

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. H. Greten

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Bedeutung des
 α_2 -adrenergen Rezeptors für die Regulation des Körpergewichts**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von
Claudia Brieske
aus Bremen

Hamburg 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27.01.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. F.U. Beil

Korreferent: Prof. Dr. H. Greten

Meinem Großvater in Dankbarkeit gewidmet.

Abkürzungen	1
A. Einleitung	2
1. Adipositas	2
1.1. Definition	2
1.2. Prävalenz	3
1.3. Morbidität und Mortalität	3
1.4. Psychosoziale Komplikationen	5
1.5. Kosten	5
2. Untergewicht	6
3. Ätiologie der Adipositas	7
3.1. Genetik	7
3.1.1. „Thrifty genotype“	7
3.1.2. Formalgenetische Befunde	7
3.1.3. Molekulargenetische Befunde	8
3.2. Energieaufnahme	10
3.3. Energieverbrauch	11
3.3.1. Grundumsatz	11
3.3.2. Körperliche Aktivität	12
3.3.3. Thermogenese	12
4. Einfluß des sympathischen Nervensystems auf das Körpergewicht	13
4.1. Katecholamine und Lipolyse	13
4.2. Lipolyse und Thermogenese im braunen Fettgewebe	14
4.3. α_{2A} -adrenerger Rezeptor	15
4.4. α_{2B} -adrenerger Rezeptor	17
5. Fragestellung	19
B. Materialien und Methoden	20
1. Materialien	20
1.1. Geräte	20
1.2. Chemikalien, Enzyme und Kits	21
1.3. Enzym-Puffer, Lösungen und häufig verwandte Puffer	23
1.4. Untersuchte Kollektive	24

2. Methoden	25
2.1. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut	25
2.2. DNA-Konzentrations-und Reinheitsbestimmung.....	25
2.3. Amplifizierung von DNA-Segmenten mit der Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	26
2.4. Kontrolle der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	30
2.5. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse.....	30
2.6. Klonierung der PCR-Produkte.....	31
2.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	33
2.8. DNA-Sequenzierung	35
2.9. Methodik des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)	36
2.10. Statistische Analyse.....	38
C. Ergebnisse	39
1. Suche nach Varianten in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors.....	39
1.1. SSCP-Analyse der PCR-Produkte	39
1.2. Sequenzierung der PCR-Produkte mit abweichendem Laufmuster	40
1.3. Häufigkeit der identifizierten Deletion.....	41
1.4. Häufigkeit eines Polymorphismus in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors	44
2. Häufigkeit eines Polymorphismus im α_{2B} -adrenergen Rezeptor	46
D. Diskussion	49
1. Genetik von Adipositas	49
2. Untersuchung von Kandidatengenen	49
3. Untersuchte Kollektive	50
4. Der α_{2A} -adrenerge Rezeptor als Kandidatengen	50
4.1. Mutationsscreening der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors mittels SSCP	51
4.2. Häufigkeit eines C/G-Polymorphismus der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors	51

4.3. Mögliche funktionelle Relevanz der untersuchten Polymorphismen des α_{2A} -adrenergen Rezeptors	52
5. Der α_{2B} -adrenergen Rezeptor als Kandidatengen	55
5.1. Häufigkeit einer Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors	55
5.2. Mögliche funktionelle Relevanz des Polymorphismus des α_{2B} -adrenergen Rezeptors	56
6. Ausblicke	57
E. Zusammenfassung	58
F. Literaturverzeichnis	59
G. Anhang	69
Danksagung.....	69
Lebenslauf.....	70
Erklärung.....	71

Abkürzungen

A	Adenosin
AS	Aminosäure(n)
BMI	Body Mass Index (Körper-Masse-Index)
Bp	Basenpaare
C	Cytidin
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleotide
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanosin
× g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
M	Molar
OD _{nm}	Optische Dichte (Index nm gibt Meß-Wellenlänge an)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism Analysis
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T	Thymidin
UV	Ultraviolett
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

A. Einleitung

1. Adipositas

1.1. Definition

Übergewicht und Adipositas sind definiert durch eine überschüssige Ansammlung von Körperfettgewebe. Dabei macht bei normalgewichtigen gesunden Männern im Alter von 18 Jahren die Fettmasse 15-18 %, bei Frauen 20-25 % des Körpergewichts aus (Hebebrand *et al.* 1995).

Zur Kategorisierung des Körpergewichts bzw. des damit einhergehenden Körperfettanteils wird der sog. Körper-Masse-Index (Body mass index = BMI) verwendet, der sich folgendermaßen berechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht in Kilogramm (kg)}}{\text{Körpergröße in Metern zum Quadrat (m}^2\text{)}}$$

Diese Größe zeigt eine hohe Korrelation zum prozentualen Körperfettanteil (Seidell *et al.* 1997).

Auf der Basis des BMI empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation, Übergewicht und Adipositas folgendermaßen zu klassifizieren (WHO report obesity 1998):

BMI (kg/m²)	Klassifikation des Körpergewichts
< 18,5	Untergewicht
18,5 – 24,9	Normalgewicht
25,0 – 29,9	Übergewicht
30,0 – 34,9	Adipositas Grad I
35,0 – 39,9	Adipositas Grad II
≥ 40	Adipositas Grad III

Bei Kindern und Jugendlichen werden zur Klassifikation des Körpergewichts vorwiegend alters- und geschlechtsspezifische Perzentilen verwendet. Kinder und Jugendliche, die einen BMI zwischen der 90. und 97. Altersperzentile aufweisen, werden als übergewichtig eingestuft. Kinder und Jugendliche, deren BMI über der 97. Altersperzentile liegt, gelten als adipös.

1.2. Prävalenz

Laut Daten aus dem Bundes-Gesundheitssurvey 1998 zeigen sich bei deutschen Erwachsene im Alter von 18 bis 79 Jahren für die verschiedenen BMI-Kategorien folgende Prävalenzen (Bellach *et al.* 1998):

BMI (kg/m ²)	Männer		Frauen	
	alte Bl.	neue Bl.	alte Bl.	neue Bl.
< 20	1,9 %	2,9 %	6,8 %	5,7 %
20-24,9	31,3 %	31,1 %	41,1 %	37,4 %
25-29,9	48,7 %	45,1 %	31,1 %	32,4 %
30-39,9	17,6 %	20,5 %	19,3 %	23,1 %
≥ 40	0,7 %	0,4 %	1,8 %	1,4 %

(Bl.=Bundesländer)

Tab. 1: Prävalenzen der BMI-Kategorien in der Bundesrepublik Deutschland

Somit weisen über 50 % der Frauen und mehr als 65 % der Männer einen BMI über 25 kg/m² auf und liegen mit ihrem Körpergewicht entsprechend der WHO-Klassifikation bereits im Bereich des Übergewichtes. 21,1 % der weiblichen bzw. 18,3 % der männlichen Gesamtbevölkerung in den alten Bundesländern sind als adipös zu klassifizieren. Untersuchungen im Rahmen der Deutschen Herz-Kreislauf-Präventionsstudie (Hoffmeister *et al.* 1994) bzw. anderer epidemiologischer Studien in Deutschland und Europa bestätigen diese Zahlen (Filipiak *et al.* 1993).

Damit gehört Deutschland im europäischen Vergleich zu den Ländern höherer Adipositasprävalenz. Gemessen an der Entwicklung des letzten Jahrzehnts muß von einer weiteren zunehmenden Verbreitung der Adipositas ausgegangen werden (Bellach *et al.* 1998).

1.3. Morbidität und Mortalität

Zahlreiche epidemiologische Studien belegen eine Assoziation zwischen Übergewicht bzw. Adipositas und einer Vielzahl von Erkrankungen.

An erster Stelle steht die gestörte Glukosetoleranz bzw. der Diabetes mellitus Typ 2. Das relative Risiko, im Verlauf des Lebens einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln, ist bei Männern mit einem BMI von 29,0-34,9 kg/m² um das 6-fache und bei einem BMI > 35 kg/m² sogar um das 42-fache im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöht (Chan *et al.* 1994).

Bei Frauen zeigen sich noch gravierendere Zahlen: ein BMI von 30 kg/m² erhöht hier das relative Risiko, einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln, 28-fach und ein BMI > 35 kg/m² läßt das Risiko auf das 93-fache ansteigen (Colditz *et al.* 1995).

Auch weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren werden durch Übergewicht bzw. Adipositas beeinflusst. Dazu gehören vor allem der arterielle Hypertonus sowie Dyslipidämien aber auch prokoagulatorische Faktoren (Jung *et al.* 1997; Assmann und Schulte 1993). Die PROCAM-Studie (Prospective Cardiovascular Münster Study) bestätigte u.a. eine Zunahme sowohl der Hypertonieprävalenz als auch eine erhöhte Rate von Dyslipoproteinämien bei steigendem Körpergewicht (Assmann und Schulte 1992). Insgesamt verdoppelt sich das relative Risiko für die koronare Herzkrankheit bei Übergewicht (BMI > 25 kg/m²) im Vergleich zu Normalgewichtigen und steigt bei einem BMI > 29 kg/m² sogar auf das 3,6-fache an (Willett *et al.* 1995). Die Konstellation der kardiovaskulären Risikofaktoren wird dabei auch von der Art der Körperfettverteilung beeinflusst. So ist die viszeral betonte Adipositas mit einem höheren Risiko für metabolische Komplikationen assoziiert als die gluteal-femoral betonte Form (Kissebah *et al.* 1982).

Für die Assoziation von Adipositas mit kardiovaskulären Risikofaktoren scheint die Insulinresistenz eine entscheidende Rolle zu spielen. Reaven führte 1988 unter dem Begriff „Syndrom X“ eine Krankheitsentität in die Literatur ein, die neben abdominaler Adipositas Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie sowie Störungen der Hämostase umfaßt (Reaven 1988). International wird diese Krankheitsentität mittlerweile als „metabolisches Syndrom“ bezeichnet. Das gehäufte Zusammentreffen dieser Krankheiten, die allesamt kardiovaskuläre Risikofaktoren darstellen, birgt eine erhebliche atherogene Potenz und damit Bedrohung für den Patienten in sich (Wirth 2000).

Weiterhin gehören maligne Tumorerkrankungen, hier vor allem die Karzinome von Kolon, Mamma, Zervix, Ovar und Endometrium, zu den mit Adipositas assoziierten Krankheitsbildern. Auch degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates, das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom sowie die Cholezystolithiasis und Steatosis hepatis sind häufige Begleiterkrankungen der Adipositas (Jung *et al.* 1997).

Übergewicht und Adipositas gehen darüber hinaus mit einem erhöhten relativen Mortalitätsrisiko einher. Deutliche Zahlen fanden sich im Rahmen der Nurses Health Study, in der 115.195 Frauen über einen Zeitraum von 16 Jahren beobachtet wurden (Manson *et al.* 1995). Hier erhöhte sich das relative Sterblichkeitsrisiko bereits bei

einem BMI von 25-27 kg/m² um 60 %, verdoppelte sich bei einem BMI von 30 kg/m², um bei einem BMI > 32 kg/m² sogar auf das 4-fache im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen (BMI unter 22 kg/m²) anzusteigen. Verantwortlich hierfür waren vor allem vermehrte kardiovaskuläre Todesfälle.

1.4. Psychosoziale Komplikationen

Neben den negativen Auswirkungen auf die körperliche Gesundheit müssen auch die durch Übergewicht und Adipositas zusätzlich verursachten psychosozialen Komplikationen berücksichtigt werden. In einer Industriegesellschaft, in der das Schönheitsideal des „schlanken Menschen“ vorherrscht, zeigen bereits Kinder eine deutliche Ablehnung gegenüber dicken Körperformen (Pudel 1997). Schon Sechsjährige verbinden mit der Silhouette eines dickleibigen Kindes Attribute wie „faul, dreckig und dumm“ (Staffierie 1967) und lehnen übergewichtige Gleichaltrige als Spielkameraden ab (Wooley *et al.* 1979).

Deutlich zeigte sich die negative Stigmatisierung des Übergewichtes auch bei einer Studie, die unter amerikanischen Studenten durchgeführt wurde: die Mehrzahl von ihnen würde bei der Frage nach Einstellungspräferenzen als spätere Arbeitgeber eher einen ehemaligen Psychiatriepatienten oder Vorbestraften als einen adipösen Bewerber einstellen (Kennedy und Homant 1984). Auch bei einer Studie unter tatsächlichen Arbeitgebern wurde bei Bewerbern eher über Alkoholismus als über Fettleibigkeit hinweggesehen (Roe und Eickworth 1976).

Diese Zahlen weisen auf ein hohes Ausmaß an sozialer Diskriminierung gegenüber adipösen und übergewichtigen Mitmenschen in unserer Gesellschaft hin und lassen vermuten, daß die psychosozialen Nachteile der Adipositas oft schwerer wiegen als organische Komplikationen (Wirth 2000).

1.5. Kosten

In einer 1995 vom Bundesministerium für Gesundheit in Auftrag gegebenen Analyse wurden die Kosten von Adipositas einschließlich der Komorbiditäten auf einen Anteil von 5,4 % der gesamten Krankheitskosten in der BRD beziffert. Insgesamt muß man bei vorsichtiger Schätzung von Kosten in Höhe von ca. 10 Mrd. Euro ausgehen, die pro Jahr durch Übergewicht und Adipositas im deutschen Gesundheitswesen verursacht werden.

2. Untergewicht

Neben den zahlreichen unter Übergewicht und Adipositas leidenden Menschen gibt es andererseits Personen, die mit ihrem Körpergewicht deutlich unterhalb des Normalgewichts liegen. Ab einem BMI $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ wird von Untergewicht gesprochen.

Aufgrund des in unserer Gesellschaft vorherrschenden Schönheitsideals des schlanken Menschen gehören zu dieser Gruppe vielfach Personen, die ihr Wunschgewicht nur durch stark eingeschränkte Nahrungsnahme erreichen und demzufolge unter Eßstörungen leiden. Auch die Abhängigkeit von Genuß- oder Rauschmitteln sowie konsumierende (präklinische) Erkrankungen können zu Untergewicht führen.

Daneben gibt es aber eine weitere Gruppe von Personen, bei denen diese Faktoren als Ursache des Untergewichtes ausgeschlossen werden können. Hier scheinen die in Wechselwirkung stehenden Komponenten Energieaufnahme, Energieverbrauch, Stoffwechselfaktoren und Verhalten zu einer insgesamt sehr niedrigen Fettmasse zu führen. Auf der Suche nach dem Einfluß genetischer Faktoren auf die Regulation des Körpergewichts stellen gesunde und nichtrauchende untergewichtige Probanden damit ein wertvolles Kollektiv dar.

Niedrige Gewichtszustände haben medizinisch-epidemiologisch bisher wenig Beachtung gefunden. Insgesamt scheint Untergewicht, das durch Rauchen oder (präklinische) konsumierende Erkrankungen hervorgerufen wird, das Mortalitätsrisiko zu erhöhen. So zeigte beispielsweise die American Cancer Society Prevention Study, daß sich bei untergewichtigen Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern der gleichen Körpergewichtskategorie eine annähernde Verdoppelung des Mortalitätsrisikos findet (Lew und Garfinkel 1979). Darüber hinaus ist das Mortalitätsrisiko eines untergewichtigen regelmäßigen Rauchers (> 20 Zigaretten/Tag) mit dem eines stark adipösen Menschen vergleichbar.

Werden in Studien allerdings der Einfluß des Rauchens bzw. subklinischer konsumierender Erkrankungen kontrolliert und eliminiert, scheint Untergewicht *per se* das relative Mortalitätsrisiko nicht zu erhöhen. Die bereits erwähnte Nurses Health Studie wies sogar für untergewichtige nichtrauchende Frauen (BMI $< 19 \text{ kg/m}^2$) das niedrigste Mortalitätsrisiko der gesamten Kohorte nach. Damit lag das relative Sterblichkeitsrisiko nicht nur unterhalb des Risikos der übergewichtigen oder adipösen Frauen, sondern unterschritt auch das Mortalitätsrisiko normalgewichtiger Probandinnen (Manson *et al.* 1995).

3. Ätiologie der Adipositas

3.1. Genetik

3.1.1. „Thrifty genotype“

Über Tausende von Jahren waren die Lebensumstände des Menschen durch einen Mangel an ausreichender Nahrung gekennzeichnet. In den vorherrschenden Zeiten begrenzter Nahrungsmittelressourcen waren solche Individuen innerhalb einer Population im Vorteil, die Energie besonders effizient aufnehmen und speichern konnten. Bereits 1962 stellte Neel die Hypothese auf, daß die weite Verbreitung von Adipositas und Diabetes in bestimmten Volksgruppen auf den sog. „thrifty genotype“ zurückzuführen sei und bezeichnete damit Erbanlagen, die für einen sehr sparsamen Energiehaushalt kodierte (Neel *et al.* 1962). Seiner Meinung nach könnte ein solcher Genotyp im Rahmen der Evolution einen Selektionsvorteil dargestellt und sich dementsprechend weiter ausgebreitet haben. Erst durch den heutigen Nahrungsmittelüberfluß und den weitgehenden Wegfall körperlicher Arbeit würde ein ökonomischer Stoffwechsel zum Nachteil und fördere die Entwicklung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2.

3.1.2. Formalgenetische Befunde

„Dick sein liegt in der Familie“ ist ein im alltäglichen Leben häufig verwendeter Ausspruch. Er trägt der augenfälligen Tatsache Rechnung, daß Übergewicht in Familien oft gehäuft vorkommt. Dieses könnte einerseits auf die gleichen Lebensumstände innerhalb einer Familie, andererseits auf eine starke genetische Komponente zurückzuführen sein.

Tatsächlich konnte in wissenschaftlichen Studien ein großer Einfluß genetischer Faktoren auf das Körpergewicht und dessen Regulation nachgewiesen werden. So konnte in einer in Dänemark durchgeführten Adoptionsstudie (Stunkard *et al.* 1986) gezeigt werden, daß das Gewicht der Adoptierten nicht mit dem Gewicht der Adoptiveltern korrelierte, bei denen sie aufgewachsen waren, sondern mit dem der leiblichen Eltern. Vor allem die Gewichtsbeziehung zwischen biologischen Müttern und Adoptivkindern war hochsignifikant. In einer Fortsetzung dieser Studie (Soerensen *et al.* 1992) stellte sich überdies heraus, daß die BMI-Korrelationen zwischen den Adoptivlingen und ihren biologischen Müttern, Vätern und Geschwistern vergleichbar waren mit denen der leiblichen Verwandten, die gemeinsam aufgewachsen waren. Diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluß genetischer Faktoren auf das Körpergewicht.

Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kommen auch Zwillingsstudien. Eine der wichtigsten Studien im Bereich der Adipositasforschung analysierte den BMI einer großen Anzahl getrennt und gemeinsam aufgewachsener Zwillingspaare aus Schweden (Stunkard *et al.* 1990). Dabei fand sich eine BMI-Intrapaarkorrelation von getrennt aufgewachsenen monozygoten Zwillingspaaren von 0,66 für Frauen bzw. 0,7 für Männer. Das Körpergewicht der Zwillinge, die gemeinsam aufgewachsen waren, zeigte keine höhere Korrelation als das der getrennt aufgewachsenen. Damit deutet auch diese Studie darauf hin, daß die genetische „Ausstattung“ des einzelnen im Gegensatz zum gemeinsamen Aufwachsen einen bedeutenden Einfluß auf das Körpergewicht hat.

Auf dem Boden bisher durchgeführter Zwillingsstudien wird der Anteil genetischer Faktoren an der Varianz des BMI auf Werte zwischen 60-80 % geschätzt (Stunkard *et al.* 1990; Selby *et al.* 1990; Mac Donald und Stunkard 1990; Fabsitz *et al.* 1992; Rutherford *et al.* 1993). Dabei sei angemerkt, daß Adoptions- und Familienstudien zum Teil deutlich geringere Erblichkeitsschätzungen anführen (Bouchard *et al.* 1988).

Zur Erfassung von Interaktionen zwischen Genotyp und Umwelt wurde in einer weiteren Zwillingsstudie der Einfluß von Überernährung auf das Körpergewicht untersucht (Bouchard *et al.* 1990). Über einen Zeitraum von 100 Tagen wurden monozygote Zwillingspaare an je 6 Tagen der Woche mit 1000 kcal zusätzlich zu ihrer durchschnittlichen Energiezufuhr ernährt. Bei diesem Versuch zeigten sich große Unterschiede in dem nach 100 Tagen gemessenen Gewicht. Bei einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 8,1 kg fanden sich bei den einzelnen Probanden Spannbreiten der Gewichtszunahme zwischen 4,3 kg bis 13,3 kg. Die Gewichtsveränderung innerhalb der monozygoten Paare zeigte jedoch eine enge Korrelation. Neben der Reaktion des Organismus auf hyperkalorische Ernährung scheint umgekehrt auch das Ausmaß der Gewichtsreduktion unter hypokalorischer Ernährung stark durch genetische Faktoren beeinflusst zu sein.

Insgesamt sprechen die innerhalb der Vererbungsstudien gewonnenen Befunde genetischen Faktoren eine erhebliche Rolle bei der Ausbildung des jeweiligen BMI zu.

3.1.3. Molekulargenetische Befunde

Die Regulation des Körpergewichts ist ein komplexer Vorgang, der durch viele verschiedene periphere und zentrale Prozesse gesteuert (Hebebrand *et al.* 1998) und folglich durch eine ganze Reihe von Genen beeinflusst wird. Dementsprechend ist die Adipositas eine polygenetische Erkrankung, die keinem einfachen Mendel'schen

Erbgang folgt. Man geht davon aus, daß die genetische Prädisposition aus der Addition sogenannter Suszeptibilitätsgene entsteht. Ein Suszeptibilitätsgen erhöht das Risiko der Adipositasentstehung, ist aber für sich genommen weder allein ausreichend noch erforderlich für die Entwicklung eines solchen Phänotyps. Die genetische Prädisposition führt also nur in Verbindung mit Umwelt-Interaktionen, wie Überernährung oder verminderter körperlicher Aktivität, zum Phänotyp der Adipositas (Barsh *et al.* 2000).

Ausgenommen sind hiervon die selten auftretenden Formen syndromaler Adipositas, die auf Chromosomenaberrationen oder Mutationen einzelner Gene beruhen und meist mit weiteren Anomalien vergesellschaftet sind. Häufigstes Beispiel ist hierfür das Prader-Willi-Syndrom mit einer Prävalenz von 1:5000-10.000 (Dietz 1992). Neben einer stammbetonten Adipositas fällt bei den Betroffenen eine deutliche Intelligenzminderung, primärer Hypogonadismus sowie Kleinwuchs auf.

Die an den syndromalen Formen beteiligten Gene können allerdings nicht für die große Zahl der Adipösen in unserer Gesellschaft verantwortlich gemacht werden. Die Identifizierung von Genen, die an der Entstehung der menschlichen Adipositas beteiligt sind, wird dadurch erschwert, daß Gen-Gen-Interaktionen und Gen-Umwelt-Interaktionen einen wesentlichen Einfluß auf den Phänotyp haben. In dieser Beziehung ähnelt die Adipositas anderen komplexen Erkrankungen, wie dem Diabetes mellitus Typ 2 oder der arteriellen Hypertonie. Ein wichtiger Forschungsansatz liegt daher im Studium adipöser Tiermodelle, bei denen Umwelteinflüsse unter experimentellen Bedingungen kontrolliert werden können. Gerade in den letzten Jahren konnten durch die Identifizierung monogenetischer Defekte bei Mäusen zukunftsweisende Erkenntnisse auch für die menschliche Adipositas gewonnen werden. Von den identifizierten Gendefekten seien an dieser Stelle die Mutationen im Leptingen bzw. -rezeptor erwähnt, die bei der Maus bereits in den ersten Lebenswochen zur Hyperphagie und massiver Adipositas führen (Zhang *et al.* 1994; Tartaglia 1995). Leptin ist ein Hormon, das fast ausschließlich im Fettgewebe produziert und anschließend in die Blutbahn sezerniert wird. Der Leptinrezeptor wird in hoher Dichte vor allem im Hypothalamus exprimiert, findet sich aber auch in zahlreichen anderen nicht-neuronalen Geweben. Leptin spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Körperfettmasse, indem es als Bindeglied zwischen peripheren (Fettgewebe) und zentralen Organen (Gehirn) dient und dem ZNS Informationen über die Größe der Körperfettmasse liefern kann (Hamann *et al.* 1996). Oft wird Leptin in diesem Rahmen auch als „Lipostat“ bezeichnet. Mittlerweile konnten auch beim Menschen Mutationen

im Leptingen bzw. -rezeptor nachgewiesen werden (Montague *et al.* 1997; Clément *et al.* 1998). Bei insgesamt extrem seltenen Vorkommen führen diese autosomal-rezessiv vererbten Gendefekte zu massiver Adipositas.

Als weiterer Forschungsansatz zur Identifizierung der für die Pathogenese der Adipositas relevanten Gene werden häufig sogenannte Kandidatengene untersucht. Kandidatengene für die humane Adipositas sind zum Beispiel solche Gene, die bei den monogenen Mäusemodellen durch eine Mutation den adipösen Phänotyp bedingen. Darüber hinaus gehören zu dieser Gruppe Gene, deren Beteiligung an der Pathogenese des Übergewichtes durch pharmakologische, biochemische, genetische und physiologische Überlegungen denkbar ist (Hebebrand *et al.* 1998). Dazu zählen beispielsweise die adrenergen Rezeptoren des Fettgewebes, die über Katecholamin-Stimulation an der Regulation der Lipolyse und damit indirekt am Energiestoffwechsel beteiligt sind (siehe dazu 4.1.). Die Untersuchung eines Kandidatengens beinhaltet zum einen die molekulargenetische Suche nach Varianten dieses Gens sowie die sich anschließende Klärung, ob eine identifizierte genetische Variante mit dem Phänotyp Körpergewicht assoziiert ist. Hierbei wird untersucht, ob der Polymorphismus mit unterschiedlicher Allelfrequenz in Kollektiven adipöser vs. schlanker Probanden auftritt. Eine Assoziation des Polymorphismus mit Adipositas bzw. Untergewicht kann als Hinweis auf eine durch die Variante im Kandidatengens bedingte Änderung des Energiestoffwechsels gewertet werden. Zur Analyse der exakten funktionalen Konsequenz einer genetischen Variante müssen weitergehende Experimente folgen, z.B. durch Expression in Zellkultur oder Studien an humanen Gewebeproben.

Über die Identifikation der Gene und der jeweiligen Mutationen erhofft man sich weitere Einblicke in die Pathogenese der Adipositas mit dem Ziel, in Zukunft rationalere Therapieansätze entwickeln zu können.

3.2. Energieaufnahme

Die Entstehung der Adipositas kann als Ergebnis einer längerfristig gestörten Energiebilanz verstanden werden, bei der übermäßig aufgenommene Energie in Form von Fett gespeichert wird. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um den Einfluß der Energieaufnahme auf die Pathogenese der Adipositas zu objektivieren. Alle Studien stießen dabei immer wieder auf das Phänomen des „under-reporting“: Adipöse unterschätzen im Vergleich zu Normalgewichtigen die Quantität der von ihnen verzehrten Nahrungsmittel und geben deutlich zu geringe

Mengen an Energiezufuhr in Erhebungsbögen an. In einer Studie, in der die Energieaufnahme mittels doppelt markiertem Wasser objektiviert wurde, lag die Menge der angegebenen Nahrungsmittel um 38 % unter der tatsächlich verzehrten (Prentice *et al.* 1986).

Trotz dieser Schwierigkeiten der Erhebung valider Ernährungsprotokolle sprechen die Mehrzahl der Studien für eine eindeutig positive Beziehung zwischen Fettzufuhr und Adipositas. Adipöse essen mehr Fett als Normalgewichtige (Lissner *et al.* 1987). In mehreren unabhängigen Untersuchungen fand sich bei Probanden eine positive Korrelation des BMI zum Fettgehalt der Nahrung bei negativer Korrelation zum Kohlenhydrat-Gehalt (Pudel und Westenhöfer 1992 ; Acheson *et al.* 1988).

3.3. Energieverbrauch

Eine positive Energiebilanz mit daraus resultierender Gewichtszunahme kann nicht allein durch erhöhte Energieaufnahme, sondern auch durch einen reduzierten Energieverbrauch entstehen. Der Gesamtenergieverbrauch setzt sich dabei zu unterschiedlichen Anteilen aus Grundumsatz, Thermogenese und körperlicher Aktivität zusammen. Jede dieser Einzelkomponenten kann durch eine Abnahme ihres Aktivitätsniveaus zu einer Positivierung der Energiebilanz beitragen.

3.3.1. Grundumsatz

Der Grundumsatz entspricht der Summe aller metabolischen Aktivitäten der einzelnen Organe und Gewebe des Körpers, die zur Aufrechterhaltung der Körperfunktionen im Ruhezustand erforderlich sind (Schutz 1998). Der Anteil des Grundumsatzes am Gesamtenergieverbrauch liegt dabei bei 60-75 %. Er korreliert positiv mit der fettfreien Körpermasse (Jequier und Schutz 1988) und wird zudem durch Alter und Geschlecht beeinflusst. So haben Frauen prinzipiell einen niedrigeren Grundumsatz als Männer, was zum größten Teil durch die geringere Muskelmasse erklärt wird (Ravussin und Swinburn 1993). Da sich bei Gewichtszunahme nicht nur die Fettmasse vermehrt, sondern es parallel auch zu einer Zunahme an fettfreier Körpermasse kommt, ist bei Adipösen parallel zur Gewichtszunahme der Grundumsatz erhöht.

In einer Studie zum Einfluß genetischer Faktoren auf den Grundumsatz konnte 11 % der Varianz durch Vererbung erklärt werden (Bogardus *et al.* 1986). In einer 1988 veröffentlichten Untersuchung an 126 Pima-Indianern konnte erstmals nachgewiesen werden, daß ein niedriger Grundumsatz langfristig zur Gewichtszunahme führt

(Ravussin *et al.* 1988). Diejenigen Probanden mit niedrigem Grundumsatz hatten ein 8-fach erhöhtes Risiko, im Verlauf der Beobachtung mehr als 10 kg zuzunehmen als Probanden mit hohem Energieumsatz.

3.3.2. Körperliche Aktivität

Die körperliche Aktivität wird unterteilt in einen spontanen und einen fakultativen Anteil. Während die spontane körperliche Aktivität sowohl die Aktivitäten des täglichen Lebens als auch spontane Muskelkontraktionen und das Aufrechterhalten unserer Körperhaltung umfaßt, entspricht die fakultative Aktivität den intentionalen Sport- und Fitnessaktivitäten. Naturgemäß zeigt die körperliche Aktivität große interindividuelle Unterschiede in ihrem Anteil am Gesamtenergieverbrauch. Bei Personen mit geringer Aktivität in Beruf und Freizeit kann man von einem Anteil von 15-25 % am Gesamtenergieverbrauch ausgehen (Wirth 2000). Interessanterweise zeigte eine Studie, daß bereits die Spontanaktivität familiär, evtl. sogar genetisch, beeinflusst ist. Es fanden sich hinsichtlich der spontanen körperlichen Aktivität zwischen einzelnen Familien eine höhere Varianz als innerhalb einer Familie (Zurlo *et al.* 1992). Weiterhin ergab sich bei männlichen Probanden eine Assoziation zwischen niedriger Spontanaktivität und Gewichtszunahme. Insgesamt scheint ein hoher Level an Spontanaktivität einer Gewichtszunahme entgegenzuwirken (Levine *et al.* 1999).

3.3.3. Thermogenese

Mit dem Begriff der Thermogenese bezeichnet man den Mehrverbrauch an Energie (über dem Grundumsatz) durch wärmeproduzierende Stimuli wie Nahrungsaufnahme („thermic effect of food“), Kälte- oder Hitzeexposition, Muskularbeit, psychische Stimuli (Streß, Angst), Hormone und Medikamente (Wirth 2000). Der Anteil der Thermogenese am Gesamtenergieverbrauch beträgt ca. 10 %.

Man unterscheidet bei der nahrungsinduzierten Thermogenese zwischen der obligatorischen und der fakultativen Thermogenese: „obligatorisch“ umfaßt hier den Energieverbrauch für Verdauung, Absorption, Transport und Lagerung. „Fakultativ“ bezeichnet den Teil, der durch Stimulation von Substratzyklen und des sympathischen Nervensystems hervorgerufen wird (Ravussin und Swinburn 1993).

In den letzten Jahren wurde gerade im Bereich der Thermogenese und ihrem Einfluß auf die Energiebilanz intensiv geforscht, da man hier eine wichtige Komponente der Entstehung von Adipositas vermutete. Tatsächlich zeigte sich, daß die Thermogenese

nach Nahrungsaufnahme bei Adipösen im Vergleich zu Normalgewichtigen bei gleicher fettfreier Körpermasse reduziert ist (Segal und Gutin 1983; Segal 1994; Segal *et al.* 1985a,b). Auch die belastungsinduzierte Thermogenese differiert deutlich: sie ist bei Adipösen im Vergleich zu normalgewichtigen Personen um die Hälfte reduziert (Segal und Gutin 1983; Segal *et al.* 1985a). Ursächlich wird hier unter anderem eine abgeschwächte Aktivität des sympathischen Nervensystems bei Adipösen diskutiert (Astrup *et al.* 1987).

Eine verminderte Thermogenese entspricht eine Positivierung der Energiebilanz und kann so zu einer Gewichtszunahme führen.

4. Einfluß des sympathischen Nervensystems auf das Körpergewicht

Bereits in den 80er Jahren wurde ein Konzept entwickelt, daß der sympathischen Aktivität eine zentrale Rolle bei der Gewichtsregulation zuschrieb (Landsberg und Young 1985) und zwar sowohl durch Einfluß auf die Energieaufnahme (durch Einfluß auf Appetit und Sättigung) (Astrup *et al.* 1995) als auch auf den Energieverbrauch (hier vor allem auf die Thermogenese). Es konnte nachgewiesen werden, daß die relative Körperfettmasse negativ mit der Plasmakonzentration der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin korreliert (Peterson *et al.* 1988). Bei Personen mit niedriger sympathischer Aktivität scheint ein hohes Risiko der Gewichtszunahme zu bestehen (Spraul *et al.* 1993).

4.1. Katecholamine und Lipolyse

Katecholamine spielen bei der Regulation des Fettgewebsstoffwechsels eine entscheidende Rolle (Lafontan und Berlan 1993; Lafontan und Berlan 1995; Lafontan *et al.* 1997; Arner 1999). Im menschlichen Fettgewebe stellt das sympathische Nervensystem den wichtigsten Stimulator der Lipolyse dar.

Auf zellulärer Ebene entfalten die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin über verschiedene adrenerge Rezeptoren ihre Wirkung. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie zeichnen sich durch in die Zellmembran eingelagerte Proteine aus, die sieben Transmembranhelices besitzen (Dohlmann *et al.* 1991; Strader *et al.* 1989). Die aminoterminal Region der Rezeptoren liegt dabei auf der extrazellulären Seite der Membran, die carboxyterminale Region auf der zytosolischen Seite. Die Bindungsstelle der Katecholamine liegt auf der Membranaußenseite in einer Tasche, die von den Transmembranhelices gebildet wird.

Man unterscheidet zwischen den für die Fettzelle relevanten α_2 -adrenergen Rezeptoren und den β -adrenergen Rezeptoren, wobei beide Gruppen wiederum mehreren Subtypen beinhalten. Auch funktionell muß eine deutliche Unterscheidung gemacht werden. Während eine Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren an der weißen Fettzelle zur Lipolyse führt, wirkt eine Aktivierung der α_2 -adrenergen Rezeptoren antilipolytisch.

Durch die Bindung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin an den β -adrenergen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung im Rezeptor. Die Strukturveränderungen der im Zellinneren liegenden Rezeptordomäne führt über ein stimulierendes G-Protein (G_s), das mit dem Rezeptor verknüpft ist, zur Aktivierung der intrazellulären Adenylatzyklase. Dadurch wird die cAMP-Konzentration in der Fettzelle erhöht. Bei steigenden cAMP-Konzentrationen wird über die daraus resultierende Aktivierung der Proteinkinase A die Hormon-sensitive Lipase stimuliert und die Lipolyse gesteigert. So werden schließlich vermehrt Depottriglyceride in Glyceride und freie Fettsäuren gespalten.

Eine Bindung der Katecholamine an einen α_2 -adrenergen Rezeptor führt hingegen über ein inhibitorisches Protein (G_i) zur Hemmung der membrangebundenen Adenylatzyklase. Hier mündet die Kaskade über Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration in eine verringerten Lipolyse (antilipolytische Wirkung).

Noradrenalin und Adrenalin können damit sowohl stimulierend (über β -adrenerge Rezeptoren) als auch inhibitorisch (über α_2 -adrenerge Rezeptoren) auf die Lipolyse wirken. Diese duale Wirkung hängt in ihrem Ausmaß von der Noradrenalin-Konzentration ab. Bei niedrigen Konzentrationen, die in der Regel bei körperlicher Ruhe vorliegen, aktiviert Noradrenalin vorwiegend α_2 -adrenerge Rezeptoren und wirkt antilipolytisch. Man spricht auch von einem tonisch-inhibitorischen Effekt auf die Lipolyse. Unter körperlicher Belastung kommt es zu einem Anstieg der Katecholamin-Konzentration. Nun werden vor allem die β -adrenergen Rezeptoren und damit die Lipolyse maximal stimuliert (Arner *et al.* 1990). Es scheint sich damit um einen komplexen Regulationsmechanismus zu handeln, der sich den jeweiligen physiologischen Gegebenheiten anpaßt.

