionische Detergentien (z.B. SDS) werden von der PCR nur in extrem niedriger Konzentration toleriert. SDS wird in einer Konzentration von 1-2% eingesetzt um seine gewünschten Wirkungen zu zeigen, inhibiert die PCR aber schon ab einer Konzentration von 0,01%. Deshalb müssen ionische Detergentien mittels Phenolextraktion und anschließender Ethanol-fällung wieder aus dem Probenansatz entfernt werden.

Wird DNA mittels Detergentien extrahiert, wird in der Regel Proteinase K verwendet. Dieses Enzym baut denaturierte Proteine ab. Da aber die Taq-DNA-Polymerase empfindlich gegen Proteinase K ist, muss vor der eigentlichen PCR Proteinase K entweder aus dem Probenansatz entfernt oder wenigstens inaktiviert werden. Die Inaktivierung ist durch Denaturierung der Proteinase K bei 95°C möglich. Eine anschließende Phenolextraktion zerstört die Proteinase K ebenfalls. Durch anschließende Zentrifugation trennt man die in der organischen Phenolphase verbleibende Proteinase K von der DNA in der

wässrigen Phase ab. Restliche Phenolspuren werden aus dem Probenansatz mittels Ethanolfällung eliminiert⁸⁵.

Die Bestimmung von knochenspezifischer alkalischen Phosphatase und PICP muss aus Serum erfolgen. EDTA-, Heparin- und Zitratplasma sind hierfür nicht geeignet, dies gilt auch für hämolytische Proben^{112,88}.

Intaktes PTH und Osteocalcin sollten idealerweise auch aus Serumproben bestimmt werden, wie auch bei der vorliegenden Arbeit ausgeführt. Es sind jedoch auch akzeptable Bestimmungen aus EDTA-Plasma möglich^{42,64,76}.

25-OH-Vitamin D kann sowohl aus Plasma als auch aus Serum bestimmt werden, eine Bestimmung aus Vollblut ist allerdings nicht möglich. Hämolyse stört das Ergebnis nicht. Übermäßig lipämisches Probenmaterial kann die Messergebnisse jedoch beeinflussen, daher müssen solche Proben von den Lipiden befreit werden, z.B. durch scharfes Abzentrifugieren (Quelle: Immun Diagnostik, Bensheim).

Die Probengewinnung für die Bestimmung der Knochenstoffwechselfparameter umfasste jeweils das Abzentrifugieren der zellulären Blutbestandteile und die Lagerung der Proben bei -20°C .

Die Urinproben zur Bestimmung der DPD-Crosslinks und des Kreatinins wurden ebenfalls abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

5.1.2 Auswahl der Messparameter

Da Osteocalcinproduktion und Kollagensynthese durch Calcitriol über den VDR reguliert werden, ist die Struktur des VDR-Gens möglicherweise an den genetischen Einflüssen auf die Knochendichte beteiligt. Auf dieser Hypothese basieren die zahlreichen Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und Knochendichte⁶⁷. Da auch im Rahmen eines Typ 1-Diabetes mellitus eine so genannte diabetische Osteopathie auftreten kann, die mit verminderter Knochendichte und verändertem Knochenstoffwechsel einhergeht^{80,17,69,56,49,65,36,89,90,86,10,8} wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und dem Knochenstoffwechsel bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus besteht.

Da es sich bei Typ 1-Diabetes mellitus um eine Erkrankung mit Autoimmunpathogenese und einer hereditären Komponente handelt³, ist unter

diesen Voraussetzungen sowohl die Betrachtung der VDR-Gen-Polymorphismen als auch des Vitamin-D-Spiegels relevant, weil Calcitriol an der Regulation von Differenzierung und Funktion der Osteoblasten beteiligt ist⁶² und eine immunsuppressive Wirkung aufweist^{62,75,21,72,77}.

Bei den Messparametern des Knochenstoffwechsels handelt es sich um Parameter des Knochenanbaus (BAP, OC, PICP) und des Knochenabbaus (PTH, DPD).

Die Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) ist ein Isoenzym der gesamten alkalischen Phosphatase^{51,107,114}.

Osteocalcin (OC) wird ausschließlich von Osteoblasten und Odontoblasten während des Knochenanbaus gebildet und primär in die Knochenmatrix eingebaut, jedoch gelangt auch ein Teil des gebildeten OC in das periphere Blut und kann dort quantitativ erfasst werden^{41,76,22,29}.

C-terminales Propeptid des Typ-1-Kollagens (PICP) wird von Osteoblasten bei der Bildung von Kollagen Typ 1 freigesetzt und steht im stöchiometrischen Verhältnis zur Menge des gebildeten Typ-1-Kollagens, das in die Knochenmatrix eingebaut wird^{88,99,79,23,29}.

Parathormon (PTH) spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Unterschreitet der Serumkalziumwert die engen Grenzen des optimalen Bereichs, wird durch PTH Kalzium aus dem Knochen mobilisiert, vermehrt im Dünndarm aufgenommen und vermindert renal ausgeschieden^{93,42,64}.

Deoxypyridinolin (DPD) entsteht auf enzymatischem Weg bei resorptiven Vorgängen am Knochen, gelangt in die Zirkulation und wird unverändert renal ausgeschieden. Die Ausscheidung von DPD wird durch Ernährungsgewohnheiten nicht beeinflusst^{23,113}.

Die Bestimmung verschiedener Parameter des Knochenstoffwechsels soll dabei helfen, auch minimale Veränderungen des Knochenmetabolismus bei Typ-1-Diabetikern zu erfassen. Ebenso soll mit Hilfe der Knochenstoffwechselparameter die klinische Relevanz der VDR-Gen-Polymorphismen herausgestellt werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 VDR-Polymorphismen

Da Osteocalcinproduktion und Kollagensynthese durch Calcitriol über den Vitamin-D-Rezeptor reguliert werden, ist die Struktur des VDR-Gens möglicherweise an den genetischen Einflüssen auf die Knochendichte und den Knochenmetabolismus beteiligt. Diese Hypothese ist die Basis zahlreicher Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und Knochendichte sowie Knochenstoffwechsel ⁶⁷.

Bekanntermaßen besitzt Vitamin D immunomodulatorische Eigenschaften ^{83,15,16,105,94,21}, darunter auch die Fähigkeit Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken ^{84,34,73,72}.