4.2. Lipolyse und Thermogenese im braunen Fettgewebe

Im braunen Fettgewebe ist die Lipolyse die Voraussetzung für die Initiierung der Thermogenese. Kennzeichnend für die Mitochondrien im braunen Fett ist das „Uncoupling Protein“. Statt im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels

Adenosintriphosphat (ATP) als intermediäre Speicherform der Energie zu synthetisieren, resultiert ein erheblicher Teil des Energieumsatzes aus einem Protonenleck an der inneren Mitochondrienmembran, wo etwa 20-40 % der Energie entlang eines elektrochemischen Protonengradienten in Form von Wärme freigesetzt wird (Porter und Brand 1993). Die Entkopplung der Thermogenese vom Energieverbrauch wird durch Stimulation des sympathischen Nervensystems mit Noradrenalin-Anstieg und ein vermehrtes Angebot an Fettsäuren initiiert. (Hamann und Matthaei 1995). Ein Protonenleck läßt sich dabei außer im braunen Fett auch in anderen Geweben, vor allem der Skelettmuskulatur, nachweisen (Hamann *et al.* 2001).

Bei Nagetieren ist das auf die Thermogenese spezialisierte braune Fettgewebe das ganze Leben lang nachzuweisen. Durch Tiermodelle konnte die Schutzfunktion der Thermogenese im braunen Fettgewebe gegenüber der Entwicklung von Adipositas verdeutlicht werden. Die weitgehende Eliminierung des braunen Fetts führt bei Mäusen zu Adipositas, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Leptinresistenz (Lowell *et al.* 1993; Hamann *et al.* 1996; Hamann *et al.* 1997). Obwohl das braune Fettgewebe beim Menschen nur in den ersten Lebenstagen makroskopisch eindeutig vom weißen Fettgewebe abzugrenzen ist, kann es auch im Erwachsenenalter vor allem perirenal nachgewiesen werden (Bouillaud *et al.* 1988). Aufgrund der hohen thermogenetischen Kapazität ist es denkbar, daß auch sehr geringe Mengen braunen Fetts einen relevanten Beitrag zum Energiehaushalt des Menschen leisten können.

Man geht davon aus, daß eine gesteigerte Lipolyse (vermittelt über Stimulation vor allem des β_3 -adrenergen Rezeptors) zu einer erhöhten Thermogeneserate führt. Andersherum hemmt eine katecholamin-induzierte Aktivierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors die Lipolyse und drosselt damit die Thermogeneserate (Himms-Hagen 1989). Da die Thermogenese am Energieumsatz beteiligt ist, haben adrenerge Rezeptoren auch über diesen Mechanismus einen wesentlichen Einfluß auf die Energiebilanz .

4.3. α_{2A} -adrenerger Rezeptor

α_{2A} -Adrenozeptoren sind sowohl zentral im Hirnstamm als auch peripher an vegetativen Nervenendigungen lokalisiert. Zusätzlich findet man sie in unterschiedlichen Geweben, wie an der Fettzelle, in postsynaptischer Lokalisation. Mittlerweile hat man drei Subtypen des α_2 -adrenergen Rezeptors identifiziert (Bylund 1988) und kloniert (Kobilka *et al.* 1987; Lomasney *et al.* 1990; Regan *et al.* 1988). Man unterscheidet

zwischen den adrenergen Rezeptoren α_{2A} , α_{2B} sowie α_{2C} , deren kodierende Gene auf den Chromosomen 10, 2 bzw. 4 lokalisiert sind.

Die antilipolytische Wirkung an der Fettzelle wird vor allem durch den α_2 -Adrenozeptor Subtyp A vermittelt, dessen Gen auf Chromosom 10q23-q25 lokalisiert ist. Manche Autoren gehen davon aus, daß nur dieser Rezeptorsubtyp an der Plasmamembran von Adipozyten exprimiert wird (Castan *et al.* 1995).

Interessanterweise finden sich in der Lipolyserate der einzelnen Fettdepots regionale Unterschiede (Kather *et al.* 1977; Mauriege *et al.* 1987; Wahrenberg *et al.* 1989). So wurde in Studien eine verstärkte Stimulierbarkeit („Responsiveness“) der α_2 -adrenergen Rezeptoren im abdominellen subkutanen Fettgewebe bei adipösen Männern und Frauen gefunden (Mauriege *et al.* 1991; Mauriege *et al.* 1993; Mauriege *et al.* 1995). Geschlechterspezifisch hat Adrenalin im glutealen Fett bei Männern einen stärker ausgeprägten lipolytischen Effekt als bei Frauen. Gleichzeitig findet sich bei Frauen eine höhere Dichte an α_{2A} -adrenergen Rezeptoren in diesem Bereich. Theoretisch könnte die antilipolytische Wirkung der Rezeptoren für die Neigung von Frauen, gluteal verstärkt Fett zu speichern bzw. unter Kalorienrestriktion nur zögerlich Fett zu mobilisieren, verantwortlich sein.

Während eine Aktivierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors also die Fettspeicherung begünstigt, könnten Varianten des α_{2A} -adrenergen Rezeptors die lipolytische Aktivität des menschlichen Fettgewebes verändern und damit die Energiebilanz beeinflussen. So führt eine Blockade des α_{2A} -adrenergen Rezeptors *in vitro* zu einer Zunahme der Katecholamin-induzierten Lipolyse (Lafontan 1992). Eine Mutation in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnte dementsprechend dessen antilipolytische Wirkung blockieren bzw. abschwächen und so der Fettspeicherung bzw. Adipositasentstehung entgegenwirken.

Eine weitere Möglichkeit, wie Mutationen des α_{2A} -adrenergen Rezeptors den Energiestoffwechsel beeinflussen können, besteht in einer Modulierung der Thermogenese im braunen Fettgewebe. Eigentlich würde eine durch den α_{2A} -adrenergen Rezeptor bedingte Hemmung der Lipolyse und damit auch der Thermogenese zu einem geringeren Energieverbrauch führen. Eine genetische Variante könnte hier einen schützenden Effekt gegenüber einer Positivierung der Energiebilanz mit einer damit verbundenen Körpergewichtszunahme haben.

Zusätzlich könnte eine genetische Variabilität des α_{2A} -Adrenozeptors Auswirkungen auf den systemischen Sympathikotonus haben (Hein *et al.* 1999). Über den präsynaptisch

lokalisierten α_{2A} -adrenergen Rezeptor kommt es zu einer Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung und damit zu einer Abnahme des Sympathikotonus. Untersuchungen mit dem α_{2A} -Agonisten Clonidin zeigen, daß der α_{2A} -adrenerge Rezeptor auch an der Regulation des spontanen körperlichen Aktivitätsniveaus beteiligt ist. Dies hat wiederum Relevanz für die Regulation des Körpergewichts. Eine Mutation des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnte in diesem Bereich über eine Vielzahl von Mechanismen zu einem niedrigen Körpergewicht prädisponieren.

Mutationen bzw. Polymorphismen in der kodierenden Region eines Gens können im exprimierten Protein zu einem Aminosäureaustausch führen und die Struktur des Proteins verändern. Bei Rezeptoren kann so beispielsweise die Bindungsstelle des Liganden obliteriert oder die Initiierung der intrazellulären Signaltransduktion gestört werden. Polymorphismen in der Promoterregion, also dem regulierenden Genabschnitt, des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnten hingegen zu einer vermehrten oder verminderten Transkription und damit zu einer veränderten Expression des Rezeptors führen.

In vorhergehenden Studien wurden bereits zwei Restriktions-Fragment-Polymorphismen (RFLPs) im Gen des α_{2A} -adrenergen Rezeptors identifiziert, die zu einer Veränderung der Schnittstelle für die Restriktionsenzyme DraI und Bsu36I führen (Lockette *et al.* 1995; Michael *et al.* 1999). Dabei zeigte eine Studie unter weiblichen Probanden eine Assoziation des DraI RFLP zur Körperfettverteilung unabhängig vom Körpergewicht (Oppert *et al.* 1995) und unterstreicht damit die Rolle des α_{2A} -adrenergen Rezeptors als Kandidatengen für die Körpergewichtsregulation.

4.4. α_{2B} -adrenerger Rezeptor

Im Vergleich zum α_{2A} -adrenergen Rezeptor ist über die physiologischen Funktionen und das genaue Verteilungsmuster des Subtyp B des α_2 -adrenergen Rezeptors bisher wenig bekannt. Studien weisen dem Rezeptor eine wichtige Rolle vor allem bei der Regulation des Vasotonus zu. Eine Aktivierung des peripheren α_{2B} -adrenergen Rezeptors führt dabei zu einer Vasokonstriktion. Mäuse mit einem ausgeschalteten Gen des α_{2B} -Adrenozeptors zeigen im Gegensatz zum Wildtyp nach i.v.-Injektion eines nichtselektiven α_2 -Adrenozeptor-Agonisten nicht den erwarteten Blutdruckanstieg durch Vasokonstriktion. Stattdessen kommt es bei ihnen zu einer Verstärkung der zentral durch Inhibition des Sympathikotonus vermittelten hypotensiven Wirkung (Link *et al.* 1996).

Eine veränderte Regulation des Gefäßwiderstandes durch Varianten im α_{2B} -adrenergen Rezeptors könnte über zweierlei Mechanismen Einfluß auf den Grundumsatz und damit auf die Energiebilanz und das Körpergewicht des Menschen haben. Als direkte Wirkung könnte es zu einer Umverteilung des Blutflusses mit einer veränderten Durchblutung von metabolisch aktivem Gewebe wie beispielsweise der quergestreiften Muskulatur kommen. Zusätzlich könnten durch Mutationen im α_{2B} -adrenergen Rezeptor bedingte Veränderung des Gefäßtonus zu einer reflexartigen Modulation des autonomen Nervensystems führen (Heinonen *et al.* 1999).

Mittlerweile konnte im Gen des α_{2B} -Adrenozeptors ein Polymorphismus in Form einer Deletion von 3 Glutaminsäuremolekülen innerhalb eines Glutaminsäure-Repeat-Abschnitts (Glu¹²/Glu⁹) identifiziert werden (Baldwin *et al.* 1999; Heinonen *et al.* 1999). Es zeigte sich dabei eine Assoziation zwischen dem neuentdeckten Polymorphismus und einem verringerten Grundumsatz bei adipösen Finnen (Heinonen *et al.* 1999). Der Größenunterschied im Grundumsatz zwischen Probanden, die homozygot für die Variante kodierten und solchen, die zwei Wildtypallele besaßen, betrug 5,6 % bzw. 94 kcal/Tag. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte diese Assoziation zum Grundumsatz allerdings nicht bestätigen. Interessanterweise wurde hier zusätzlich eine mögliche Interaktion zwischen der Glu¹²/Glu⁹- α_{2B} -Variante und einem Trp64Arg-Polymorphismus im β_3 -adrenergen Rezeptor untersucht mit der Frage nach einem daraus resultierenden Einfluß auf das Körpergewicht. Dabei fand sich bei kaukasischen Frauen, die Trägerinnen beider Varianten waren, eine signifikant höhere Fettmasse (durchschnittlich 9,3 kg) als bei Trägerinnen der alleinigen Variante im β_3 -adrenergen Rezeptor (Dionne *et al.* 2001).

Trotz zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse kann aufgrund physiologischer Überlegungen und vorliegender Studien der α_{2B} -adrenerge Rezeptor durch seinen Einfluß auf die Energiebilanz zu Recht als Kandidatengen für die Regulation des Körpergewichtes in Betracht gezogen werden.

5. Fragestellung

Die Ergebnisse zahlreicher Studien über α_2 -adrenerge Rezeptoren weisen auf eine Vielzahl verschiedener Einflußmöglichkeiten der Rezeptoren auf die Energiebilanz und damit auf das Körpergewicht des Menschen hin.

Insbesondere der α_{2A} -adrenerge Rezeptor hat durch seine antilipolytische Wirkung und der damit verbundenen Hemmung der Thermogenese Einfluß auf die Fettspeicherung und den Energieverbrauch. Es ist denkbar, daß eine genetische Variante in der kodierenden Region des Rezeptors diese Wirkungen abschwächt und so durch erhöhte Lipolyserate und Thermogenese der Gewichtszunahme entgegenwirkt. Mutationen in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnten je nach Einfluß auf die Transkription sowohl zu Untergewicht als auch zu Adipositas prädisponieren.

Es ergeben sich dementsprechend folgende Fragestellungen:

- Können durch systematisches Mutationsscreening genetische Varianten in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors identifiziert werden?
- Wie häufig finden sich identifizierte genetische Varianten in Kollektiven bestehend aus untergewichtigen, normalgewichtigen und adipösen Probanden? Zeigt sich eine signifikante Assoziation einer genetischen Variante zu einer Körpergewichtskategorie?
- Wie ist die Häufigkeit einer bekannte C/G-Variante in der Promoter-Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors in den verschiedenen Probandenkollektiven? Ist hier eine signifikante Assoziation zu einer Körpergewichtskategorie nachzuweisen?

Auch der α_{2B} -adrenerge Rezeptor hat über Regulation des Vasokonstriktorentonus bzw. Änderung des Sympathikotonus Einfluß auf die Energiebilanz. Daher stellt sich auch dieser Subtyp als Kandidatengen der Adipositas dar und unterlag in dieser Arbeit folgender Fragestellung:

- Findet sich ein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit des untersuchten Glu¹²/Glu⁹-Polymorphismus im α_{2B} -adrenergen Rezeptor zwischen den Kollektiven unterschiedlichen Körpergewichts? Läßt sich so eine Assoziation zu einer BMI-Kategorie nachweisen?

B. Materialien und Methoden

1. Materialien

1.1. Geräte

ABI PRISM 377 DNA Sequenzer:	<i>Perkin Elmer (USA)</i>
Elektrophoresekammer:	<i>Mini-Sub Cell GT System, 7 × 10 cm:</i> <i>BIO RAD (Italien)</i> <i>Wide Mini-Sub Cell GT System, 15 × 10 cm:</i> <i>BIO RAD (Italien)</i>
Elektrophorese-Power-Supply:	<i>Pharmacia Biotech (USA)</i>
Eppendorf –Reaktionsgefäße:	<i>Eppendorf Safelocks (Hamburg)</i>
Film:	<i>Polaroid Typ 667 Schwarzweiß, Polaroid Crop. (USA)</i>
Heizblock:	<i>Techne Dri-Block DB 3 (U.K.)</i>
Inkubator:	<i>Baureihe 6000, Heraeus Instruments (Osterode)</i>
JETQUICK Säulen:	<i>GENOMED (Bad Oeynhausen)</i>
Mikrowellenherd Compact Y50:	<i>Moulinex (Kanada)</i>
Photometer Gene Quant II:	<i>Pharmacia Biotech (USA)</i>
Pipetten (0,1ml; 0,2ml; 1,0ml; 10ml):	<i>Eppendorf Combitips (Hamburg)</i>
Polaroidkamera 600 SE:	<i>Kaiser made for Polaroid (Japan)</i>
QIAamp-Säulen:	<i>QIAGEN (USA)</i>
Schüttelinkubator 3031:	<i>GFL (Burgwedel)</i>
Shaker:	<i>Rocky 3D (USA)</i>
SSCP-Elektrophoresegerät	
Multiphor II System:	<i>Pharmacia Biotech (USA)</i>
SSCP-Färbekammer Automated	
Gel Stainer:	<i>Pharmacia Biotech (USA)</i>
SSCP-Power-Supply EPS 600:	<i>Pharmacia Biotech (USA)</i>
Thermostat K2D mit	
Temperaturregler C1:	<i>Haake (Karlsruhe)</i>
Trio-Thermoblock:	<i>Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)</i>
UV-Lampe N90 KW 254 nm:	<i>Konrad Benda (Wiesloch)</i>

Vortexer VF2:	<i>Jahnke & Kunkel (Staufen)</i>
Wasserbad 7P mit Thermomix BU:	<i>Braun (Melsungen)</i>
Zentrifugen:	
Biofuge 13:	<i>Heraeus Instruments (Osterode);</i>
Mikroliter:	<i>Hettich (Tuttlingen)</i>

1.2. Chemikalien, Enzyme, Kits

ABI PRISMTM dRhodamine Terminator

Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:

Perkin Elmer (USA):

- *PGEM-3Zf(+)-Doppelstrang-Kontroll-DNA (0,2 µg/µl)*
- *21 M13 Kontrollprimer (0,8 pmol/µl)*
- *Terminator Ready Reaction Mix:*
 - *A-Dye Terminator markiert mit Dichloro[RG6]*
 - *C-Dye Terminator markiert mit Dichloro[TAMRA]*
 - *G-Dye Terminator markiert mit Dichloro[R110]*
 - *T-Dye Terminator markiert mit Dichloro[ROX]*
 - *dNTP (dATP, dCTP, dITP, dTTP)*
 - *AmpliAq DNA Polymerase,FS*
 - *MgCl₂*
 - *Tris-HCl Puffer, pH 9,0*

Agarose:

NuSieve Agarose 3:1: FMC Bioproducts (USA)

Agarose ultra pure: GIBCO BRL (USA)

Ampicillin 25 mg/Tab:

Stratagene (USA)

AmpliAq DNA Polymerase:

Perkin Elmer (USA)

Clean Gel DNA Analysis Kit:	<i>Pharmacia Biotech (USA):</i> ▪ <i>Polyarylamidgel Clean Gel 48S</i> ▪ <i>Gelpuffer</i> ▪ <i>Elektrodenpuffer</i> ▪ <i>Elektrodenstreifen</i>
DEPC-Wasser:	<i>Sigma Chemical Co. (USA)</i>
dATP (10 mM):	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
dCTP (10 Mm):	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
dGTP (10 mM):	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
dTTP (10 mM):	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
DH5 α –Zellen:	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
DMSO (Dimethylsulfoxid):	<i>Sigma Chemical Co. (USA)</i>
EDTA:	<i>Sigma Chemical Co. (USA)</i>
Ethanol absolut:	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Ethidiumbromid:	<i>Sigma Chemical Co. (USA)</i>
Isopropanol:	<i>Merck (Darmstadt)</i>
JETquick Plasmid Miniprep:	<i>Genomed (Bad Oeynhausen)</i> ▪ <i>G1 Lösung (Zellsuspension): 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; RNase (100 μg/ml)</i> ▪ <i>G2 Lösung (Zellyse): 200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)</i> ▪ <i>G3 Lösung (Neutralisierung): enthält Azetat und Guanidinhydrochlorid)</i> ▪ <i>G4 Lösung (Waschung): enthält Ethanol; NaCl; EDTA und Tris-HCl</i> ▪ <i>Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0</i>
Kerosin:	<i>Fluka (Neu-Ulm)</i>
M13 Forward Sequenzierprimer:	<i>Invitrogen (USA)</i>
10 $\times$ NE-Puffer 2:	<i>New England Biolabs (USA)</i>
pBR322-Msp1-Verdau (DNA-Marker):	<i>USB (USA)</i>
pGEM-T Easy Vector:	<i>Promega (USA)</i>

Plus One DNA Silver Staining Kit:	<i>Pharmacia Biotech (USA)</i>
	▪ 5 × Färbelösung ▪ 5 × Fixierlösung ▪ Formaldehyd 37% ▪ 5 × Natriumkarbonat ▪ Natriumthiosulfat 2 % ▪ 5 × Stopping & Preserving Solution
QIAamp Blood Kit:	<i>QIAGEN (USA)</i>
	▪ Protease ▪ AE-Puffer (Elutionspuffer) ▪ AL-Puffer (Lysepuffer) ▪ AW-Puffer (Waschpuffer)
10 × React Puffer 3:	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
Restriktionsenzym EcoR1:	<i>GIBCO BRL (USA)</i>
Restriktionsenzym Msp1:	<i>New England Biolabs (USA)</i>
Stop Solution:	<i>USB (USA)</i>
	95 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylen Zyanol FF
TA-Vektor:	<i>Invitrogen (Holland)</i>
T ₄ DNA Ligase:	<i>Promega (USA)</i>
	in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 50 mM KCl; 1mM DTT; 0,1 mM EDTA; 50 % Glycerol
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid):	<i>BTS GmbH (Norderstedt)</i>

1.3. Enzym-Puffer, Lösungen und häufig verwandte Puffer

DNA-Loadingbuffer:	300 µl Glycerin; 25 µl Bromphenolblau; 675 µl Aqua bidest.
LB-Nährmedium:	10 g LB Broth Base: <i>GIBCO BRL (USA)</i> + 500ml Aqua bidest. autoklaviert
10 × PCR-Puffer:	<i>Perkin Elmer (USA)</i> ; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,01% w/v gelatin

5 × TBE-Puffer:	54 g Tris-base; 27,5 g Borsäure; 20 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0; DEPC-Wasser ad 1000ml
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,4
T ₄ DNA Ligase 10 × Puffer:	Promega (USA); 300 mM Tris-HCl, pH 7,8; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 10 mM ATP

1.4. Untersuchte Kollektive

I. Adipöse Kinder und Jugendliche (n=195)

Rekrutiert an der Klinik Hochried, Murnau, und dem Adipositasbehandlungszentrum Insula, Berchtesgaden. Alter $13,7 \pm 2,3$ Jahre.

BMI bei 97 % über der 95er Perzentile, BMI bei 61 % über der 100er Perzentile.

II. Adipöse Erwachsene (n=107)

Rekrutiert am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg und den Optifast Zentren der Hamburger Krankenhäuser Bethanien, Wandsbek und Groß Sand. Alter $53,4 \pm 13,7$ Jahre.

BMI $38,5 \pm 5,0$ kg/m², keine bösartigen Erkrankungen aktuell oder in der Vorgeschichte.

III. Normalgewichtige Erwachsene (n=60)

Rekrutiert am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg. Alter $50,2 \pm 18,4$ Jahre.

BMI $22,6 \pm 1,6$ kg/m², keine bösartigen Erkrankungen aktuell oder in der Vorgeschichte.

IV. Untergewichtige Probanden (n=128)

Rekrutiert an der Universität Marburg. Alter $25,0 \pm 4,0$ Jahre.

BMI unter der 13er Perzentile bzw. $< 18,5$ kg/m², keine Eßstörungen, keine körperlichen Erkrankungen, Rauchen < 10 Zigaretten /die.

Alle Teilnehmer bzw. deren Erziehungsberechtigten wurden über die Art und Inhalt der Studie informiert und gaben ihre Zustimmung im Rahmen einer schriftlichen Einverständniserklärung. Gleichzeitig wurden alle genetischen Untersuchungen von den Ethikkommissionen der teilnehmenden Universitäten genehmigt.

2. Methoden

2.1. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Die methodische Beschreibung bezieht sich auf 3 ml Vollblut, das jedem der Probanden dieser Studie (siehe 1.4.) aus der Vene entnommen wurde. Bei der Entnahme wurde das Blut mit 0,5 ml 0,2 M Na-EDTA (pH 7,5) als Antikoagulant in einer Monovette versetzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei +4°C verwahrt.

Mit Hilfe des QIAamp Blood Kits wurde die Leukozyten-DNA aus dem EDTA-Blut isoliert. Dieses QIAamp Protokoll zeichnet sich als einfaches und schnelles Verfahren mit gleichzeitig hoher DNA-Ausbeute im Vergleich zur organischen DNA-Extraktion aus (Scherczinger *et al.* 1997).

Es wurden je 400 µl der EDTA-Blutproben mit 50 µl QIAGEN Protease und 400 µl QIAGEN Lysepuffer versetzt, für 15 Sekunden im Vortexer geschüttelt und 10 Minuten lang bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 420 µl Isopropanol wurde das entstandene Lysat auf Silikonmembran enthaltende QIAamp Säulen gegeben und zentrifugiert (1 min; 6000 × g). Durch die Salz- und pH-Bedingungen im Lysat wurde die DNA an dieser Silikonmembran adsorbiert, während die Zellreste, Proteine u.ä. filtriert wurden und so verworfen werden konnten. Um die an die Säule gebundene DNA von möglicher noch vorhandener Kontamination zu befreien, wurden die Proben zweimalig zunächst mit 500 µl QIAGEN Waschpuffer versetzt und dann zentrifugiert (je 1 min; 6000 × g). Das in diesen Schritten gewonnene Filtrat wurde wiederum verworfen. Durch Zugabe von 700 µl QIAGEN Elutionspuffer (erwärmt auf 70°C) und einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde abschließend die DNA von den Säulen in ein Eppendorfgefäß eluiert. Die DNA-Proben wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert.

2.2. DNA- Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Der Grad der Verunreinigung sowie die Konzentration der extrahierten DNA können durch Extinktionsmessung im Photometer objektiviert werden. Von der isolierten DNA wurde in einer 1:75 Verdünnung die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, vorgenommen. Eine OD_{260} von 1 entspricht etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.* 1989). Nach Berechnung der DNA-Konzentrationen wurden die Proben für die Weiterverarbeitung auf eine Konzentration von 50 ng/µl (in einem Volumen von 50 µl) verdünnt.

2.3. Amplifizierung von DNA-Segmenten mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.* 1985) können spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* exponentiell vermehrt werden. Nach Weiterentwicklung dieser Methode (Mullis und Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988) ermöglicht die PCR eine Vielzahl praktischer Anwendungen.

Im ersten Schritt dieser Methode wird Doppelstrang-DNA durch Erhitzen auf 95°C in ihre Einzelstränge denaturiert. Zu den beiden entstandenen Einzelsträngen werden zwei synthetische Oligonukleotide (sogenannte Primer) gegeben, die je einem der flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Segmentes komplementär sind. Damit die Primer an die DNA binden können (Annealing) wird die Temperatur auf Werte zwischen 55°C-65°C gesenkt. Anschließend synthetisiert eine hitzestabile Taq DNA-Polymerase (Saiki *et al.* 1988), ausgehend von den Primern, einen komplementären DNA-Strang aus Desoxynukleosidtriphosphaten von 5' nach 3' bei einer Temperatur von 72°C. Nach dieser Elongationsphase wird die Reaktion wieder auf die Denaturierungstemperatur erhitzt und so ein neuer Zyklus gestartet. In der Regel werden 25–35 dieser Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation wiederholt, so daß die Zielsequenz der DNA in exponentieller Anzahl amplifiziert wird. Abschließend erfolgt eine verlängerte Elongationsphase bei 72°C, damit nur teilweise synthetisierte Fragmente noch vollständig verlängert werden. Das Prinzip der PCR ist zur Verdeutlichung in Abb. 1 dargestellt.

Durch Zugabe von 5-10% Dimethylsulfoxid zum PCR-Reaktionsansatz wurde versucht die Spezifität der Primer-Bindung zu erhöhen (Filichkin *et al.* 1992).

PCR-Reaktionsansatz:	10 × PCR-Puffer	2,0 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	1,6 µl
	Primer 1 (40 µM)	0,2 µl
	Primer 2 (40 µM)	0,2 µl
	Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
	DNA (ca. 100 ng)	2,0 µl
	Dimethylsulfoxid	1-2 µl
	Aqua bidest.	ad 20 µl

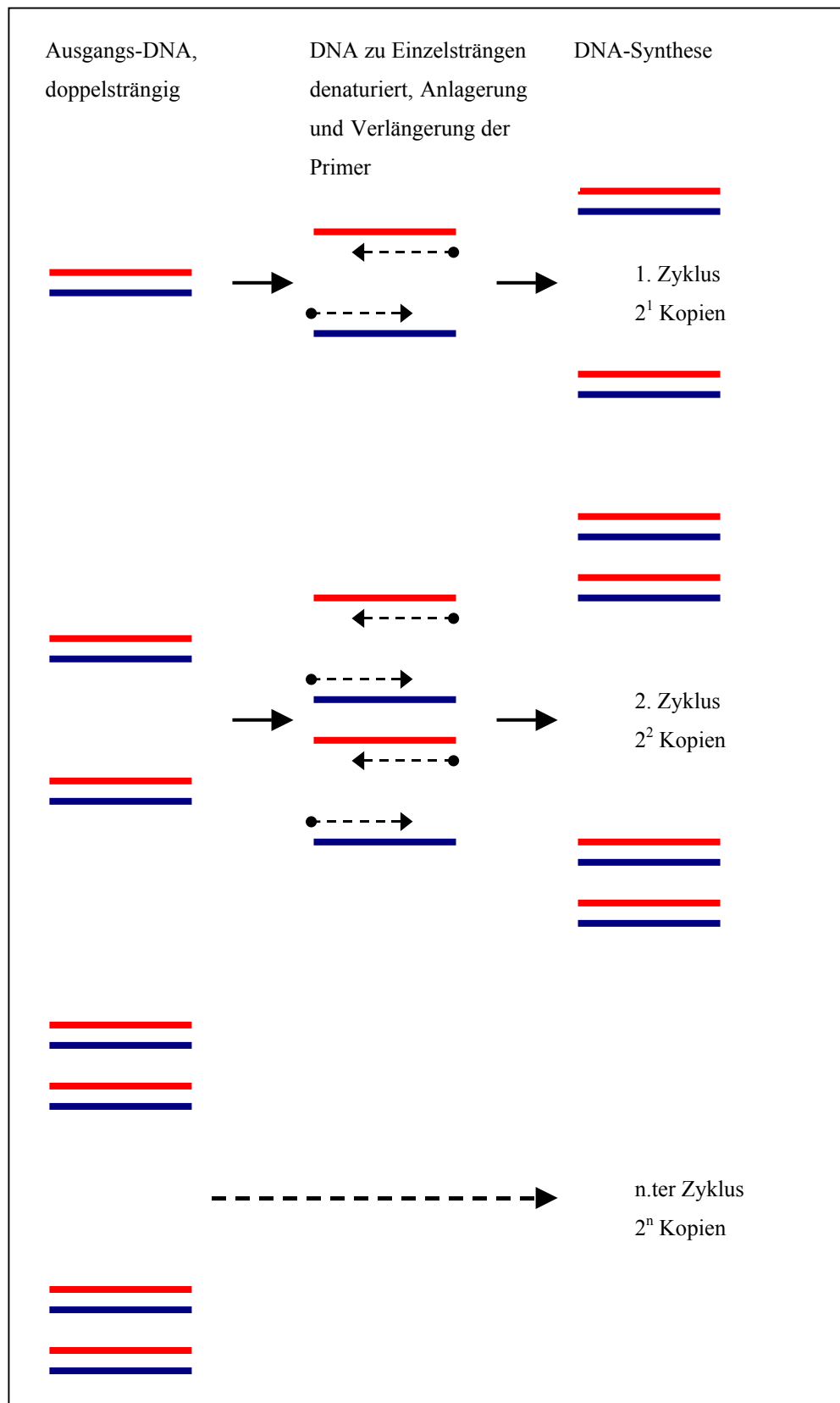


Abb. 1: Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion.

Die Abbildung verdeutlicht den exponentiellen Anstieg der PCR-Produkte bei jedem Zyklus.

Um eventuelle Kontaminationen des PCR-Reaktionsansatzes ausschließen zu können, wurde regelmäßig eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde die DNA des Reaktionsansatzes durch Aqua bidest. ersetzt.

1. Stufe	Denaturierung: 94°C; 10min	1 Zyklus
2. Stufe	Denaturierung: 94°C; 1 min Annealing: * ; 1 min Elongation: 72°C; 1 min	35 Zyklen
3. Stufe	Abschlußelongation: 72°C; 10min	1 Zyklus

Tab. 2: Temperaturprofil der Reaktionsschritte des PCR-Programms.

Abschnitt (Position)	Annealing-Temperatur*	Dimethylsulfoxid
1 (Bp 5-352)	61°C	5 %
2 (Bp 309-594)	63°C	5 %
3 (Bp 555-745)	62°C	10 %
4 (Bp 673-935)	63°C	7,5 %
5 (Bp 916-1171)	64°C	10 %
6 (Bp 916-1453)	59°C	10 %

Tab. 3: Optimale Annealing-Temperaturen* und DMSO-Konzentrationen zur Amplifikation der einzelnen Genabschnitte des α_{2A} -adrenergen Rezeptors.

Position	Annealing-Temperatur*	Dimethylsulfoxid
Bp -1417--913	63°C	5 %

Tab. 4: Optimale Annealing-Temperatur* und DMSO-Konzentration zur Amplifikation eines Genabschnittes des α_{2A} -Adrenozeptor- Promoters.

Position	Annealing-Temperatur*	Dimethylsulfoxid
Bp 856-959	56°C	5 %

Tab. 5: Optimale Annealing-Temperatur* und DMSO-Konzentration zur Amplifikation eines Genabschnittes des α_{2B} -adrenergen Rezeptors.

Die als Primer in den Tabellen 6-8 aufgelisteten synthetischen Oligonukleotide wurden für die Amplifikation des angegebenen Genabschnittes im Rahmen der Polymerasekettenreaktion verwendet. Bezogen wurden sie von der Firma MWG Biotech.

Abschnitt	Position	Primerpaar
1	Bp 5-352	5'-Primer CCT TCA TCT TCC GCC AGG AG 3'-Primer GTA GCC CAT GAC CTC GTT GG
2	Bp 309-594	5'-Primer CGC TCG TCA TCC CTT TCT CG 3'-Primer CCG CCG CCG CCC TTC TTC TC
3	Bp 555-745	5'-Primer TCC CGC CGC TCA TCT CCA TC 3'-Primer CAC GCG GGT GCG ACG CTT GG
4	Bp 673-935	5'-Primer CTT CGC TCC CTG CCT CAT CA 3'-Primer GGT CCA GCG CGT CGG TGT CG
5	Bp 916-1171	5'-Primer CGA CAC CGA CGC GCT GGA 3'-Primer GCG CTT CTC GAG GTT CTG C
6	Bp 916-1453	5'-Primer CGA CAC CGA CGC GCT GGA C 3'-Primer GCC TGC AGT CAG CGT GAG

Tab. 6: Basensequenz der Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der kodierenden Sequenz des α_{2A} -adrenergen Rezeptors.

Position	Primerpaar
Bp -1417- -913	5'-Primer TCA CAC CGG AGG TTC ATT CCC TCG 3'-Primer TCC GAC GAC AGC GCG AGT T

Tab. 7: Basensequenz der Oligonukleotidprimer zur Amplifikation eines Abschnittes des α_{2A} -adrenergen Promoters.

Position	Primerpaar
Bp 857-959	5'-Primer AGG GTG TTT GTG GGG CAT CT 3'-Primer GGC CGG AGA CAC TGG CAC TG

Tab. 8: Basensequenz der Oligonukleotidprimer zur Amplifikation eines Abschnittes des α_{2B} -adrenergen Rezeptors.

2.4. Kontrolle der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die durch die Polymerasekettenreaktion gewonnenen DNA-Produkte wurden durch horizontale Gelelektrophorese in 1,5-2,0 % Agarose auf ihre Größe hin überprüft (Sambrook *et al.* 1989). Dazu wurde Agaroselösung (1,5-2,0 g Agarose und 100 ml 0,5 × TBE-Puffer) in einem Mikrowellenherd zum Kochen gebracht, mit 4,0 µl Ethidiumbromid versetzt und nach Abkühlung auf ca. 50°C in eine Gelhalterung mit eingesetztem Kamm gegossen. 30 Minuten später wurde der Kamm aus dem dann polymerisierten Gel entfernt. Nach Einsetzen des Gel-Trays in die Gelkammer wurde die Kammer mit 0,5 × TBE-Puffer aufgefüllt, bis alle Geltaschen ausreichend von Flüssigkeit bedeckt waren. Von den PCR-Produkten wurden je 5 µl mit 2 µl DNA-Loadingbuffer und 5 µl TE-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung (5 Minuten bei 80 Volt, dann 60 Minuten lang bei 120 Volt) wurden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

Parallel dazu lief das mit Msp I geschnittene Plasmid bBR322 (Firma USB) auf dem Gel mit, dessen aus 26 Schnittfragmenten bestehende Bandenleiter als DNA-Längenstandard diente. Die Bandenleiter stellt dabei Fragmentlängen von 622, 527, 404, 307, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34, 26, 15 und 9 bp dar. Das Gel mit den durch das Ethidiumbromid visualisierten DNA-Banden wurde unter UV-Licht betrachtet. Durch Vergleich der Bandenleiter des Msp1-Markers mit der Laufhöhe der PCR-Produkte konnte deren korrekte Größe kontrolliert werden. Abschließend wurde das Agarosegel zur Analyse und Dokumentation fotografiert und aufgrund des enthaltenen Ethidiumbromid im Sondermüll entsorgt.

2.5. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse

Mit Hilfe der sogenannten SSCP-Methode (Orita *et al.* 1989 a+b) wurden die PCR-Produkte der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors auf Sequenzvarianten hin überprüft. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Umstand, daß einzelsträngige DNA in Lösung zu einer definierten Sekundärstruktur gefaltet ist. Diese Faltstruktur bestimmt die elektrophoretische Mobilität eines DNA-Einzelstranges in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. Bereits der Austausch einer einzigen Base verändert die Sekundärstruktur und führt damit zu einer veränderten elektrophoretischen Laufeigenschaft. Durch Anfärben der entstandenen Banden mit Silbernitrat (Ainsworth *et al.* 1991; Sugano *et al.* 1993) können DNA-Polymorphismen mit einer Sensitivität von mehr als 99 % bzw. 89 % bei Fragmentlängen von 100-300 bp bzw. 300-450 bp

identifiziert werden (Hayashi *et al.* 1991). Die gelektrophoretische Auftrennung wurde mit Hilfe des Clean Gel Analysis Kit und die spätere Anfärbung mit dem Silver Staining Kit (beides Firma Pharmacia Biotech) durchgeführt.

Dazu wurde zunächst das Polyacrylamidgel zur Rehydratation für 60 Minuten auf einem langsam rotierenden Schüttler in 25 ml Gelpuffer gelegt. Zwei Papierelektrodenstreifen wurden in je 22 ml Elektrodenpuffer getaucht.