Kürzlich wurde über ein gehäuftes Vorkommen des b-Allels bei Patienten, die an multipler Sklerose erkrankt sind, berichtet ³⁵, und der Einfluss der verschiedenen VDR-Genotypen auf das Osteoporoserisiko ist in den letzten Jahren ausführlich diskutiert worden. Letztendlich werden die funktionellen Konsequenzen der VDR-Gen-Polymorphismen jedoch immer noch nicht ausreichend verstanden.

Obwohl die Apal- und Bsml-Polymorphismen nicht in codierenden Genregionen beheimatet sind, wird angenommen, dass eine höhere Transkriptionsrate und/oder höhere RNA-Stabilität beim BA-T-Haplotyp verglichen mit dem ba-T-Haplotyp vorliegt ⁸¹. Dies könnte auf eine Verbindung dieses Genotyps zu Variationen in der untranslatierten 3'-Region, die möglicherweise den RNA-Abbau beeinflusst, zurückzuführen sein ^{59,6}. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Unterschiede hinsichtlich der Transkriptionsregulation durch VDR-Allele bedingt sind und dass die mRNA-Stabilität nicht so sehr durch VDR-Allele bestimmt wird ^{108,27}.

In einigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp BB und erniedrigter Knochendichte bei Frauen verschiedener Altersgruppen und verschiedener ethnischer Herkunft gesehen ^{81,33,95,32}.

Zu dem Ergebnis, dass der bb-Genotyp bei prämenopausalen Frauen mit erniedrigter Knochendichte einhergeht, kamen Salamone et al. ⁹⁶.

In anderen Untersuchungen war hingegen keine Häufung bestimmter Bsml-Genotypen bei osteoporotischen Frauen bzw. keine Assoziation mit erniedrigter Knochendichte zu sehen^{74,95,58,39}.

Morrison et al.⁸² hingegen fanden höhere Osteocalcinwerte bei Probanden mit dem BB-Genotyp, während der bb-Genotyp mit niedrigen Osteocalcinwerten einherging.

Hitman et al.⁵⁴ untersuchten in London lebende Bangladeschi mit Risiko zur Entwicklung eines Typ 2-Diabetes mellitus. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Insulinsekretion und den Bsml-Genotypen gesehen werden.

In einer Studie mit in Großbritannien lebenden Indern, die an Typ 1-Diabetes mellitus erkrankt waren, und deren Eltern, konnten McDermott et al.⁷⁸ sehen, dass die Genotypen Bb und bb gehäuft bei den erkrankten Studienteilnehmern vorkamen.

Hauache et al.⁵² untersuchten brasilianische Typ 1-Diabetiker und ein gesundes Kontrollkollektiv hinsichtlich Knochendichte und Bsml-Polymorphismus. Die Verteilung der VDR-Genotypen bei Gesunden und Diabetikern zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Jedoch zeigte sich eine niedrigere Knochendichte bei der Diabetikergruppe als bei den gesunden Kontrollpersonen, sowie innerhalb der Diabetiker Gruppe eine Assoziation des BB-Genotyps mit niedrigerer Knochendichte.

Bei dem Vergleich taiwanesischer Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus mit einem gesunden Kontrollkollektiv zeigte sich, dass die Genotypen BB und Bb häufiger bei Typ 1-Diabetikern auftraten¹⁴.

Insgesamt zeigt sich also ein stark heterogenes Bild hinsichtlich der Ergebnisse von Untersuchungen, die sich mit dem Zusammenhang zwischen Bsml-Polymorphismus und Knochendichte sowie Knochenumsatz beschäftigen.

In unserer Studie mit kaukasischen Typ 1-Diabetikern und einem Kontrollkollektiv aus gesunden Personen wurde hinsichtlich der Verteilung der Bsml-Genotypen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen offenbar ($p = 0,054$). Es zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einem häufigeren Vorkommen des Bb-Genotyps und einer selteneren Prävalenz des BB-Genotyps bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus.

Die Tatsache, dass die Tendenz, die von dieser Studie hinsichtlich des BsmI-Polymorphismus aufgezeigt wird, dem Ergebnis der Studie von Chang et al.¹⁴ widerspricht, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Untersuchungen an zwei verschiedenen Populationen durchgeführt worden sind, nämlich einer taiwanesischen und einer kaukasischen Population. Es ist durchaus denkbar, dass der BsmI-Polymorphismus, wie andere genetische Merkmale auch, bei verschiedenen Rassen eine unterschiedliche Verteilung aufweist.

Mit dem Ergebnis der Studie von Hauache et al.⁵² steht unser Ergebnis zwar in Einklang, aber hierbei muss bedacht werden, dass die Bevölkerung Brasiliens sehr gemischten Ursprungs ist und möglicherweise deshalb kein Unterschied zwischen Typ 1-Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen in einem an sich heterogenen Kontrollkollektiv gefunden werden konnte.

Im Gegensatz zu Morrison et al.⁸² konnten wir auch keine Assoziation bestimmter BsmI-Genotypen mit Erhöhung oder Erniedrigung von Knochenstoffwechselfparametern (BAP, PICP, OC, 25-OH-Vitamin D, PTH, DPD) finden, was jedoch mit den Ergebnissen von Garnero et al.^{39,38} übereinstimmt.

In einer Studie mit postmenopausalen monozygoten und dizygoten Zwillingen sahen Spector et al.¹⁰² einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp tt des TaqI-Polymorphismus und niedriger Knochendichte.

Riggs et al.⁹⁵ untersuchten postmenopausale osteoporotische Frauen und junge Frauen hinsichtlich des TaqI-Polymorphismus. Hierbei konnte kein Unterschied der Knochendichte bei verschiedenen TaqI-Genotypen bei den postmenopausalen Patientinnen mit Osteoporose gesehen werden, aber bei den jungen Frauen war eine niedrige Knochendichte mit dem Genotyp tt und eine hohe Knochendichte mit dem Genotyp TT assoziiert.

Sowohl Hustmeyer et al.⁵⁸ in einer Studie mit nordamerikanischen monozygoten und dizygoten Zwillingen als auch Garnero et al.³⁹ in einer Studie mit gesunden prämenopausalen Frauen konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen erniedrigter oder erhöhter Knochendichte und bestimmten Genotypen des TaqI-Polymorphismus sehen.

Ebenso konnten Garner et al. weder für postmenopausale Frauen⁴⁰ noch für gesunde prämenopausale Frauen³⁹ einen Zusammenhang für TaqI-Polymorphismen und Parameter des Knochenstoffwechsels zeigen.