Zur Denaturierung der DNA wurden je 3 µl PCR-Produkt mit 6 µl Formamid-haltiger Stop-Solution vermischt und für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Um ein „Reannealing“ der Einzelstränge zu verhindern, wurden die Proben anschließend sofort auf Eis gelegt und schnellstmöglich weiterverarbeitet. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Kühlgerät angeschlossen und auf eine Temperatur von 14°C eingestellt. Die Elektrophoresekühlfläche wurde zunächst gleichmäßig in drei Reihen mit je 1 ml Kerosin beschichtet, bevor das rehydratisierte Polyacrylamidgel mit seiner Oberfläche nach oben auf die Mitte der Kühlfläche gelegt wurde. Die Papierelektrodenstreifen wurden auf die Seitenränder des Gels gelegt. Nachdem je 7 µl der Probenansätze in die Gelkammern pipettiert wurden, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung (10 min bei 23mA/ 600V/ 18W, dann 60 min bei 30mA/ 600V/ 18W).

Zur anschließenden Silbernitratfärbung wurde das Gel in eine Färbekammer gelegt, in der automatisiert folgende Schritte abliefen:

- Fixierung in 25 ml Fixierlösung, 76 ml Aqua bidest. und 24 ml Ethanol abs. für 30 Minuten
- Anfärbung in 25 ml Färbelösung und 100 ml Aqua bidest. für 30 Minuten
- Waschen in 125 ml Aqua bidest. für eine Minute
- Entwicklung in 25 ml Natriumkarbonat, 125 µl Natriumthiosulfat, 125 µl Formaldehyd und 100 ml Aqua bidest. für 6 Minuten
- Abschlußbehandlung in 25 ml Stopping & Preserving Solution und 100 ml Aqua bidest. für 30 Minuten

2.6. Klonierung der PCR-Produkte

Aus methodischen Gründen wurde zur Erleichterung der späteren Sequenzierung das zu untersuchende PCR-Produkt noch einmal durch Klonierung selektiv vervielfältigt. Im Rahmen dieser Methode wurde das entsprechende DNA-Fragment zunächst durch eine T₄ DNA-Ligase mit einem Klonierungsvektor kovalent verknüpft. Als Vektor wurde ein

Plamid, der pGEM-T Easy Vector (Firma Promega) bzw. TA-Vektor (Invitrogen) verwendet, da sich Plasmide im Rahmen der Klonierung durch ihre einfache und zuverlässige Handhabung auszeichnen (Sambrook *et al.* 1989).

Ligationsansatz :	T ₄ DNA Ligase 10 × Puffer	1,0 µl
	pGEM-T Easy Vektor	1,0 µl
	PCR-Produkt	3,0 µl
	T ₄ DNA-Ligase	1,0 µl
	Aqua bidest.	ad 10 µl

Dieser Ligationsansatz wurde für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Vektor anschließend in *E. coli* Bakterien einschleusen zu können (Transformation), wurden kompetente DH5 α -Zellen (Gibco BRL) verwendet. Der Zustand der sogenannten „Kompetenz“ wird durch die Behandlung der Bakterien mit zunächst eiskalter CaCl₂-Lösung und folgendem kurzzeitigen Erhitzen erreicht (Mandel und Higa 1970; Cohen *et al.* 1972). Für die Transformation wurden je 2,5 µl des Ligationsansatzes und 20 µl der kompetenten Zellen für 20 Minuten auf Eis gelagert, damit die rekombinante DNA an der Oberfläche der DH5 α -Zellen adsorbieren konnte. Um die Aufnahme der DNA in die Zellen einzuleiten, folgte ein kurzer Hitzeschock (40 sec in einem 37°C warmen Wasserbad) sowie eine weitere zweiminütige Lagerung auf Eis.

Zur Einleitung des Zellwachstums wurde zu jedem Transformationsansatz 180 µl LB-Nährmedium gegeben. Anschließend wurden die Ansätze 45 Minuten lang in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Zur folgenden Ausplattierung der Proben wurden Ampicillin-haltige LB-Agarplatten vorbereitet: 10 g LB-Medium und 500 ml Aqua bidest. wurden autoklaviert und in einem Wasserbad langsam auf eine Temperatur von ca. 62°C heruntergekühlt. Nach Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) wurde die Lösung in unbeschichtete Petri-Schalen gegeben. Da der pGEM-T Easy Vektor ein Gen enthält, das der Zelle Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht, können auf diesen Platten nur die transformierten Zellen wachsen, während die anderen Zellen zugrunde gehen.

Nach dem Erhärten der Agarplatten innerhalb von ca. 15 Minuten wurden pro Platte 50 µl chromogenes X-Gal ausgestrichen (Sambrook *et al.* 1989). Durch diese Substanz kann anhand der Farbe der gewachsenen Klone erkannt werden, ob die transformierte Zelle das PCR-Produkt tatsächlich enthält. Diese Farbindikation erfolgt auf dem Prinzip der alpha-

Komplementation (Ullmann *et al.* 1967). Der verwendete Plasmidvektor enthält die regulatorische Sequenz und die kodierende Information für die ersten 146 Aminosäuren des β -Galactosidasegens (*lacZ*). Am amino-terminalen Fragmentes des *lacZ*-Gens befindet sich allerdings eine Interpolation von AS, so daß durch die Geninformation des Vektors allein das aktive Protein noch nicht exprimiert werden kann. Wenn man diesen Vektor nun in Bakterien einschleust, die für das carboxy-terminale Fragment der β -Galactosidase kodieren, kann es durch Komplementierung zur Bildung des enzymatisch aktiven Proteins kommen. Bei Anwesenheit des X-Gals formen diese *lac*⁺-Bakterien blaue Kolonien (Horwitz *et al.* 1964). Bei erfolgreicher Klonierung des PCR-Produktes in den Vektor wird die kodierende Sequenz für β -Galactosidase unterbrochen. Bakterien, die diese rekombinanten Plasmide enthalten, formen daher weiße Kolonien.

Auf diese mit Ampicillin und X-Gal präparierten Agarplatten wurden je 150 μ l Transformationsansatz mit Impfösen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die mit weißen und blauen Kolonien bewachsenen Platten wurden anschließend bei +4°C verwahrt.

2.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die auf den Agarplatten gewachsenen weißen Kolonien wurden einzeln mit Impfösen gepickt, in je ein Röhrchen mit Ampicillin (50 μ g/ml) versetztem LB-Medium gegeben und für 16 Stunden bei 37°C in einen Schüttelinkubator (150 rpm) gestellt. Dadurch wurde das Wachstum der *E. coli* Zellen stimuliert und so die Ausgangsmenge der Plasmid-DNA erhöht (Sambrook *et al.* 1989).

Zur Kontrolle, ob das gewünschte DNA-Segment tatsächlich in die Zellen kloniert wurde, wurden nach 4 Stunden Inkubationszeit je 5 μ l der Zellsuspension aus den Röhrchen entnommen und als Ausgangsmaterial für einen EcoR1-Restriktionsenzymchnitt (siehe 2.9.) verwendet. Da sich die Klonierungsstelle des Plasmids zwischen zwei EcoR1-Schnittstellen befindet, konnte bei erfolgreicher Klonierung das Ausgangs-DNA-Segment aus dem Klonierungsvektor geschnitten werden. Durch anschließende Polymerasekettenreaktion (siehe 2.3.) und gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.4.) wurde die Basenlänge des gewonnenen DNA-Fragmentes kontrolliert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des JETquick Plasmid Minipreps (Firma Genomed).

Das Protokoll des Herstellers ist eine Modifikation der Ursprungsmethode der alkalischen Lyse (Birnboim *et al.* 1979):

- Zentrifugation (3 min; 13000 rpm) von je 2 ml der Bakterienkultur zur Pelletierung der Bakterien
- Abgießen des Überstandes
- Zugabe von je 210 µl G1-Suspensionslösung und Vortexen der Proben zur Resuspension des Bakterienpellets
- Zugabe von je 210 µl Natriumdodecylsulfathaltiger (=SDS) G2-Lösung, die eine Lyse der Zellen bewirkt
- 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- Zugabe von 280 µl G3-Lösung, die Azetat und Guanidinhydrochlorid enthält. Dieser Puffer führt zu einer Neutralisierung des Lysats und dadurch zu einer Renaturierung und Aggregation chromosomaler DNA. Gleichzeitig kommt es zur Präzipitation von Protein-SDS-Komplexen und hochmolekularer RNA.
- Zentrifugation (10 min; 13000 rpm) zur Abtrennung der Präzipitate
- Platzierung je einer silikonmembranhaltigen JETquick Säule in ein sauberes 2 ml Eppendorfgefäß und Pipettierung des im letztem Schritt gewonnenen Überstandes auf die Säulen
- Zentrifugation (1 min; 13000 rpm) zur Abtrennung noch vorhandener Kontamination
- Zugabe von 700 µl ethanolhaltiger G4- Lösung
- Zentrifugation (1 min; 13000 rpm)
- Abgießen des Überstandes
- Zentrifugation (1 min; 13000 rpm)
- Platzierung der JETquick-Säulen in Eppendorfgefäße
- Zugabe von Tris/HCl-haltiger Elutionslösung (erwärmt auf 65°C) direkt auf das Zentrum der Silikonmembran zur Eluierung der Plasmid-DNA von den Säulen
- 1-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugation (1 min; 13000 rpm)
- Verwerfen der Säulen

Die so isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C gelagert.

2.8. DNA-Sequenzierung

Die automatisierte DNA-Sequenzierung beruht auf den Grundlagen der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977). Ähnlich wie die Polymerasekettenreaktion basiert dieses Verfahren auf der Fähigkeit der DNA-Polymerasen, DNA zu synthetisieren. Die Plasmid-DNA, die das zu sequenzierende DNA-Segment enthält, wird zunächst durch Erhitzen in ihre Einzelstränge denaturiert. Ein Oligonukleotid, das einem bekannten Abschnitt der Plasmid-DNA komplementär ist, dient als Primer für die DNA-Synthese mittels DNA-Polymerase. Beim Sanger-Sequenzierungsverfahren werden zusätzlich zu Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxynucleosidtriphosphat (ddNTP)-Analoga eingesetzt. Diese Analoga (oder auch Terminatoren) unterbrechen die DNA-Synthese, da ihnen die für die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung erforderliche 3'-Hydroxygruppe fehlt. Die DNA-Synthese wird also nach Addition z. B. eines ddATP abbrechen. Da sich im Reaktionsansatz auch „normale“ dATPs befinden, ist die Strang-Synthese solange möglich, bis ein ddATP-Einbau die Strangverlängerung beendet. In einer Nukleotidsequenz kommen natürlich mehrere Adenosinbasen vor; daher wird der Strangabbruch nicht immer an derselben Stelle sein. Stattdessen erhält man eine Reihe von Fragmenten, die alle am Ende des Primers beginnen und jeweils an unterschiedlichen Adenosinbasen enden. Um sicherzugehen, daß man für jeden A-Rest, der in der Sequenz vorkommt, entsprechende Segmente erhält, wird die Reaktionstemperatur zyklisch variiert. Derselbe Vorgang erfolgt auch für die Basen C, T und G.

Die einzelnen Didesoxynukleotide sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Prober *et al.* 1987, Rosenblum *et al.* 1997). Die erhaltenen DNA-Fragmente werden elektrophoretisch auf einer einzigen Acrylamidgelspur der Größe nach getrennt. Alle Fragmente einer gegebenen Länge wandern auf derselben Höhe durch das Gel. Die Detektion der unterschiedlichen ddNTP-Analoga und damit die Bestimmung der Basensequenz erfolgt mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes durch Fluoreszenzmessung der unterschiedlichen Emissionswellenlängen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe.

Die eigentliche Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing-Ready Reaction Kit (Firma PE Applied Biosystems) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt:

Es wurden je 10,0 µl der isolierten Plasmid-DNA (siehe 2.7.), 3,2 pmol M13 Forward Primer und 8,0 µl Terminator Ready Reaction Mix in einem Eppendorfgefäß mit Aqua

bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20,0 µl aufgefüllt. Parallel dazu wurde eine Positivkontrolle mit 4,0 µl pGEM-3Zf(+) ds-Kontroll-DNA (mit bekannter Basensequenz), 4,8 pmol M13(-21)-Kontrollprimer und 8,0 µl Terminator Ready Reaction Mix angesetzt. Auch hier wurde das Volumen mit Aqua bidest. auf 20,0 µl aufgefüllt. Der Terminator Ready Reaction Mix enthält die AmpliTaq DNA Polymerase, die fluoreszenzmarkierten ddNTPs, dNTPs, MgCl₂ und Tris-HCl-Puffer (pH 9,0).

Die Proben wurden in einen Trio-Thermoblock (Firma Biometra) plaziert und folgender Temperaturvariation für insgesamt 25 Zyklen unterworfen:

- 30 Sekunden ⇒ 95°C (Denaturierungsphase)
- 15 Sekunden ⇒ 50°C (Annealingphase)
- 4 Minuten ⇒ 60°C (Elongationsphase)

Zur Präzipitation der überschüssigen Nukleotidanaloga wurden die Kontroll- und Probenansätze mit je 50,0 µl Ethanol absolut versetzt und zentrifugiert (15 min; 13000 rpm).

Der Überstand wurde anschließend vorsichtig und vollständig abpipettiert und die Pellets luftgetrocknet. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung und Sequenzauswertung mit Hilfe des ABI Prism 377 DNA Sequencer.

2.9. Methodik des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)

Zur Untersuchung der Häufigkeitsverteilung von DNA-Sequenzpolymorphismen wurde die Methode des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus angewendet. Dabei wird die auf einen Sequenzpolymorphismus hin zu untersuchenende DNA durch eine Restriktionsendonuklease geschnitten. Wenn ein Polymorphismus im Bereich einer Enzymschnittstelle die normale Basensequenz ändert, kann es zum Verschwinden der Schnittstelle kommen. Andererseits ist auch die Entstehung einer neuen zusätzlichen Schnittstelle infolge eines Polymorphismus möglich. Demzufolge variiert auch die Anzahl bzw. Größe der entstandenen Fragmente nach Enzymverdau der DNA mit Polymorphismus im Vergleich zur Kontroll-DNA.

Die Restriktionsfragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und ermöglichen durch die unterschiedlichen Bandenmuster die einfache Differenzierung von Kontroll-DNA und DNA mit Sequenzpolymorphismus.

Die verwendeten Restriktionsenzyme waren:

- Msp1 (aus *Moxarella* Spezies) mit den Schnittstellen 5'...C[▼]CGG...3'
(New England Biolabs) 5'...GG[▼]CC...3'
- EcoR1 (aus *Escherichia coli* BS5) mit der Schnittstelle 5'...G[▼]AATTC...3'
(Boehringer Mannheim)

Für die Restriktionsenzymsschnitte wurden die unten aufgeführten Komponenten in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ansatz für Msp1-Schnitt:	PCR-Produkt	7,5 µl
	10 × NE-Puffer	2,0 µl
	Msp1 Enzym (20 U/ µl)	1,0 µl
	Aqua bidest.	ad 20 µl
Ansatz für EcoR1-Schnitt (Kontrolle der DNA-Klonierung)	Plasmid-DNA (siehe 2.7.)	5,0 µl
	React 3 Puffer	1,0 µl
	EcoR1 (10 U/µl)	1,0 µl
	Aqua bidest.	ad 15 µl

Zur Herstellung eines 2,5-3,0 %igen Agarosegels wurden 2,0-3,5 g Agarose und 10 ml 5 × TBE-Puffer mit Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt, zum Kochen gebracht und mit 4,0 µl Ethidiumbromid versetzt. Das weitere Verfahren zur Fertigstellung der Agarosegele entspricht dem schon Beschriebenen (siehe 2.4.).

Nach erfolgter Inkubation wurde der Restriktionsenzymansatz des Msp1-Schnittes mit 4,0 µl DNA-Loadingbuffer versetzt und in die Geltschen pipettiert. Vor der elektrophoretischen Auftrennung des EcoR1-Verdaus wurde zu diesem Ansatz 3,0 µl DNA-Loadingbuffer gegeben. Die Auftrennung erfolgte 5 Minuten lang bei 80 V und anschließend 30-60 Minuten lang bei 120 V. Als Längenstandard wurde pBR322 benutzt (vgl. 2.4.). Zur abschließenden Analyse wurden die Agarosegele unter der UV-Lampe fotografiert.

2.10. Statistische Analyse

Statistische Untersuchungen wurden mit dem StatView®-Programm auf Rechnern von Apple Macintosh durchgeführt.

Zum Vergleich der jeweiligen Allel- bzw. Genotyphäufigkeit in den Kollektiven unterschiedlichen Körpergewichts wurde der χ^2 -Test verwendet. Eine statistisch signifikant unterschiedliche Häufigkeit wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

C. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die kodierende Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors (Chromosom 10) auf mögliche genetische Varianten hin untersucht sowie deren Häufigkeitsverteilung in Kollektiven untergewichtiger, normalgewichtiger und adipöser Probanden bestimmt. Ergänzend wurde die Allelhäufigkeit eines bereits bekannten Polymorphismus in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors bei Probanden unterschiedlichen Körpergewichts analysiert. Abschließend wurden die gleichen Probandenkollektive auf eine Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors (Chromosom 2) hin untersucht.

1. Suche nach Varianten in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptor

1.1. SSCP-Analyse der PCR-Produkte

Zur Suche nach möglichen Varianten im Gen des α_{2A} -adrenergen Rezeptor wurde dessen gesamte kodierende Region in 6 überlappenden Abschnitten mittels PCR amplifiziert. In der folgenden Abbildung ist die Untersuchungsstrategie dieser Arbeit zusammengefasst. (Die Basensequenz der Oligonukleotidprimer wird in Abschnitt 2.3. beschrieben.)

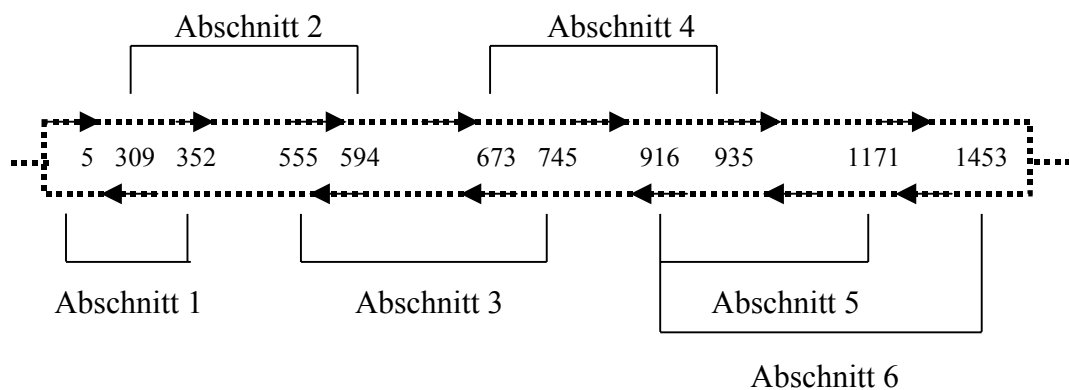


Abb. 2: Anordnung der PCR-Abschnitte des α_{2A} -adrenergen Rezeptors.

Die kodierende Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors wurde in 6 Abschnitten mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Die Zahlen entsprechen den Basenpositionen, die die Begrenzung des jeweiligen PCR-Fragmentes bilden.

Dabei wurden zunächst die DNA-Proben von Probandenkollektiven rekrutiert aus jeweils 48 adipösen, normalgewichtigen sowie untergewichtigen Erwachsenen verwendet.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe der unter 2.5. beschriebenen SSCP-Methode analysiert. In den Abschnitten 1, 2, 3, 5 und 6 wurden keine abweichenden Laufmuster in der SSCP-Analyse identifiziert. Im Abschnitt 4 des α_{2A} -adrenergen Rezeptors, der dem Bereich zwischen den Basenpaaren 673 und 935 entspricht, konnte bei einigen Probanden ein abweichendes Laufmuster detektiert werden.

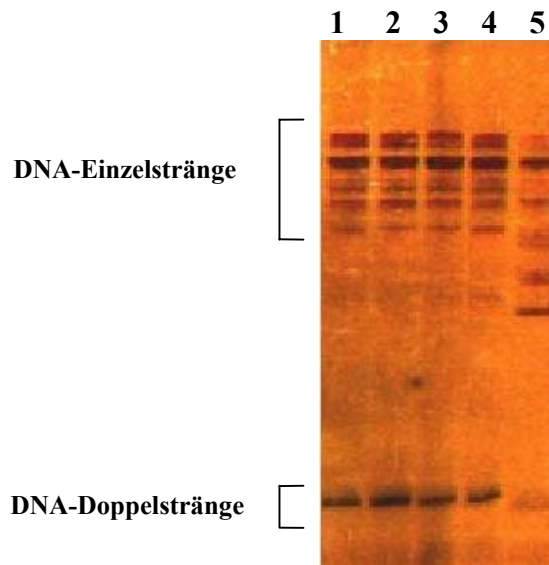


Abb. 3: SSCP-Analyse des Genabschnittes Nr. 4 des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Dargestellt sind SSCP-Bandenmuster der DNA verschiedener Probanden nach Silbernitratfärbung des Polyacrylamidgels. Es zeigen sich sowohl die DNA-Einzelstränge als auch die renaturierten Doppelstränge. Gleichzeitig sieht man in allen 5 Spuren, wie in der Praxis häufig zu finden, zusätzlich ein komplexeres Bandenmuster. Im Vergleich zu den identisch verlaufenden Spuren 1-4 zeigt sich in Spur 5 eine deutliche Verschiebung der SSCP-Banden.

1.2. Sequenzierung der PCR-Produkte mit abweichendem Laufmuster

Die PCR-Produkte, die in der SSCP-Analyse ein abweichendes Laufmuster zeigten, wurden mit Hilfe der in den Abschnitten 2.6.-2.8. beschriebenen Methoden sequenziert. Im Rahmen der Sequenzierung konnte, wie in Abb. 4 zu erkennen ist, eine Deletion von 18 Basenpaaren in Höhe von bp 816-834 (5'-GCG CTG CGC TCG GGG CCC-3') im Vergleich zur publizierten Wildtyp-Sequenz (Kobilka *et al.* 1987) identifiziert werden. Dieser Genabschnitt entspricht den Aminosäuren 255-260 (Pro-Glu-Arg-Ser-Ala-Gly) des α_{2A} -adrenergen Rezeptors. Die zur Kontrolle sequenzierten Proben der PCR-Produkte mit unauffälligem SSCP-Bandenmuster ergaben keine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz.

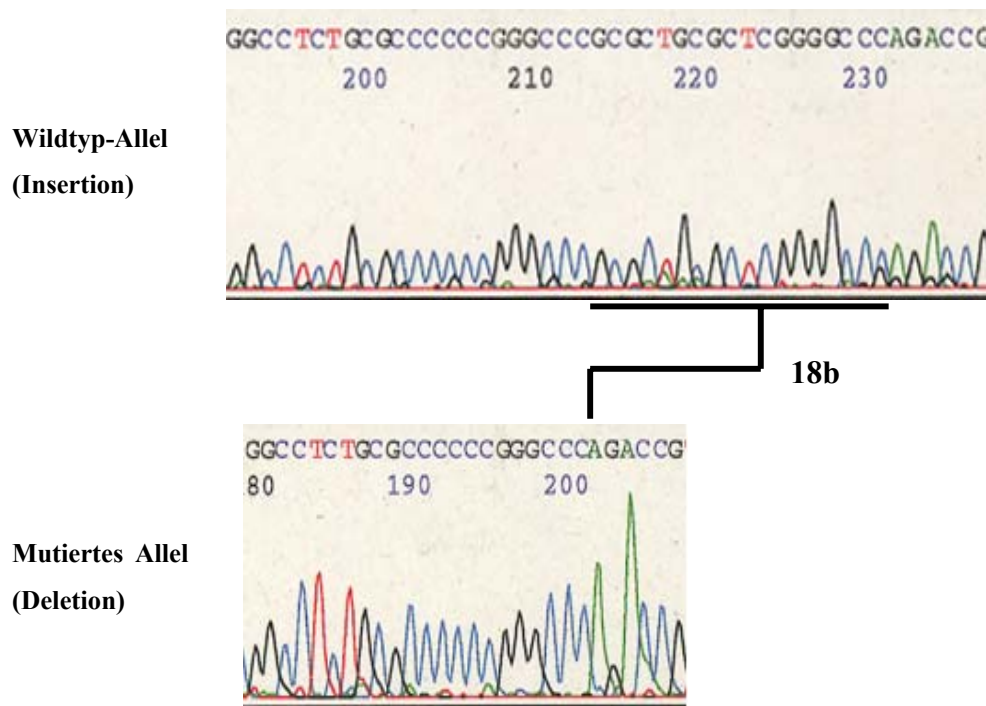


Abb. 4: Vergleich der Deletion zur Wildtyp-Sequenz des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Dargestellt sind untereinander die zur Kontrolle analysierte Wildtyp-Sequenz eines Probanden ohne genetische Variante sowie die identifizierte Deletion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors. Die bei der Deletion fehlenden 18 Basenpaare (5'-GCG CTG CGC TCG GGG CCC-3') entsprechen den Aminosäuren 255-260.

1.3. Häufigkeit der identifizierten Deletion

Es stellte sich heraus, daß bei den betroffenen Probanden die genetische Variante des α_{2A} -adrenergen Rezeptors mittels PCR-Amplifikation und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung detektierbar ist. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigten sich verschiedene Bandenmuster, entsprechend den Fragmentgrößen der DNA:

Homozygotie für das Wildtyp-Allel (Insertion): 263 bp

Heterozygotie: 263 bp, 245 bp

Homozygotie für das mutierte Allel (Deletion): 245 bp

Bei gleichzeitiger Auftragung eines Längenstandard-Markers stellten sich die Bandenmuster der gefärbten Agarosegele wie in Abb. 5 dar.

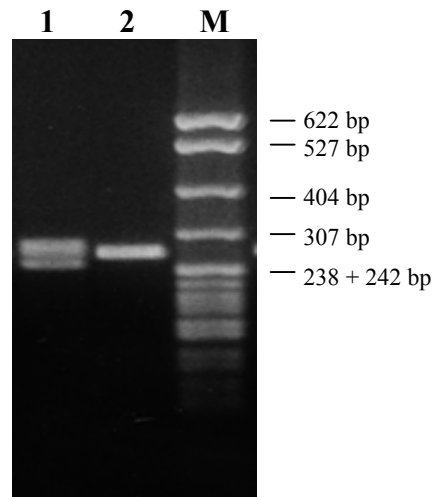


Abb. 5: Detektion der Deletion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors mittels PCR

Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des Abschnittes 4 des α_{2A} -adrenergen Rezeptors nach PCR. **M** entspricht dem Längenstandard-Marker pBR322-MspI-Verdau. In Spur 2 stellt sich die Einzelbande eines für den Wildtyp homozygot kodierenden Probanden in Höhe von 263 bp dar. Spur 1 zeigt die Probe eines für die Deletion heterozygot kodierenden Probanden: die zu erkennende Doppelbande in Höhe von 263 bzw. 245 bp entspricht dem Wildtyp-Allel bzw. dem mutierten Allel. Es ist auf den Gellauf zurückzuführen, daß die obere Bande in Spur 1 höher als die Bande in Spur 2 zu verlaufen scheint.

Die Analyse zur Prävalenz der Deletionsvariante des α_{2A} -adenergen Rezeptors wurde mit DNA von 195 adipösen Kindern und Jugendlichen, 48 adipösen Erwachsenen, 65 normalgewichtigen sowie 128 untergewichtigen Probanden durchgeführt.

Von den 426 genotypisierten Probanden kodierten 7 heterozygot für die Deletion (2 der 195 übergewichtigen Kinder und Jugendlichen, 3 der 128 untergewichtigen Probanden und 2 der 65 normalgewichtigen Probanden), während sich die Deletion bei keinem übergewichtigen Erwachsenen fand. Homozygot für die Deletion kodierte keiner der untersuchten Probanden.

	Allelhäufigkeit		Genotyphäufigkeit		
	Insertion	Deletion	I/I	I/D	D/D
Adipöse Kinder und Jugendliche ($n = 195$)	0,995	0,005	193 (99,0 %)	2 (1,0 %)	0 (0 %)
Adipöse Erwachsene ($n = 48$)	1,0	0,0	48 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Normalgewichtige Probanden ($n = 58$)	0,983	0,017	56 (96,5%)	2 (3,5 %)	0 (0 %)
Untergewichtige Probanden ($n = 128$)	0,988	0,012	125 (97,6 %)	3 (2,4 %)	0 (0 %)

(I = Insertion , D = Deletion)

Tab. 9: Häufigkeitsverteilung der Deletionsvariante des α_{2A} -adrenergen Rezeptors in verschiedenen Körpergewichtskategorien

Die Frage nach einem signifikanten Unterschied in der Allelhäufigkeit der Deletion zwischen den einzelnen Kollektiven unterschiedlichen Körpergewichtes wurde mit Hilfe des χ^2 - Test statistisch untersucht. Dabei ergaben sich die in Tab. 10 dargestellten p-Werte.

χ^2 -Test	
Adipöse Kinder/Jugendliche vs. normalgewichtige Probanden	p = 0,196
Adipöse Kinder/Jugendliche vs. untergewichtige Probanden	p = 0,350
Adipöse Erwachsene vs. normalgewichtige Probanden	p = 0,196
Adipöse Erwachsene vs. untergewichtige Probanden	p = 0,452

Tab. 10: Ergebnisse der Anwendung des χ^2 -Testes

Faßte man zusätzlich die adipösen Kinder/Jugendliche mit den adipösen Erwachsenen zu einem Kollektiv zusammen und verglich die daraus resultierenden Allelhäufigkeiten mit der Gruppe der Normal- bzw. Untergewichtigen ergaben sich p-Werte von 0,117 bzw. 0,229.

Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit der Deletion zwischen den Kollektiven unterschiedlichen Körpergewichtes.

1.4. Häufigkeit eines Polymorphismus in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Ein bereits bekannter C/G-Polymorphismus der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors an Position –1291 bp vor der Transkriptionsstartstelle wurde auf seine Häufigkeitsverteilung bei untergewichtigen, normalgewichtigen und adipösen Probanden hin untersucht. Dazu wurde ein 522 bp langes DNA-Fragment des Promoters zunächst mittels PCR amplifiziert. Der Polymorphismus konnte anschließend mit Hilfe der RFLP-Methode detektiert werden. Grundlage hierfür ist das Entstehen einer zusätzlichen Schnittstelle für das Restriktionsenzym Msp1 durch den Basenaustausch an Position –1291 bp, wie in Abb. 6 dargestellt.

<i>Wildtypsequenz</i>	<i>-1291-Polymorphismus</i>
---TCGGCCCCGA---	---TCGGCCCC G GA---
---AGCCGGGG G CT---	---AGCCGGGG C CT---
	↑
Keine Schnittstelle	Schnittstelle Msp1

Abb. 6: Prinzip der RFLP-Analyse der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors. Position –1291 ist fett markiert. Durch den C→G-Austausch an Position –1291 bp entsteht eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym Msp1, die die Wildtypsequenz nicht aufweist.

Nach dem Enzymverdau durch Msp1 entstehen beim Wildtyp DNA-Schnittfragmente mit Größen von 174, 165, 116, 62 und 5 bp. Durch die bei dem untersuchten Polymorphismus zusätzlich entstandene Schnittstelle wird das 174 bp-Fragment in zwei

weitere Fragmente von 121 bp sowie 53 bp Größe gespalten. Das mutante Allel weist nach gelektrophoretischer Auftrennung daher ein abweichendes Bandenmuster mit Fragmentgrößen von 165, 121, 116, 62, 53 und 5 bp auf.

Abb.7 verdeutlicht nochmals das nach Enzymverdau entstandene Bandenmuster.

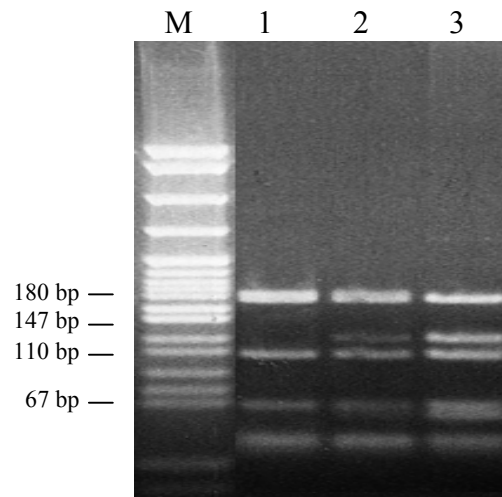


Abb. 7: Detektion des Polymorphismus der Promotorregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Die Abbildung zeigt das nach Restriktionsverdau entstandene Bandenmuster. **M** entspricht dem Längenstandard pBR322-Msp1-Verdau. In Spur **1** stellt sich die Probe eines homozygot für den Wildtyp kodierenden Probanden mit Fragmentgrößen von 174-165-116-62-5 bp dar. Die Banden in Höhe von 174 bp sowie 165 bp liegen nach gelektrophoretischer Auftrennung so nah beieinander, daß sie sich als eine breite Bande darstellen. Spur **3** zeigt die bei einem homozygot für das mutante Allel kodierenden Probanden entstandenen Fragmente. Es zeigen sich zusätzliche Banden in Höhe von 121bp sowie 53 bp. Das gleichzeitig fehlende Fragment in Höhe von 174bp kommt durch eine im Vergleich zur Spur 1 deutlich schmalere und tiefer verlaufende Bande zur Darstellung. Spur **2** entspricht der Probe eines heterozygot für den Polymorphismus kodierenden Probanden.

Es wurden insgesamt 107 adipöse Erwachsene, 60 Normalgewichtige und 118 Untergewichtige auf den C/G-Polymorphismus der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors untersucht (vgl. Tab.11).

	Allelhäufigkeit		Genotyphäufigkeit		
	C	G	C/C	C/G	G/G
Adipöse Erwachsene (<i>n</i> = 107)	0,776	0,224	65 (60,7 %)	36 (33,7 %)	6 (5,6 %)
Normalgewichtige Probanden (<i>n</i> = 60)	0,750	0,250	34 (56,7 %)	22 (36,7 %)	4 (6,6 %)
Untergewichtige Probanden (<i>n</i> = 118)	0,771	0,229	71 (60,2 %)	40 (33,9 %)	7 (5,9 %)

Tab. 11: Häufigkeitsverteilung des C/G-Polymorphismus in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Zur Untersuchung eines signifikanten Unterschiedes in der Allelhäufigkeit des Polymorphismus zwischen den einzelnen Kollektiven unterschiedlichen Körpergewichtes wurde auch hier der χ^2 -Test angewendet. Wie in Tab. 12 dargestellt, ergaben sich dabei keine Hinweise auf einen signifikanten Unterschied in der Allelhäufigkeit.

χ^2 -Test	
Adipöse vs. untergewichtige Probanden	p = 0,909
Adipöse vs. normalgewichtige Probanden	p = 0,594
Normalgewichtige vs. untergewichtige Probanden	p = 0,656

Tab. 12: Ergebnisse der Anwendung des χ^2 -Testes

2. Häufigkeit eines Polymorphismus im α_{2B} -adrenergen Rezeptor

Eine bereits bekannte Insertions-/Deletionsvariante im Gen des α_{2B} -adrenergen Rezeptors wurde auf ihre Häufigkeitsverteilung in einem Kollektiv aus untergewichtigen, normalgewichtigen sowie adipösen Probanden untersucht. Dazu wurde ein 104 bp langer Abschnitt des α_{2B} -adrenergen Rezeptors zwischen Bp 865 bis 959 mittels PCR amplifiziert. Durch anschließende gelelektrophoretische Auftrennung konnte die in diesem Abschnitt liegende Deletion von 9 bp detektiert werden.

Es zeigten sich folgende Bandenmuster, entsprechend den Fragmentgrößen der PCR-Produkte:

Homozygotie für das Wildtyp-Allel (Insertion): 104 bp

Heterozygotie: 104 bp, 95 bp

Homozygotie für das mutierte Allel (Deletion): 95 bp

Abb. 8 stellt die nach gelektrophoretischer Auftrennung entstandenen Bandenmuster dar.

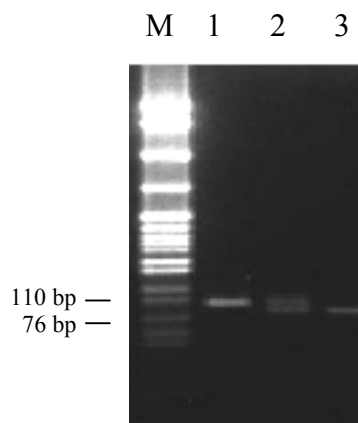


Abb. 8: Detektion der Insertions-/Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors mittels PCR
Die Abbildung zeigt die gelektrophoretische Auftrennung eines Abschnittes des α_{2B} -adrenergen Rezeptors nach PCR. **M** entspricht dem Längenstandard Marker pBR322-MspI-Verdau. In Spur **1** stellt sich die Einzelbande eines für den Wildtyp homozygot kodierenden Probanden in Höhe von 104 bp dar. Spur **3** zeigt die Bande eines homozygot für die Deletion kodierenden Probanden in Höhe von 95 bp. In Spur **2** laufen die PCR-Produkte eines heterozygoten Probanden: die zu erkennende Doppelbande in Höhe von 104 bp bzw. 95 bp entspricht dem Wildtyp-bzw. mutierten Allel.

Der Glu¹²/Glu⁹-Polymorphismus des α_{2B} -adrenergen Rezeptors wurde an einem Kollektiv aus 107 adipösen, 60 normalgewichtigen und 118 untergewichtigen Probanden auf ihre Häufigkeit untersucht. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tab. 13 dargestellt.