Hitman et al.⁵⁴ konnten hinsichtlich der Insulinsekretion bei Typ 2-Diabetikern, die in London leben aber aus Bangladesch stammen, und der TaqI-Polymorphismen keinen Zusammenhang erkennen.

Ebenso konnten McDermott et al.⁷⁸ in einer Studie mit an Typ 1-Diabetes mellitus erkrankten in London lebenden Indern und deren Eltern kein gehäuftes Vorkommen bestimmter Genotypen des TaqI-Polymorphismus zeigen.

In unserer Untersuchung mit kaukasischen Typ 1-Diabetikern und einem gesunden Kontrollkollektiv zeigte sich eine signifikant unterschiedliche ($p = 0,037$) Verteilung der TaqI-Polymorphismen in den beiden Gruppen. Der TT-Genotyp trat hierbei häufiger und der tt-Genotyp seltener bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus auf als bei den gesunden Kontrollpersonen. Der Widerspruch zu der Studie von McDermott et al.⁷⁸ ist möglicherweise durch die verschiedene Herkunft der Probanden zu erklären und damit, dass in dermaßen unterschiedlichen Populationen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Verteilung und Häufigkeit genetischer Merkmale vorliegen können.

Die Betrachtung der TaqI-Genotypen in Zusammenhang mit den Parametern des Knochenstoffwechsels ergab keine Assoziation bestimmter Genotypen mit Veränderungen des Knochenmetabolismus. Dies ist eine Beobachtung, die mit einigen bereits vorliegenden Studien an prä- und postmenopausalen französischen Frauen^{39,40} in Einklang zu bringen ist.

Insgesamt konnten wir bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen häufiger die Assoziation der Allele b und T sowie B und t beobachten ($p = 0,0001$), ohne hierbei jedoch einen Unterschied in der Verteilung zwischen den beiden Gruppen zu beobachten. Dies steht in Widerspruch zu dem Ergebnis von Pani et al.⁸⁷, das ein hohes Risiko zur Entwicklung eines Typ 1-Diabetes mellitus bei Probanden mit dem Haplotypen BAt beschreibt.

An prämenopausalen japanischen Frauen konnten Arai et al.² einen Zusammenhang zwischen dem FokI-Polymorphismus und der Knochendichte

sehen. Hierbei zeigte sich eine Assoziation des Genotyps ff mit geringerer Knochendichte.

Zu diesem Ergebnis kamen auch Gross et al.⁴⁵ bei einer Studie mit postmenopausalen Frauen aus einer mexikanisch-amerikanisch-kaukasischen Population.

Harris et al.⁵⁰ konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Genotypen ff und niedriger Knochendichte bei prämenopausalen weißen und schwarzen Amerikanerinnen sehen. Allerdings war bei Betrachtung der Gruppe als Gesamtheit eine deutliche Tendenz zur Assoziation des Genotyps ff mit niedriger Knochendichte zu erkennen.

Eccleshall et al.²⁸ konnten hingegen in der OFELY-Studie bei prämenopausalen französischen Frauen kein gehäuftes Auftreten niedriger Knochendichte bei Vorhandensein des Genotyps ff feststellen.

Zu dem gleichen Ergebnis kam auch eine Studie von Ferrari et al.³¹ an prämenopausalen italienischen Frauen sowie präpubertären Mädchen.

In zwei weiteren Studien^{7,71} konnte kein Zusammenhang zwischen bestimmten Fokl-Genotypen und dem Knochenmetabolismus oder dem Auftreten osteoporotischer Frakturen gesehen werden.

Obwohl eine Assoziation zwischen Knochendichte und Fokl-Genotypen postuliert worden ist^{45,2}, haben sich bei funktionellen Untersuchungen der Fokl-Varianten widersprüchliche Ergebnisse gezeigt^{46,2,63,115}.

In unserer Untersuchung konnten wir keinen Unterschied in der Verteilung der einzelnen Fokl-Genotypen bei Typ 1-Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen nachweisen ($p = 0,279$). Auch zeigte keiner der drei Fokl-Genotypen einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen. Dieses Ergebnis ist durchaus in Einklang mit den bis dahin ohnehin widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Fokl-Polymorphismus zu sehen.

5.2.2 Parameter des Knochenstoffwechsels

In unserer Untersuchung zeigte sich eine gute Korrelation der Parameter des Knochenstoffwechsels untereinander, wobei ein hochsignifikantes Ergebnis für PICP und knochenspezifische alkalische Phosphatase sowie für Osteocalcin

und knochenspezifische alkalische Phosphatase gezeigt werden konnte. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen^{88,99,79,23,29} und erklärt sich darüber, dass es sich bei diesen Parametern um Marker des Knochenanbaus handelt, wobei sowohl PICP als auch Osteocalcin Marker der Kollagensynthese bzw. Osteoblastenaktivität darstellen.

Eine signifikante Altersabhängigkeit zeigte sich lediglich für die knochenspezifische alkalische Phosphatase. Hierbei hatten jüngere Probanden signifikant höhere Werte als ältere, Unterschiede zwischen Typ 1-Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen zeigten sich nicht. Hata et al.⁵¹ sahen diesen altersabhängigen Effekt lediglich bei männlichen gesunden Probanden (Alter 24-42 Jahre) mit einem Peak im Alter von 20-30 Jahren und dem dann kontinuierlichen Abfall der BAP-Werte. Bei gesunden Frauen (Alter 23-40 Jahre) wurde in dieser Studie hingegen ein signifikanter Anstieg der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase gesehen.

Hinsichtlich der Parameter des Knochenstoffwechsels konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen in unserer Untersuchung gesehen werden. Lediglich für die knochenspezifische alkalische Phosphatase zeigte sich ein Trend zu etwas höheren Werten bei Typ 1-Diabetikern, es konnte jedoch kein Signifikanzniveau erreicht werden und die Werte für BAP lagen auch im angegebenen Referenzbereich. Kayath et al.⁶⁵ fanden in ihrer Untersuchung die knochenspezifische alkalische Phosphatase bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus sogar signifikant erhöht. Allerdings konnten Bouillon et al.¹⁰ keinen Unterschied zwischen Typ 1-Diabetikern und Gesunden hinsichtlich der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase sehen.

Erniedrigte Osteocalcinwerte bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus sind von mehreren Autoren beschrieben^{89,86,10}. Pietschmann et al.⁹⁰ konnten erniedrigte Osteocalcinwerte nur bei Typ 1-Diabetikern beobachten, bei denen als Komplikation der Erkrankung bereits eine Mikroangiopathie aufgetreten war. Bei Patienten ohne diese Komplikation zeigten sich keine erniedrigten OC-Werte. Diese Beobachtung rückt das Auftreten einer diabetischen Osteopathie in Zusammenhang mit der diabetischen Mikroangiopathie bei diabetischen Patienten mit Insulinmangel¹². Im Gegensatz hierzu könnten erhöhte

Kortikoidspiegel bei nicht-insulinabhängigen Diabetikern zu Störungen des Knochenstoffwechsels führen, wie kürzlich an einem Tiermodell gezeigt wurde¹⁰³. Guarneri et al.⁴⁷ fanden bei Erstmanifestation eines Typ 1-Diabetes mellitus bei Kindern und Jugendlichen erniedrigte Osteocalcinwerte, die sich jedoch nach 15-tägiger Insulintherapie normalisiert hatten. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der metabolischen Kontrolle von Typ 1-Diabetikern und deren Knochenstoffwechsel besteht. Dass wir in unserer Untersuchung keinen Unterschied hinsichtlich des Osteocalcinwertes zwischen den beiden Gruppen sehen konnten, könnte also damit zusammenhängen, dass es sich um Patienten handelt, die alle bereits seit längerer Zeit suffizient mit Insulin therapiert wurden. Es wurde kein Patient mit einer Erstmanifestation eines Typ 1-Diabetes mellitus in die Untersuchung eingeschlossen. Unsere Ergebnisse stehen auch in Einklang mit den Ergebnissen von Kemink et al.⁶⁸. In dieser Untersuchung konnten ebenfalls keine Unterschiede bezüglich BAP und OC zwischen Diabetikern und Kontrollen gezeigt werden. Eine andere Untersuchung zeigt erniedrigte Serumspiegel von OC und 25-OH Vitamin D₃ bei nicht-insulinabhängigen Diabetikern und erhöhte Werte für diese beiden Parameter bei diabetischen Patienten mit proliferativer Retinopathie oder mit Mikro- und Makroalbuminurie⁶⁰. Außerdem war der ganz überwiegende Teil der Patienten gut metabolisch kontrolliert, was sich am HbA_{1c}-Wert ablesen lässt, und schwerwiegende Komplikationen waren bei keinem in unsere Untersuchung eingeschlossenen Patienten aufgetreten. Ferner ist es möglich, dass bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus eine Low-turnover-Osteoporose auftritt¹⁰ und somit normale oder allenfalls leicht erniedrigte Osteocalcinwerte zu erwarten sind⁹⁸. OC-Werte im Normbereich müssen also in diesem Fall nicht gegen einen herabgesetzten Knochenstoffwechsel sprechen.

Keine Unterschiede zwischen Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen fanden die meisten Autoren bei Betrachtung der Parathormonwerte^{65,90,4}. Lediglich Pedrazzoni et al.⁸⁹ fanden bei Typ 1-Diabetikern erniedrigte PTH-Werte. Das Ergebnis unserer Untersuchung steht also im Einklang mit der Tendenz, die sich in den meisten Studien dieser Art gezeigt hat.

Wir konnten bei unserer Untersuchung keine veränderten PICP-Werte bei Typ-1-Diabetiker verglichen mit gesunden Kontrollpersonen feststellen. Zu diesem

Ergebnis kamen auch Bouillon et al.¹⁰ in ihrer Studie. Bonfanti et al.⁸ fanden 3 und 12 Monate nach Erstmanifestation eines Typ 1-Diabetes mellitus einen signifikanten Anstieg des PICP verglichen mit dem Ausgangswert bei Erstmanifestation. Diese Beobachtung legt wiederum nahe, dass die metabolische Kontrolle eines Typ 1-Diabetes mellitus, also die adäquate Insulintherapie, die Lage des Knochenstoffwechsels bei den Patienten innerhalb kurzer Zeit verbessert. Da die von uns in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten alle bereits seit längerer Zeit therapiert wurden, konnten an diesem Kollektiv folglich auch keine Auswirkungen eines eingeschränkten Knochenstoffwechsels beobachtet werden.

Imura et al.⁶¹ fanden bei Typ 1-Diabetikern signifikant erniedrigte Werte für 1,25-Dihydroxyvitamin D im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv, während der Wert für 25-OH-Vitamin D in beiden Gruppen in dieser Untersuchung ähnlich war und keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen zu sehen waren. Dies entspricht auch unseren Ergebnissen hinsichtlich der 25-OH-Vitamin-D-Werte bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.

Das HbA_{1c} als Maß für die Güte der metabolischen Kontrolle bei Diabetikern zeigte in unserer Studie keinen Zusammenhang zwischen seiner Höhe und den Parametern des Knochenstoffwechsels. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei den von uns untersuchten Patienten die HbA_{1c}-Werte nur über einen engen Bereich schwankten ($7,6 \pm 1,6$ %) und deshalb keine Unterschiede zwischen dem Knochenmetabolismus von Patienten mit guter und verbesserungsfähiger Einstellung des Typ 1-Diabetes mellitus zu sehen waren. Sowohl Bonfanti et al.⁸ als auch Guarneri et al.⁴⁷ hatten eine Verbesserung der Knochenstoffwechselsituation bei Typ 1-Diabetikern nach einigen Monaten Insulintherapie beschrieben. In dieser Untersuchung waren Parameter des Knochenstoffwechsels bei Erstmanifestation des Typ 1-Diabetes mellitus und im Abstand von einigen Monaten unter Insulintherapie der Erkrankung bestimmt worden. In unsere Untersuchung wurden jedoch nur Typ 1-Diabetiker eingeschlossen, bei denen die Erkrankung schon seit mindestens einigen Monaten diagnostiziert und therapiert war. Der Knochenstoffwechsel bei Erstmanifestation und im Verlauf wurde nicht erfasst.

Bei Betrachtung der beiden von uns untersuchten Gruppen als Gesamtheit zeigt sich, dass bei den männlichen Studienteilnehmern die Knochenstoffwechselfparameter knochenspezifische alkalische Phosphatase, Osteocalcin und PICP im Vergleich zu den untersuchten Frauen signifikant höhere Werte erreichten, dies ist auch bei anderen Untersuchungen beschrieben^{53,20}. Jedoch waren die Werte der männlichen Probanden für diese Parameter noch im Normbereich. Dies spricht für einen höheren Knochenumsatz bei Männern der untersuchten Altersgruppe.