	Allelhäufigkeit		Genotyphäufigkeit		
	Insertion	Deletion	I/I	I/D	D/D
Adipöse Erwachsene ($n = 107$)	0,636	0,364	43 (40,2 %)	50 (46,7 %)	14 (13,1 %)
Normalgewichtige Probanden ($n = 60$)	0,700	0,300	28 (46,7 %)	28 (46,7 %)	4 (6,6 %)
Untergewichtige Probanden ($n = 118$)	0,593	0,407	42 (35,6 %)	56 (47,5 %)	20 (16,9 %)

I = Insertion, D = Deletion

Tab 13: Häufigkeitsverteilung der Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors in verschiedenen Körpergewichtskategorien

Zur Untersuchung eines signifikanten Unterschiedes in der Allelhäufigkeit der Deletion zwischen den einzelnen BMI-Kategorien wurde der χ^2 -Test angewendet. Dabei ergaben sich die in Tab. 14 aufgelisteten Ergebnisse.

χ^2 -Test	
Adipöse vs. untergewichtige Probanden	p = 0,358
Adipöse vs. normalgewichtige Probanden	p = 0,233
Normalgewichtige vs. untergewichtige Probanden	p = 0,049

Tab.14: Ergebnisse der Anwendung des χ^2 -Testes

Mit einem p-Wert von 0,049 fand sich dabei die Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors statistisch signifikant häufiger bei Untergewichtigen als bei Normalgewichtigen.

D. Diskussion

1. Genetik von Adipositas

Adipositas ist eine komplexe und polygenetische Erkrankung. Statt einem einfachen Mendel'schen Erbgang zu folgen, sind zahlreiche Gene bzw. Gendefekte an einer erhöhten Prädisposition für den adipösen Phänotyp beteiligt. Die Identifizierung von Genen, die an der Entstehung der menschlichen Adipositas beteiligt sind, wird durch multiple Gen-Umwelt- und Gen-Gen-Interaktionen erschwert. Es kann davon ausgegangen werden, daß eine einzelne genetische Variante dabei nur einen geringen Einfluß auf das Körpergewicht hat. Entsprechend dem Konzept der Suszeptibilitätsallele führt eine genetische Variante allein nicht zur Ausprägung von Adipositas, sondern erhöht lediglich die Prädisposition hierfür (Barsh *et al.* 2000). Übergewicht und Adipositas resultieren dann erst aus der Interaktion mit den Lebensbedingungen wie dem Fettgehalt der Nahrung und dem Ausmaß körperlicher Bewegung.

Im Rahmen der Adipositasforschung nimmt die Identifizierung solcher prädisponierender Gene, auch unter dem Hintergrund der Entwicklung pathogenetisch orientierter Therapieoptionen, einen wichtigen Stellenwert ein.

2. Untersuchung von Kandidatengenen

Die Untersuchung sogenannter Kandidatengene auf Polymorphismen stellt einen möglichen Ansatz zur Aufklärung der genetischen Grundlage der Adipositas dar. Zur Gruppe der Kandidatengene werden unter anderem solche Gene gezählt, deren Beteiligung an der Pathogenese des Übergewichts durch pharmakologische, biochemische, genetische und physiologische Überlegungen denkbar ist (Hebebrand *et al.* 1998). Dementsprechend kodiert ein Kandidatengen für ein Protein, das an der Regulation von Nahrungsaufnahme, Energieumsatz, der Speicherung überschüssiger Energie in Form von Fett oder anderen relevanten Mechanismen des Energiestoffwechsels beteiligt ist. Die Untersuchung eines Kandidatengens beinhaltet, wie in dieser Arbeit durchgeführt, zunächst die molekulargenetische Suche nach Polymorphismen in diesen Genen sowie die anschließende Klärung, ob die identifizierte genetische Variante mit einer bestimmten Körpergewichtskategorie assoziiert ist.

3. Untersuchte Kollektive

Für die Häufigkeitsuntersuchungen im Rahmen der Kandidatengenstudien wurde DNA von vier verschiedenen Probandenkollektiven eingesetzt. Während ein Kollektiv aus adipösen Erwachsenen rekrutiert wurde, bestand ein weiteres Kollektiv aus schwer adipösen Kindern und Jugendlichen. Adipositas im Kinder- und Jugendalter hat dabei eine hohe prädiktive Bedeutung für die Persistenz des überschüssigen Körpergewichts im Erwachsenenalter (Zwiauer 1998). In diesen beiden Kollektiven sollte eine Anreicherung von für die Adipositas prädisponierenden Allelen zu finden sein. Weiterhin wurde ein Kollektiv aus untergewichtigen jungen Erwachsenen gebildet, das im Gegensatz zu den beiden bisher genannten Gruppen mit Allelen angereichert sein dürfte, die der Adipositasentstehung entgegenwirken. Hier wurde, ebenso wie bei dem vierten Kollektiv aus normalgewichtigen Probanden, auf den Ausschluß von Eßstörungen, vermehrtem Nikotinkonsum und konsumierenden Erkrankungen Wert gelegt. Die Kollektive übergewichtiger Kinder und Jugendlicher bzw. untergewichtiger Probanden wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Hamann *et al.* 1998; Hamann *et al.* 1999). Bei der Rekrutierung aller Probandengruppen wurde auf den kaukasischen ethnischen Hintergrund geachtet, um die Möglichkeit falsch-positiver Befunde durch Unterschiede in der ethnischen Herkunft zu minimieren (Hebebrand *et al.* 1998).

4. Der α_{2A} -adrenerge Rezeptor als Kandidatengen

Das Protein des in dieser Arbeit auf Varianten hin untersuchte Gen des α_{2A} -adrenergen Rezeptors (Chromosom 10) hat vor allem durch seine antilipolytische Wirkung und die Hemmung der Thermogenese Einfluß auf die Fettspeicherung und die Energiebilanz des Menschen. In Fettzellen führt eine Aktivierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors durch Katecholamine über das G-Protein G_i zu einer Inhibierung der Adenylatzyklase und damit zu einer Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die cAMP-Konzentration innerhalb der Adipozyten reguliert die Aktivität der Proteinkinase A, die wiederum für die Aktivierung der Hormon-sensitiven Lipase und damit der Lipolyse verantwortlich ist (Lafontan und Berlan 1993; Lafontan und Berlan 1995). Theoretisch könnten Mutationen in der kodierenden Region des Rezeptors bei den betroffenen Individuen die antilipolytische Wirkung des Rezeptors abschwächen und damit der Triglyzeridspeicherung bzw. der Adipositasentstehung entgegenwirken. Auch über eine Modulation des systemischen Sympathikotonus könnten Polymorphismen des α_{2A} -

adrenergen Rezeptors das Körpergewicht beeinflussen und so möglicherweise zu Untergewicht prädisponieren. Genetische Varianten in der regulierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnten, je nach ihrem Effekt auf die Transkription sowohl zu Untergewicht als auch zu Adipositas prädisponieren.

4.1. Mutationsscreening der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors mittels SSCP

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte kodierende Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors in sechs überlappenden Fragmenten mit Hilfe von Primerpaaren amplifiziert und mittels SSCP bzw. Sequenzierung auf genetische Varianten hin untersucht. Die SSCP-Analyse von PCR-Produkten (PCR-SSCP) wurde bereits in zahlreichen Studien zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen eingesetzt. Sie gilt bei einer Sensitivität von 80 - 90 % als besonders schnelle und technisch zuverlässige Untersuchungsmethode (Hayashi 1991). Voraussetzungen für möglichst gute SSCP-Bedingungen und hohe Sensitivität sind die Größe der amplifizierten Fragmente und, im Falle der Analyse einer kodierenden Sequenz, eine ausreichende Entfernung der PCR-Primer vom 5'- bzw. 3'-Ende des Exons.

Es fand sich bei dem Mutationsscreening nur eine Variante, die sich in der anschließenden Sequenzierung als Deletion von 18 Basenpaaren darstellte. Insgesamt trat die Deletionsvariante in den untersuchten Kollektiven sehr selten auf. Von den 429 genotypisierten untergewichtigen, normalgewichtigen und adipösen Probanden kodierten lediglich 7 heterozygot für die Deletion. Eine Assoziation zu den unterschiedlichen Körpergewichtskategorien fand sich dabei nicht.

4.2. Häufigkeit eines C/G-Polymorphismus der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein bereits bekannter Polymorphismus in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors auf seine Häufigkeit in den einzelnen Körpergewichtskategorien untersucht. Dieser C/G-Polymorphismus an Position -1291 bp vor der Transkriptionsstartstelle (Lario *et al.* 1997) wurde mit Hilfe der RFLP-Methode detektiert. Dies ist eine bei korrekter Durchführung sehr sensitive und spezifische Methode. Die Durchführung des Restriktionsenzymverdaus erlaubte in der Mehrzahl der Fälle eine sofortige Genotypisierung. Bei nicht eindeutigen Befunden

wurde der Enzymverdau wiederholt. Im Rahmen dieser Arbeit wies der untersuchte Polymorphismus der Promoterregion keine Assoziation mit den unterschiedlichen Körpergewichtskategorien auf.

4.3. Mögliche funktionelle Relevanz der untersuchten Polymorphismen des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Der α_{2A} -adrenergen Rezeptor gehört zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die charakteristischerweise sieben transmembranöse Schleifen besitzen (Dohlmann *et al.* 1991; Strader *et al.* 1989). Die Bindungsstelle der Katecholamine liegt auf der Membranaußenseite in einer Tasche, die von den Transmembranhelices gebildet wird.

Die neuidentifizierte Deletionsvariante ist in der dritten intrazellulären Schleife des α_{2A} -adrenergen Rezeptors lokalisiert und führt zu einer Elimination der Aminosäuren Pro-Glu-Arg-Ser-Ala-Gly an Position 255-260. Es finden sich in der Literatur keine Daten, inwieweit diese veränderte Aminosäuresequenz die Struktur des Proteins beeinflusst und ob sich Auswirkungen auf die Rezeptorfunktion ergeben. Zur weitergehenden Bearbeitung solcher Fragestellungen wären vor allem Transfektionsexperimente mit vergleichenden Untersuchungen des nativen und mutierten Proteins geeignet.

Theoretisch denkbar wäre ein Einfluß der Deletionsvariante auf die G-Protein-Kopplung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors. Für einen anderen ebenfalls in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors lokalisierten Polymorphismus konnte in Studien bereits eine Auswirkung auf die G-Protein-Kopplung nachgewiesen werden. Dieser Polymorphismus, der einen Austausch der Aminosäuren Asn zu Lys an Position 251 bedingt, führte überraschenderweise zu einer signifikant erhöhten G-Protein-Kopplung durch Agonistenbindung. Der Lys-251-Polymorphismus bewirkte so eine verstärkte Inhibition der Adenylatzyklase im Vergleich zum Wildtyprezeptor (Small *et al.* 2000).

Weiterhin scheint die dritte intrazelluläre Schleife des α_{2A} -adrenergen Rezeptors, in der die neuidentifizierte Deletionsvariante lokalisiert ist, Einfluß auf die Stabilität des Rezeptors an der Zellmembran zu nehmen. Studien an mutierten α_{2A} -adrenergen Rezeptoren mit einer Deletionsvariante von 119 Aminosäuren in dieser Schleife wiesen eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verkürzte Lebensdauer an der Zelloberfläche auf (Keefer *et al.* 1994). Die Stabilität und Lebensdauer an der Oberfläche der Zelle ist wiederum ein wichtiger Einflußfaktor auf Sensitivität und Aktivierbarkeit der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In weiterführenden Studien konnte zwar ein entsprechender Einfluß auf die Rezeptorlebensdauer durch kleinere Deletionsvarianten (bis zu 20

Aminosäuren) nicht nachgewiesen werden (Edwards und Limbirds 1999). Da die Stabilisierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors auf der Zelloberfläche aber durch komplexe, bisher nicht vollständig verstandene Faktoren beeinflusst wird und die dritte intrazelluläre Schleife in der Regulation dieser Vorgänge eine zentrale Rolle spielt, könnte ein möglicher Einfluß der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Deletionsvariante auf Stabilität und Rezeptorlebensdauer erst durch weiterführende Experimente geklärt werden. Theoretisch ist ein Einfluß der Deletionsvariante auf Sensitivität und Aktivierbarkeit des Rezeptors sowie auf die G-Protein-Kopplung durchaus denkbar.

In Tierversuchen wiesen Mäuse mit kompletter Eliminierung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors nach homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems in Form einer Ruhetachykardie auf (Altman *et al.* 1999). Das Körpergewicht der Tiere war dabei trotz des erhöhten Sympathikotonus normal. Im Gegensatz hierzu stehen mehrere Studien, die belegen, daß ein erhöhter Sympathikotonus beim Menschen, experimentell erzeugt beispielsweise durch Adrenalin, Coffein oder Sibutramin, zu Gewichtsverlust führen kann (Astrup 1995; Stock 1997). Auch die Gabe von Yohimbin und anderen α_2 -Adrenozeptoren-Antagonisten zeigte bei Menschen, Hunden und anderen Säugetieren einen moderaten Einfluß auf das Körpergewicht, die Lipolyse und andere Aspekte des Energiehaushaltes (Lafontan und Berlan 1995). Theoretisch könnten Varianten in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors zu einem erhöhten Sympathikotonus führen und so vor Übergewicht schützen. Eine Mutation in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnte zusätzlich dessen eigentlich antilipolytische Wirkung abschwächen und über verringerte Fettspeicherung der Entstehung von Adipositas entgegenwirken. Legt man hier das Konzept der Suszeptibilitätsgene zugrunde, könnte der α_{2A} -adrenerge Rezeptor einem der multiplen genetischen Faktoren entsprechen, die einen Menschen zur Entwicklung von Adipositas oder Untergewicht prädisponieren. Dabei führt die genetische Prädisposition nur in Verbindung mit Umweltinteraktionen wie Ernährungsgewohnheiten oder körperlicher Aktivität zur Ausbildung des jeweiligen Phänotyps. Selbst das Vorhandensein einer ganzen Reihe von Hochrisikoallelen hätte ohne ein hinreichendes kalorisches Überangebot keinen großen Einfluß auf das Körpergewicht. Bei Vorhandensein einer positiven Energiebilanz wird der Effekt einer erhöhten genetischen Prädisposition allerdings amplifiziert (Barsh *et al.* 2000). Auf dem

Boden dieser Überlegungen wäre es vorstellbar, daß ein Defekt in der kodierenden Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptors die betroffenen Individuen in Situationen hyperkalorischer Ernährung vor überschüssiger Fettspeicherung schützt. Eine signifikante Assoziation zum Körpergewicht fand sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen allerdings nicht.

Interessanterweise fand sich in einer Studie zur Häufigkeitsverteilung eines anderen Polymorphismus des α_{2A} -adrenergen Rezeptors (RFLP-DraI) zwar keine Assoziation zum Körpergewicht, dafür aber zur Körperfettverteilung (Oppert *et al.* 1995). Mehrere Studien haben bereits über die regionalen Unterschiede der Lipolyserate in den einzelnen Fettdepots berichtet, die unter anderem auf eine unterschiedliche Dichteverteilung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors zurückzuführen sind (Kather *et al.* 1977; Mauriege *et al.* 1987; Wahrenberg *et al.* 1989). Adipozyten aus femoralen subkutanen Fettdepots zeigen eine geringere lipolytische Aktivität nach Adrenalinstimulation als Adipozyten aus abdominalen, viszeralen oder subkutanen Fettdepots. Auch hat Adrenalin im glutealen Fett bei Frauen einen geringeren lipolytischen Effekt als bei Männern. Passend hierzu ist im glutealen Fett von Frauen die Dichte der α_{2A} -adrenergen Rezeptoren höher als bei Männern, womit die höhere Neigung von Frauen zur Fettakkumulation in dieser Region zusammenhängen dürfte. Denkbar wäre, daß Varianten des α_{2A} -adrenergen Rezeptors einen bedeutenden und meßbaren Einfluß auf die Körperfettverteilung haben, sich dies jedoch nicht im Gesamtkörpergewicht bzw. BMI des einzelnen Individuums eindeutig widerspiegelt. Diese Arbeit beschränkte sich allerdings auf die Untersuchung einer möglichen Assoziation der genetischen Variante allein zur phänotypischen Ausprägung des Körpergewichts. Andere phänotypische Merkmale, wie zum Beispiel die Körperfettverteilung oder metabolische Parameter wurden bewußt nicht einbezogen, da dies im Rahmen einer korrekten statistischen Auswertung eine Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni nach sich ziehen würde. Durch den steigenden Schwellenwert würde die Chance für das Auffinden einer statistischen Signifikanz schwinden. Die aufgeführten Erklärungsversuche bleiben daher spekulativ.

Bislang fehlen Studien, die den Einfluß des C/G-Polymorphismus der Promoterregion auf die Expression und Rezeptordichte des α_{2A} -adrenergen Rezeptors genauer untersuchen. Vorhergehende Studien, die diesen Polymorphismus auf eine mögliche

Assoziation mit psychiatrischen Störungen untersuchten, fanden, wie in dieser Arbeit, keine signifikante Häufung in einem bestimmten Kollektiv (Ohara *et al.* 1998; Ohara *et al.* 2000). Ob dieser Polymorphismus Einfluß auf die Regulation des Körpergewichts nimmt, ist nach den bisherigen Ergebnissen, die dafür keinen Hinweis bieten, fraglich.

Inwieweit die Ergebnisse dieser Arbeit auch auf Gruppen anderer ethnischer Herkunft übertragbar sind, läßt sich nicht abschließend beurteilen. Da die rekrutierten Probanden alle kaukasischer Herkunft sind, kann die Möglichkeit, daß sich in anderen Populationen Assoziationen zwischen Varianten im α_{2A} -adrenergen Rezeptor und dem Körpergewicht aufzeigen lassen, nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit einen maßgeblichen Einfluß der genetischen Varianten des α_{2A} -adrenergen Rezeptors auf die interindividuellen Körpergewichtsunterschiede bei den untersuchten Kollektiv als eher unwahrscheinlich erscheinen.

5. Der α_{2B} -adrenerge Rezeptor als Kandidatengen

Auch der Subtyp B des α_2 -adrenergen Rezeptors (Chromosom 2) kann aufgrund physiologischer Überlegungen bei der Frage nach der Pathogenese der Adipositas zu den Kandidatengen gezählt werden. Studien weisen diesem Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Regulation des Vasotonus zu. Eine Aktivierung des α_{2B} -adrenergen Rezeptors führt zu einer Vasokonstriktion. Über die Regulation des Gefäßtonus stehen genetischen Varianten im Rezeptor damit verschiedene Wege offen, die Energiebilanz des Menschen und so sein Körpergewicht zu beeinflussen. Über eine Umverteilung des Blutflusses kann Einfluß auf die Durchblutung von metabolisch aktivem Gewebe und damit auf den Grundumsatz und die Energiebilanz genommen werden. Zusätzlich können Veränderungen im Gefäßtonus über reflexartige Modulationen das vegetative Nervensystem und den Sympathikotonus beeinflussen und dadurch Auswirkungen auf das Körpergewicht haben.