Auch bei getrennter Betrachtung der beiden untersuchten Gruppen zeigten sich Unterschiede im Knochenstoffwechsel von Männern und Frauen. In der Gruppe von Patienten, die an Diabetes Typ 1-Diabetes mellitus erkrankt sind, zeigten sich bei den Männern signifikant höhere Werte für die Knochenstoffwechselfparameter PICP, BAP und Osteocalcin als bei den weiblichen Patienten. Bei den gesunden Männern war im Vergleich zu den gesunden Frauen nur die knochenspezifische alkalische Phosphatase höher.

Bei den weiblichen Typ-1-Diabetikern hingegen waren die Werte für DPD-Crosslinks und 25-OH-Vitamin D verglichen mit den Werten der männlichen Patienten signifikant höher. Die gesunden weiblichen Kontrollpersonen wiesen lediglich signifikant höhere Werte für DPD-Crosslinks auf. Der Grund für die höheren 25-OH-Vitamin-D-Werte bei weiblichen Typ-1-Diabetikern könnte eventuell bei den Ernährungsgewohnheiten und dem Lebensstil der untersuchten Personen zu suchen sein. Die Sammelperiode für das Probenmaterial erstreckte sich von August bis April, also zum größten Teil über Herbst und Winter. Einige der weiblichen Probanden besuchten in dieser Zeit regelmäßig Solarien und könnten deswegen höhere Werte für 25-OH-Vitamin D haben.

Da sowohl bei gesunden Kontrollpersonen als auch bei Typ 1-Diabetikern in verstärktem Maße bei den Männern signifikant erhöhte Werte für Knochenanbauparameter und bei den Frauen signifikant erhöhte Werte für Knochenabbauparameter zu finden waren, ist es denkbar, dass die Diskrepanz der beiden Geschlechter bezüglich des Knochenstoffwechsels durch das Auftreten eines Typ 1-Diabetes mellitus noch verstärkt wird. Dies scheint auch unter angemessener Therapie noch Einfluss zu haben. Wie bereits erwähnt,

sind die Ergebnisse, die einige Autoren in ihren Untersuchungen sahen, eventuell auch deswegen an unserem Kollektiv nicht nachzuvollziehen, weil alle Typ 1-Diabetiker bereits seit längerer Zeit behandelt wurden und der Knochenstoffwechsel zum Zeitpunkt der Erstmanifestation nicht erfasst wurde. Es ist auch denkbar, dass die männlichen Typ 1-Diabetiker den von einigen Autoren ^{8,47} beschriebenen beeinträchtigten Knochenstoffwechsel bei Erstmanifestation z.T. überkompensieren und deswegen erhöhte Werte für die Knochenanbauparameter zeigen. Bonfanti et al. ⁸ fand diesen Effekt bei einer Studie mit Kindern für den Parameter PICP.

Diese Ergebnisse passen in das widersprüchliche Bild, das in der Literatur zu diesem Thema gezeichnet wird ^{65,89,90,4,86,10,80}. Allerdings wurden bei den genannten Studie die untersuchten Gruppen als Gesamtheit betrachtet und nicht nach männlichen und weiblichen Probanden unterschieden.

Möglicherweise war die Anzahl der untersuchten Probanden zu klein, um weitere Unterschiede bezüglich der Verteilung von VDR-Gen-Polymorphismen in den beiden untersuchten Gruppen zu zeigen. Widersprüche und Übereinstimmungen mit anderen Untersuchungen sind zum Teil dadurch zu erklären, dass jeweils verschiedene Populationen untersucht wurden. Höhere Werte für BAP, PICP und OC bei diabetischen Männern und DPD-Crosslinks sowie 25-OH-Vitamin D bei diabetischen Frauen deuten in Richtung eines veränderten Knochenstoffwechsels bei Typ 1-Diabetikern, am ehesten im Sinne einer low-turnover-Osteoporose. Zumal der Unterschied der Geschlechter im Knochenstoffwechsel bei den gesunden Kontrollpersonen nicht so stark ausgeprägt war.

6.Zusammenfassung

Es existieren Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der diabetischen Osteopathie bei Typ 1- und Typ 2-Diabetes mellitus und Vitamin-D-Rezeptor-Polymorphismen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, an einem Kollektiv von kaukasischen Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und einem gesunden Kontrollkollektiv Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens bestimmter VDR-Genotypen zu zeigen. Dies wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) durchgeführt. Ferner wurde bei beiden untersuchten Gruppen ein Status des Knochenstoffwechsels erhoben. Hierzu wurden Osteocalcin, knochenspezifische alkalische Phosphatase, Parathormon, C-terminales Propeptid des Typ-1-Kollagens, Deoxypyridinium-Crosslinks und 25-OH-Vitamin D untersucht.

Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen des TT-Genotyps sowie ein signifikant selteneres Auftreten des tt-Genotyps bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus verglichen mit den gesunden Kontrollpersonen. Für die übrigen untersuchten VDR-Gen-Polymorphismen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung in den beiden untersuchten Gruppen. Die Knochenstoffwechsellparameter lagen bei allen untersuchten Personen im Normbereich. Beim Vergleich der Gruppen untereinander ohne Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Probanden konnten keine Unterschiede im Knochenstoffwechsel von Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und Kontrollpersonen gesehen werden. Die Werte für BAP, PICP und OC waren bei den Männern signifikant höher als bei den Frauen, wenn alle untersuchten Personen insgesamt betrachtet wurden. Insgesamt betrachtet hatten jüngere Probanden signifikant höhere BAP-Werte als ältere. Bei isolierter Betrachtung der diabetischen Patienten zeigten sich bei den Männern signifikant höhere Werte für BAP, PICP und OC, sowie signifikant höhere Werte für 25-OH-Vitamin-D und DPD-Crosslinks bei den Frauen. Bei den gesunden Kontrollpersonen zeigten signifikant höhere Werte bei den Männern lediglich für BAP, bei den gesunden Frauen waren signifikant höhere Werte nur bei den DPD-Crosslinks zu sehen. Eine Korrelation des HbA_{1c} mit

Parametern des Knochenstoffwechsels konnte nicht festgestellt werden. Auch konnte keine Assoziation bestimmter VDR-Gen-Polymorphismen mit Veränderungen des Knochenstoffwechsels gefunden werden.

Widersprüche und Übereinstimmungen mit anderen Untersuchungen sind zum Teil dadurch zu erklären, dass jeweils verschiedene Populationen untersucht wurden. Höhere Werte für BAP, PICP und OC bei diabetischen Männern und DPD-Crosslinks sowie 25-OH-Vitamin D bei diabetischen Frauen deuten in Richtung eines veränderten Knochenstoffwechsels bei Typ 1-Diabetikern, am ehesten im Sinne einer low-turnover-Osteoporose.

7.Literaturverzeichnis

1. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998; 15:539-53
2. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: Effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. J Bone Miner Res 1997; 12:915-21
3. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1994 ; 331:1428-36
4. Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R et al. Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus. Diabetes 1988; 37:8-12
5. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:3294-8
6. Beelman CA, Parker R. Degradation of mRNA in Eukaryotes. Cell 1995; 81:179-83
7. Bell GI, Horita S, Karam J. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 1984; 33:176-83
8. Bonfanti R, Mora S, Prinster C et al. Bone modeling indexes at onset and during the first year of follow up in insulin-dependent diabetic children. Calcif Tissue Int 1997 ; 60:397-400
9. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K et al. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in East London Asians. Diabetologia 1995; 38:1239-45
10. Bouillon R, Bex M, van Herck E et al. Influence of age, sex and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:1194-1202
11. Bouillon R, Carmaliet G, Daci E et al. Vitamin D metabolism and action. Osteoporos Int 1998; Suppl. 8:S13-S19
12. Burkhardt R, Moser W, Bartl R et al. Is osteoporosis due to microangiopathy ? Lancet 19981 ; 1 :844

13. Carling T, Ridefelt P, Hellmann P et al. Vitamin d receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1772-5
14. Chang TJ, Lei HH, Yeh JI et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clinical Endocrinology* 2000; 52:575-80
15. Chofflon M, Gonzalez V, Weiner HL et al. Inflammatory cerebrospinal fluid T cells have activation requirements characteristic of CD4+CD45RA- T-cells. *Eur J Immunol* 1989; 19:1791-5
16. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol* 1998; 28:3017-30
17. Compston JE, Smith EM, Matthews C, Schofield P. Whole body composition and regional bone mass in women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 1994; 41:289-93
18. Cordell HJ, Todd JA. Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet* 1995; 11:499-503
19. Crilly RG, Jones MM, Horsman A et al. Rise in plasma alkaline phosphatase at the menopause. *Clin Sci* 1980; 53:341-2
20. Dahl E, Nordal KO, Halse J., Attramadal A. Histomorphometric analysis of normal bone from the iliac crest of Norwegian subjects. *Bone and Mineral* 1988; 3:369-377
21. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *J Clin Invest* 1998; 101:252-62
22. Deftos LJ. Bone protein and peptide assays in diagnosis and management of skeletal diseases. *Clin Chem* 1991; 37:1143-8
23. Delmas PD. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. *Bone* 1992; 13:S17-S21
24. Delmas PD, Malaval L, Arlot ME et al. Serum bone gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985; 6:329-41
25. Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E et al. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1991; 6:639-44
26. Dequeker J, Nijs J, Verstraeten A et al. Genetic determinants of bone mineral content at the spine and the radius: A twin study. *Bone* 1987; 8:207-9
27. Durrin LK, Haile RW, Ingles SA et al. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphism: lack of effect on RNA stability. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1453:311-20

28. Eccleshall TR, Garnero P, Gross C et al. Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: The OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998; 13:31-5
29. Epstein S. Bone derived proteins. *Trends Endocrinol Metab* 1988; 1:9-1
30. Fassbender WJ, Steinhauer B, Stracke H, Schumm-Draeger P-M, Usadel K-H. Validation of a new automated immunoassay for measurement of intact osteocalcin. *Clin Lab* 2002; in press
31. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D et al. Vitamin D receptor gene start codon Polymorphisms (FokI) and bone mineral density: Interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J Bone Miner Res* 1998; 13:925-30
32. Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO et al. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms? *J Bone Miner Res* 1998; 13:363-70
33. Fleet JC, Harris SS, Wood RJ et al. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (BB) predicts low bone density in premenopausal black and white women. *J Bone Miner Res* 1995; 10:985-90
34. Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. *In vivo* beneficial effects of cyclosporine A and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 54:53-63
35. Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 1999; 166:47-52
36. Gallacher SJ, Fenner JAK, Fisher BM et al. An evaluation of bone density and turnover in premenopausal women with type 1 diabetes mellitus. *Diabetic Med* 1993; 10:129-33
37. Gamble DR. The epidemiology of insulin dependent diabetes, with particular reference to the relationship of virus infection to its aetiology. *Epidemiol Rev* 1980; 2:49-70
38. Garnero P, Arden NK, Griffiths G et al. Genetic influence on bone turnover on postmenopausal twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:140-6
39. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1283-8
40. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss and bone

mass in postmenopausal women: The OFELY study J Bone Miner Res 1996; 11:827-34

41. Garnero P, Grimaux M, Seguin P et al. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin in vivo and in vitro. J Bone Miner Res 1994; 9:255-64

42. Goltzman D, Henderson B, Loveridge N. Cytochemical Bioassay of parathyroid hormone: Characteristics of the assay and analysis of circulating hormonal forms. J Clin Invest 1980 ; 65:1309-17

43. Gomez B, Ardakani S, Ju J. et al. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. Clin Chem 1995; 41:1560-5

44. Green A, Gale EAM, Patterson, CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE study. Lancet 1992; 339:905-9

45. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. J Bone Miner Res 1996; 11:1850-5

46. Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ et al. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. J Bone Miner Res 1998; 13:1691-9

47. Guarneri MP, Weber G, Gallia P, Chiumello G. Effect of insulin treatment on osteocalcin levels in diabetic children and adolescents. J Endocrinol Invest 1993; 16:505-9

48. Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioimmunoassay for 25-hydroxycholecalciferol. J Clin Endocrinol Metab 1971; 33:992-5

49. Hampson G, Evans C, Petitt RJ et al. Bone mineral density, collagen type 1 α 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. Diabetologia 1998; 41:1314-20

50. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C et al. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. J Bone Miner Res 1997; 12:1043-8

51. Hata K, Tokuhiko H, Nakatsuka K et al. Measurement of bone-specific alkaline phosphatase by an immunoselective enzyme assay method. Ann Clin Biochem 1996; 33:127-31

52. Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S et al. Vitamin D receptor gene polymorphism: Correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin-dependent diabetes mellitus. Osteoporos Int 1998; 8:204-10

53. Henry YM, Eastell R. Ethnic and gender differences in bone mineral density and bone turnover in young adults: effects of size. *Osteoporosis Int* 2000; 11:512-7
54. Hitman GA, Mannan A, McDermott MF et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 1998; 47:688-90
55. Hitman GA, Tarn AC, Winter RM et al. Type 1 (insulin dependent) diabetes and a highly variable locus close to the insulin gene on chromosome 11. *Diabetologia* 1985; 28:218-22
56. Hui XL, Epstein S, Johnston Jr CC. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:74-80
57. Hustmyer FG, DeLuca HF, Peacock M. Apal, BsmI, EcoRV and TaqI polymorphisms at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians. *Human Molecular Genetics* 1993; 2:487
58. Hustmeyer FG, Peacock M, Hui S et al. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994; 94:2130-4
59. Ingles SA, Haile RW, Henderson BE et al. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:93-8
60. Inukai T, Fujiwara Y, Tayama K, Aso Y, Takemura Y. Alterations in serum levels of 1 alpha, 25(OH)₂ D₃ and osteocalcin in patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 38:53-59
61. Imura H, Seino Y, Ishida H. Osteopenia and circulating levels of vitamin D metabolites in diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol* 1985; 31(Suppl):S27-32
62. Issa LL, Leong GM, Eismann JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res* 1998; 47:451-75
63. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *MOL Endocrinol* 2000; 14:401-420
64. Kao CP, Jiang N-S, Klee GG et al. Development and validation of a new radioimmunoassay for parathyrin (PTH). *Clin Chem* 1982; 28:69-74
65. Kayath MJ, Dib SA, Vieira JGH. Prevalence and magnitude of osteopenia associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1994; 8; 2:97-104

66. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT et al. Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:808-13
67. Kelly PJ, Morrison NA, Sambrook PN et al. Genetic influences on bone turnover, bone density and fracture. *Eur J Endocrinol* 1995; 133:265-71
68. Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Luttermann JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 2000; 23:295-303
69. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995; 44:775-82
70. Lampeter EF, Signore A, Gale EA, Pozzilli P. Lessons NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1989; 32:703-8
71. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest* 2000; 87:1103-7
72. Lemire J, Archer DC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991; 87:1103-7
73. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992; 12:143-8
74. Looney JE, Yoon HK, Fischer M et al. Lack of high prevalence of the BB vitamin D receptor genotype in severely osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2158-62
75. Manolagas SC, Provvedini DM, Murray EJ et al. The antiproliferative effect of calcitriol on human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:394-400
76. Masters PW, Jones RG, Purves DA et al. Commercial assays for serum and osteocalcin give clinically discordant results. *Clin Chem* 1994; 40:358-63
77. Mathieu C, Laureys J, Sobis H et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prevents Insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 1992 ; 41:1491-5
78. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 1997; 40:971-5
79. Melkko J, Niemi S, Ristell L et al. Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I Procollagen. *Clin Chem* 1990; 36:1328-32

80. Miazgowski T, Czekalski S. A 2-year follow-up study on bone mineral density and markers of bone turnover in patients with long-standing insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 1998; 8:399-403
81. Morrison NA, Qi JC, Tokita A et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367:284-7
82. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ et al. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6665-9
83. Müller K, Brendtzen K. Inhibition of Human T Lymphocyte Proliferation and Cytokine Production by 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. Differential effects on CD45RA⁺ and CD45RO⁺ cells. *Autoimmunity* 1992; 14:37-43
84. Nashold FE, Miller DJ, Hayes CE. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment decreases macrophage accumulation in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000; 103:171-9
85. Newton CR, Graham A. Labor im Fokus – PCR 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag; Oxford, Berlin, Heidelberg 1994.
86. Olmos JM, Perez-Castrillon JL, Garcia MT et al. Bone densitometry and biochemical bone remodeling markers in type 1 diabetes mellitus. *Bone and Mineral* 1994; 26:1-8
87. Pani MA, Knapp M, Donner H et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to Type 1 Diabetes in Germans. *Diabetes* 2000; 49:504-7
88. Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR et al. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 1987; 2:427-36
89. Pedrazzoni M, Ciotti G, Pioli G et al. Osteocalcin levels in diabetic subjects. *Calcif Tissue Int* 1989; 45:331-6
90. Pietschmann P, Schernthaner G, Woloszczuk W. Serum osteocalcin levels in diabetes mellitus: analysis of the type of diabetes and microvascular complications. *Diabetologia* 1988; 31:892-5
91. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL et al. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest* 1987; 80:706-10
92. Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase. Detection and quantitation. *Ann Clin Biochem* 1993; 30:355-72
93. Raisz LG, Yajnik CH, Bockmann RS et al. Comparison of commercially available parathyroid hormone immunoassays in the differential diagnosis of

hypercalcemia due to primary hyperthyroidism or malignancy. *Ann Intern Med* 1979; 91:739-40

94. Reichel H, Koepffler HP, Tobler A, Norman AW. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 inhibits γ -interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3385-9

95. Riggs BL, Nguyen TV, Melton III LJ et al. The Contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1995; 10:991-6

96. Salamone LM, Glynn NW, Black DM et al. Determinants of premenopausal bone mineral density: The interplay of genetic and lifestyle factors. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1557-65

97. Seibel MJ, Cosman V, Shen V et al. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks of collagen markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993; 8:881-9

98. Seibel MJ, Stracke H. *Metabolische Osteopathien*, Schattauer Verlag; Stuttgart/New York 1997

99. Simon LS, Krane SM, Wortman PD et al. Serum levels of type I and type III procollagen fragments in Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 58:110-20

100. Skjodt H, Gallagher JA, Beresford JN et al. Vitamin D metabolites regulate osteocalcin synthesis and proliferation of human bone cells in vitro. *J Endocr* 1985; 105:391-6

101. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ et al. Genetic determinants of bone mass in adult women: A re-evaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991; 6:561-7

102. Spector TD, Keen RW, Arden NK et al. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women: A twin study in Britain. *Br Med J* 1995; 310:1357-60

103. Takeshita N, Yoshino T, Mutoh S. Possible involvement of corticosterone in bone loss of genetically diabetic db/db mice. *Horm Metab Res* 2000; 32:147-51

104. Taymans SE, Pack S, Pack E et al. The human Vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J Bone Miner Res* 1999 ; 14:1163-66

105. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 : A Novel Immunomodulatory Hormone. *Science* 1984; 224:1438-40

106. Vanham G, Ceuppens JL, Bouillon R. T-Lymphocytes and their CD4 subset are direct targets for the inhibitory effect of calcitriol. *Cellular Immunology* 1989; 124:320-33
107. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994 ; 31:197-293
108. Verbeek W, Gombart AF, Shiohara M et al. Vitamin D receptor : no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the TaqI restriction enzyme polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 238:77-80
109. Verhaeghe J, van Herck E, Visser WJ et al. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes: Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes* 1990; 39:477-82
110. Verhaeghe J, Suiker AMH, Nyomba BL et al. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats: Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology* 1989; 124:573-82
111. Verhaeghe J, Suiker AMH, Visser WJ et al. The effects of systemic insulin, insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone growth and turnover in spontaneously diabetic BB rats. *J Endocrinol* 1992; 134:485-92
112. Winterbottom N, Vernon S, Cerelli MJ et al. An immunoassay for the C-terminal propeptide of type I collagen. *J Bone Miner Res* 1992 (suppl.1), 254
113. Withold W, Georgescu G, Khakzad H et al. Efficacy of simultaneous determination of bone alkaline phosphatase mass concentration in serum and urinary excretion of pyridinium cross-links for detection of bone metastases. *Clin Biochem* 1995; 28:511-7
114. Withold W, Schulte U, Reinauer H. Method for determination of bone alkaline phosphatase activity: Analytical performance and clinical usefulness in patients with metabolic and malignant bone diseases. *Clin Chem* 1996; 42:210-7
115. Yamagata M, Nakajima S, Tokita A et al. Analysis of the stable levels of messenger RNA derived from different polymorphic alleles in the vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Metab* 1999; 17:164-70

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der TaqI-Genotypen bei gesunden Kontrollpersonen .	35
Abbildung 2: Verteilung der TaqI-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus	35
Abbildung 3: Verteilung der BsmI-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus	36
Abbildung 4: Verteilung der BsmI-Genotypen bei gesunden Kontrollpersonen	36
Abbildung 5: Verteilung der FokI-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus	37
Abbildung 6: Verteilung der FokI-Genotypen bei gesunden Kontrollpersonen .	37
Abbildung 7: Korrelation von BAP und Lebensalter der untersuchten Personen	39
Abbildung 8: Korrelation von BAP und PICP im Gesamtkollektiv	39
Abbildung 9: Korrelation von BAP und OC im Gesamtkollektiv	40
Abbildung 10: BAP bei FokI-, BsmI-, und TaqI-Polymorphismen	41
Abbildung 11: PICP bei FokI-, BsmI-, und TaqI-Polymorphismen	41
Abbildung 12: OC bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen	42
Abbildung 13: 25-OH-Vitamin D bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen ..	42
Abbildung 14: PTH bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen	43
Abbildung 15: DPD-Crosslinks bei FokI-, BsmI- und TaqI-Polymorphismen	43
Abbildung 16: BAP im Geschlechtervergleich des Gesamtkollektivs, signifikant höhere Werte bei den untersuchten Männern	44
Abbildung 17: PICP im Geschlechtervergleich des Gesamtkollektivs, signifikant höhere Werte bei den untersuchten Männern	45
Abbildung 18: OC im Geschlechtervergleich des Gesamtkollektivs, signifikant höhere Werte bei den untersuchten Männern	45
Abbildung 19: BAP im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.....	46
Abbildung 20: DPD-Crosslinks im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen	47
Abbildung 21: PICP im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.....	47

Abbildung 22: 25-OH-Vitamin D im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen	48
Abbildung 23: OC im Geschlechtervergleich bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.....	48
Abbildung 24: BAP bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.....	49

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Altersverteilung bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.....	34
Tabelle 2: Verteilung der VDR-Genotypen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes mellitus und gesunden Kontrollpersonen.....	38

8.3 Abkürzungen

AP	alkalische Phosphatase
BAP	knochenspezifische alkalische Phosphatase
BB	biobreeding
BGP	Bone Gla-Protein
BMD	bone mineral density
BMI	body mass index
Bp	Basenpaare
CD	cluster differentiation
CTX	Abbauprodukt von C-Telopeptiden der Alpha-1-
.	Ketten von Kollagen Typ
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DANN-bindende Domäne
DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DPD	Deoxypyridinolin
EAE	murine experimentelle Autoimmunenzephalitis
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
gAP	gesamte alkalische Phosphatase
HbA1 _c	glykosyliertes Hämoglobin
HLA	human leucocyte antigen
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IDDM	insulin-dependent Diabetes mellitus
IFN	Interferon
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
Kb	tausend Basen
Kbp	tausend Basenpaare
LBD	ligand-binding domain

MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NOD	non-obese diabetic
NTX	type I collagen cross-linked N-telopeptide
OC	Osteocalcin
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PICP	C-terminales Propeptid des Typ-1-Kollagens
PTH	Parathormon, parathyreoidales Hormon
PYR	Pyridinolin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCP	Starcodon-Polymorphismus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE-Puffer	Sodium-EDTA-Puffer
UTR	untranslated region
VDBP	Vitamin-D-bindendes Protein
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VRE	Vitamin-D-responsive Elemente

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. R. Bretzel und Prof. Dr. med. H. Stracke für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Mitarbeit in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

PD Dr. med. W. J. Fassbender und Dr. med. B. Görtz für ihre kompetente und außergewöhnlich freundschaftliche Betreuung. Sie waren immer ansprechbar, wissenschaftlich hochkompetent und äußerst engagiert.

Frau **J. Sitte** für ihre große Hilfsbereitschaft

Herrn **W. Pabst**, Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung

Britta Steinhauer für die gute Zusammenarbeit

Allen Probanden für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Name: Katja Weismüller
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geboren: 22.12.1975
- Geburtsort: Hadamar

AUSBILDUNG

- 1982-1986 Grundschule Hausen
- 1986-1995 Fürst-Johann-Ludwig-Schule Hadamar
- **Juni 1995 Allgemeine Hochschulreife**
- 1995-2002 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- **September 1997 Physikum**
- **August 1998 Erstes Staatsexamen**
- **April 2001 Zweites Staatsexamen**
- **Mai 2002 Drittes Staatsexamen**

BERUF

Seit Juli 2002 Ärztin im Praktikum (ÄIP)
Abtlg. Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin,
Klinikum der JLU Gießen