5.1. Häufigkeit einer Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors

In dieser Arbeit wurde ein Glu¹²/Glu⁹-Polymorphismus im Gen des α_{2B} -adrenergen Rezeptors (Baldwin *et al.* 1999; Heinonen *et al.* 1999) auf seine Häufigkeitsverteilung in dem Kollektiv aus untergewichtigen, normalgewichtigen und adipösen Probanden untersucht. Dazu wurde ein 104 bp langer Abschnitt des Rezeptors mittels PCR

amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und genotypisiert. Die Deletionsvariante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors trat signifikant häufiger bei Untergewichtigen als bei Normalgewichtigen auf.

5.2. Mögliche funktionelle Relevanz des Polymorphismus des α_{2B} -adrenergen Rezeptors

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus des α_{2B} -adrenergen Rezeptors führt zu einer Deletion von 3 Glutaminsäuremolekülen innerhalb eines Glutaminsäure-Repeat-Abschnitts und ist in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors lokalisiert (Baldwin *et al.* 1999; Heinonen *et al.* 1999). In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten (Small *et al.* 2001) findet sich die Variante in dem untersuchten Probandenkollektiv mit relativ hoher Allelhäufigkeit.

Entsprechend der Vorstellung, daß genetische Varianten des α_{2B} -adrenergen Rezeptors über die Regulation der Durchblutung von metabolisch aktivem Gewebe den Energieverbrauch des einzelnen verändern können, haben bereits mehrere Studien eine mögliche Assoziation zwischen der Deletionsvariante und dem Körpergewicht untersucht. In einer vorangegangenen Studie zeigten Probanden mit zwei kurzen Allelen (Glu⁹/Glu⁹) einen geringeren Grundumsatz im Vergleich zu Individuen mit zwei langen Allelen (Glu¹²/Glu¹²) (Heinonen *et al.* 1999). Auch die Gewichtszunahme im Verlauf von 5 Jahren war in einer weiteren Studie bei Probanden mit zwei kurzen Allelen höher als bei den anderen Genotypen (Sivenius *et al.* 2001). In der vorgelegten Arbeit findet sich jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit zwischen adipösen und normalgewichtigen Probanden. Stattdessen findet sich das Deletionsallel signifikant häufiger bei untergewichtigen Probanden.

Möglicherweise kann dies erklärt werden durch Resultate einer unlängst publizierten Studie zur Struktur- und Funktionsbeurteilung der Insertions-/Deletionsvariante (Small *et al.* 2001). Dort fand sich für α_{2B} -adrenerge Rezeptoren mit Deletion eine normale Bindung von Liganden nach Transfektion in CHO-bzw. COS-Zellen. Die Rezeptoren mit dem Polymorphismus zeigten jedoch eine verminderte Phosphorylierung und einen kompletten Verlust der durch Agonisten hervorgerrufenen Desensibilisierung. Die funktionelle Konsequenz der Deletionsvariante ist folglich eine Störung in der Modulation der Rezeptoraktivität, die sowohl mit einer Prädisposition für Übergewicht aber auch für Untergewicht in Einklang zu bringen wäre.

6. Ausblicke

Der Versuch, die genetischen Einflüsse der Adipositas zu klären, ist bei dieser multifaktoriell bedingten Erkrankung ein schwieriges Unterfangen. Die Kandidatengestudien nehmen dabei, wie an der Menge der in den letzten Jahren publizierten Veröffentlichungen ersichtlich, einen großen Raum ein. Obwohl sich nicht häufig Assoziationen zwischen untersuchten Genen und dem Phänotyp Körpergewicht fanden, bildet diese Untersuchungsmethode eine wertvolle Säule der Grundlagenforschung der Adipositas. Es besteht berechnigte Hoffnung, daß durch die intensive Forschung auf dem Gebiet der Adipositas in naher Zukunft neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Erkrankung gewonnen werden können. Über ein besseres Verständnis der Adipositas kann dann das eigentliche Ziel erreicht werden, das in der Entwicklung pathogenetisch orientierter Therapieoptionen für übergewichtige Menschen liegt. Am Ende könnte die Klassifizierung adipöser Patienten entsprechend genetischer Marker mit der Zuordnung zu einer bestimmten, den größtmöglichen Erfolg versprechenden Therapiestrategie stehen. Angesichts der bisher nicht befriedigenden Erfolge der Ernährungs- und Bewegungstherapie der Adipositas würde aus Erkenntnissen der pathophysiologischen und genetischen Grundlagen von Adipositas vor allem die Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieansätze im Mittelpunkt des Interesses stehen.

E. Zusammenfassung

Bei der Suche nach genetischen Faktoren, die bei der Regulation des Körpergewichtes beteiligt sind, ist der α_2 -adrenerge Rezeptor als ein relevantes Kandidatengen anzusehen. Der Subtyp A des α_2 -adrenergen Rezeptors bewirkt nicht nur eine Hemmung der Katecholamin-induzierten Lipolyse, sondern hat auch Einfluß auf die Thermogenese. Es ist denkbar, daß Mutationen in kodierenden Abschnitten des α_{2A} -adrenergen Rezeptors bei den betroffenen Individuen die über den Rezeptor vermittelte antilipolytische Wirkung abschwächen bzw. zu einer erhöhten Thermogeneserate führen. Theoretisch könnten genetische Varianten damit der Fettspeicherung bzw. Adipositasentstehung entgegenwirken. Polymorphismen in der Promoterregion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors könnten hingegen, je nach ihrem Einfluß auf die Transkription, sowohl zu Untergewicht als auch zu Adipositas prädisponieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte kodierende Region des α_{2A} -adrenergen Rezeptor-Gens auf Varianten untersucht. Es konnte eine Deletionsvariante identifiziert werden, die sich um das Fehlen von 18 bp von der publizierten Sequenz des α_{2A} -adrenergen Rezeptors unterscheidet. Die Deletionsvariante, die auf ihre Häufigkeit in Kollektiven verschiedener Körpergewichtskategorien untersucht wurde, fand sich insgesamt sehr selten. Eine Assoziation zu einer der unterschiedlichen Kategorien des Körpergewichts fand sich nicht. Die Prävalenz eines Polymorphismus in der Promoterregion des Gens zeigt ebenfalls keine Assoziation zum Körpergewicht. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit einen maßgeblichen Einfluß der Varianten im Gen des α_{2A} -adrenergen Rezeptors auf die interindividuellen Körpergewichtsunterschiede als eher unwahrscheinlich erscheinen.

Ergänzend wurde in dieser Arbeit ein Polymorphismus des Subtyp B des α_2 -adrenergen Rezeptors auf eine Assoziation zum Körpergewicht untersucht. Das auf Chromosom 2 lokalisierte Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Vasotonus. Genetische Varianten könnten über eine Umverteilung des Blutflusses Einfluß auf die Durchblutung von metabolisch aktivem Gewebe nehmen und damit den Grundumsatz beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit fand sich die Deletionsvariante signifikant häufiger bei Untergewichtigen als bei Normalgewichtigen. Dies scheint mit der Vorstellung vereinbar, daß die genetische Variante des α_{2B} -adrenergen Rezeptors über eine Negativierung der Energiebilanz der Fettspeicherung entgegenwirkt.

F. Literaturverzeichnis

Acheson KJ, Campbell IT, Edholm OG, Miller S, Stock MJ (1980): Measurement of food and energy intake in man- an evaluation of some techniques. *Am J Clin Nutr* 33: 1147-1154

Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB (1991): Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): a simple non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucl Acids Res* 19: 405-409

Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, Kobilka BK, Hein L (1999): Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56: 154-161

Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P, Bolinder J (1990): Adrenergic regulation of lipolysis in situ, at rest and during exercise. *J Clin Invest* 85: 893-898

Arner P (1999): Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *Int J of Obes Relat Metab Disord* 23_(Suppl.1): 10-13

Assmann G, Schulte H (1992): Obesity and hyperlipidemia: results of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study. In: Björntorp P, Brodorp BN (eds) *Obesity*. Lippincott, Philadelphia, pp. 502-511

Assmann G, Schulte H (1993): Results and conclusions of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study. In: Assmann G (ed) *Lipid metabolism disorders and coronary heart disease*. MMV, München, pp. 19-61

Astrup A, Andersen T, Henriksen O, Christensen NJ, Bulow J, Madsen J, Quaade F (1987): Impaired glucose-induced thermogenesis in skeletal muscle in obesity. The role of the sympathoadrenal system. *Int J Obes* 11: 51-66

Astrup A, Buemann B, Christensen N, Toubro S (1994): Failure to increase lipid oxidation in response to increasing dietary fat in formerly obese women. *Am J Physiol* 266: E592-E599

Astrup A (1995): The sympathetic nervous system as a target for intervention in obesity. *Int J Obes* 19 (Suppl. 7): S24-S28

Baldwin CT, Schwartz F, Baima J, Burzstyn M, DeStefano AL, Gavras I, Handy DE, Joost O, Martel T, Manolis A, Nicolaou M, Bresnahan M, Farrer L, Gavras H (1999): Identification of a polymorphic glutamic acid stretch in the alpha2B-adrenergic receptor and lack of linkage with essential hypertension. *Am J Hypertens* 12: 853-857

Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S (2000): Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404: 644-651

Bellach BM, Knopf H, Thefeld W (1998): Der Bundesgesundheitsurvey 1997/1998. *Das Gesundheitswesen* 60, (Sonderheft 2): 59-68

Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7: 1513-1523

Bjorntorp P (1993): Visceral obesity: a "civilisation syndrome". Obes Res 1: 206-222

Bogardus C, Lillioja S, Ravussin E, Abott W, Zawadski JK, Young A, Knowler WC, Jacobitz R, Moll PP (1986): Familial dependence of the resting metabolic rate. N Engl J Med 315: 96-100

Bouchard C, Perusse L, Leblanc C, Tremblay A, Theriault G (1988): Inheritance of the amount and distribution of human body fat. Int J Obes 12: 205-215

Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lepren PJ, Thériault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G (1990): The response to long-term overfeeding in identical twins. N Engl J Med 322: 1477- 1482

Bouillaud F, Villaroya F, Hentz E, Raimbault S, Cassard AM, Ricquier D (1988): Detection of brown adipose tissue uncoupling protein mRNA in adult patients by a human genomic probe. Clin Sci 75: 21-27

Bylund DB (1988): Subtypes of alpha2-adrenoceptors. Pharmacological and molecular biological evidence converge. Trends Pharmacol Sci 9: 356-361

Castan I, Devedjian JC, Valet P, Paris H, Lafontan M (1995): Human adipocytes express alpha2-adrenergic receptor of the alpha2A-subtype only: pharmacological and genetic evidence. Fundam Clin Pharmacol 9: 569-575

Chan JM, Stampfer MJ, Rimm EB, Willett WC, Colditz GA (1994): Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. Diabetes Care 17: 961-969

Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Fraguier P, Guy-Grand B (1998): A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature 392: 398-401

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci 69: 2110-2114

Colditz GA (1992): The economic cost of obesity. Am J Clin Nutr 55: 501-513

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE (1995): Weight gain as a risk factor for clinical diabetes in women. Ann Intern Med 122: 481-486

Cotton RGH (1993): Current methods of mutation detection. Mutat Res 285: 125-144

Dietz WH (1992): Genetic syndromes. In: Björntorp P, Brodoff BN (eds) Obesity. Lipincott, Philadelphia, pp. 589-593

- DiGirolamo, Harp J, Stevens J (2000): Obesity: Definition and epidemiology. In: Lockwood DH, Heffner TG (eds) Obesity: Pathology and therapy. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp.: 5-6
- Dionne IJ, Turner AN, Tchernof A, Pollin TI, Avrithi D, Gray D, Shuldiner AR, Poelman ET (2001): Identification of an interactive effect of β_3 - and α_{2B} -Adrenoceptor gene polymorphisms on fat mass in caucasian women. Diabetes 50: 91-95
- Dohlmann HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991): Model systems for the study of signal-transducing GTP-binding proteins. Annu Rev Biochem 60: 653-688
- Edwards SW, Limbirds LE (1999): Role for the third intracellular loop in cell surface stabilization of the α_{2A} -adrenergic receptor. J Biol Chem 274: 16331-16336
- Fabsitz RR, Carmelli D, Hewitt JK (1992): Evidence for independent genetic influences on obesity in middle age. Int J Obes 16: 675-666
- Filichkin S, Gelvin S (1992): Effect of dimethylsulfoxide concentration on specificity of primer matching in PCR. Biotechniques 12: 828-830
- Filipiak H, Schneller H, Döring A (1993): Monica-Projekt Augsburg, GSF-Bericht 1993, GSF-Forschungszentrum
- Griffith M, Payne PR, Stunkard AJ, Rivers JPW, Cox M (1990): Metabolic rate and physical development in children at risk of obesity. Lancet 336: 76-77
- Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS (1993): Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. Nature 366: 740-742
- Hamann A, Matthaei S (1995): Braunes Fettgewebe und Adipositas. Diabetes Stoffwechsel 4: 321-326
- Hamann A, Flier JS, Lowell BB (1996): Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. Endocrinology 137: 21-29
- Hamann A, Matthaei S (1996): Regulation of energy balance by leptin. Exp Clin Endocrinol Diabetes 104: 293-300
- Hamann A, Busing B, Kausch C, Ertl J, Preibisch G, Greten H, Matthaei S (1997): Chronic leptin treatment does not prevent the development of obesity in transgenic mice with brown fat deficiency. Diabetologia 40: 810-815
- Hamann A, Tafel J, Busing B, Munzberg H, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Ricquier D, Greten H, Hebebrand J, Matthaei S (1998): Analysis of the uncoupling protein-1 (UCP 1) gene in obese and lean subjects: identification of four amino acid variants. Int J Obes Relat Metab Disord 22: 939-941

Hamann A, Munzberg H, Buttron P, Busing B, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Hebebrand J, Greten H (1999): Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated-receptor-gamma 2 gene in lean and obese subjects. *Eur J Endocrinol* 141: 90-92

Hamann A, Brieske C, Tafel J, Buttron P, Schwarzloh B, Münzberg H, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Hebebrand J, Greten H, Algenstaedt P, Ziegler R (2001): Identification of a deletion variant in the gene encoding the human α_{2A} -adrenergic receptor. *Eur J Endocrinol* 144: 291-295

Hamann A, Münzberg H, Tafel J, Ziegler R (2001): Manche mögens heiß: Bedeutung der Thermogenese für den Energiestoffwechsel und die Therapie von Adipositas. *Dtsch Med Wschr* 126: 241-246

Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580

Hayashi K (1991): PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1: 34-38

Hebebrand J, Remschmidt H (1995): Übergewicht: Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Med Klin* 90: 403-410

Hebebrand J, Hinney A, Roth H, Ziegler A.(1998). Genetische Aspekte der Adipositas. In: Wechsler JG (Hrsg). *Adipositas*. Blackwell Berlin Wien, S. 105-117

Hein L, Altman JD, Kobilka BK (1999): Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402: 181-184

Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M, Valve R, Uusitupa M, Scheinin M (1999): Identification of a three-amino acid deletion in the α_{2B} -adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. *J Endocrin & Metabolism* 84: 2429-2433

Himms-Hagen J (1989): Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog Lipid Res* 28: 67-115

Hoffmeister H, Mensink GB, Stolzenberg H (1994): National trends in risk factors for cardiovascular disease in Germany. *Prev Med* 23: 197-205

Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, Tomson AJ, DaRooge MA, Fisher BE, Mauricio J, Klundt I (1964): Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. Some substituted 3-indolyl- D-glycopyranosides. *J Med Chem* 7: 574

Jequier E, Schutz Y (1988): Energy expenditure in obesity and diabetes. *Diabetes Metab Rev* 4: 583-593

Jung RT (1997): Obesity as a disease. *Br Med Bull* 53: 302-321

Kather H, Zollig K, Simon B, Schlierf G (1977): Human fat cell adenylate cyclase: regional differences in adrenaline responsiveness. *Eur J Clin Invest* 7: 595-597

- Keefer JR, Kennedy ME, Limbird LE (1994): Unique structural features important for stabilization versus polarization of the α_2A -adrenergic receptor on the basolateral membrane of the Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 269: 16425-16430
- Kennedy DB, Homant RJ (1984): Personnel managers and the stigmatized employee. *J Employment Couns* 21: 89-94
- Kissebah AH, Videlund N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK (1982): Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Endocrinol Metab* 54: 254-260
- Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U, Lefkowitz RJ, Caron MG (1987): An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329: 75-79
- Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW (1987): Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *Science* 238: 650-656
- Kwok S, Higuchi R (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238
- Lafontan M, Berlan M, Galitzky J, Montastruc JL (1992): α_2 -adrenoceptors in lipolysis: α_2 -antagonists and lipid-mobilizing strategies. *Am J Clin Nutr* 55: 219S-227S
- Lafontan M, Berlan M (1993): Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34: 1057-1091
- Lafontan M, Berlan M (1995): Fat cell α_2 -adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocrine Rev* 16: 716-738
- Lafontan M, Barbe P, Galitzky J, Tavernier G, Langin D, Carpenne C (1997): Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Human Reprod* 12 (Suppl. 1): 6-20
- Landsberg L, Young JB (1985): The influence of diet on the sympathetic nervous system. In: Müller EE, MacLeod RM, Frohman LA (eds) *Neuroendocrine perspectives*. Elsevier, Amsterdam, pp. 191-218
- Lario S, Calls J, Cases A, Oriola J, Torras A & Rivera F (1997): MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the α_2A -adrenergic receptor gene. *Clin Genet* 51:129-130
- Levine JA, Eberhardt NL, Jensen MD (1999): Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gains in humans. *Science* 283: 212-214
- Lew EA, Garfinkel L (1979): Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. *J Chronic Dis* 32: 677-685
- Limbird LE (1988): Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: Additional signaling mechanisms. *FASEB J* 2: 2686-2695

Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS, Kobilka BK (1996): Cardiovascular regulation in mice lacking $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 273: 803-805

Lissner L, Levitsky DA, Strupp BJ, Kackwarf H, Roe DA (1987): Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects. *Am J Clin Nutr* 46: 886- 892

Lockette W, Ghosh S, Farrow S, MacKenzie S, Baker S, Miles P, Schork A, Cadaret L (1995): Alpha 2-adrenergic receptor gene polymorphism and hypertension in blacks. *Am J Hypertens* 8: 390-394

Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990): Expansion of the alpha-2-adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha-2-adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5094-5098

Lowell BB, Spiegelman BM (2000): Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-660

MacDonald A, Stunkard A (1990): Body-mass indexes of British separated twins. *N Engl J Med* 322:1530

Mandel M, Higa A (1970): Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162

Manson JE, Willett JC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Speizer FE (1995): Body weight and mortality among women. *N Engl J Med* 333: 677-685

Mauriege P, Galetzky J, Berlan M, Lafontan M (1987): Heterogenous distribution of beta and alpha-2 adrenergic binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur J Clin Invest* 17: 156-165

Mauriege P, Despres JP, Prud'Homme D, Pouliot MC, Marcotte M, Tremblay A, Bouchard C (1991): Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J Lipid Res* 32: 1625-1633

Mauriege P, Despres JP, Moorjani S, Prud'Homme D, Lamarche B, Bouchard C, Nadeau A, Tremblay A, Lupien PJ (1993): Abdominal and femoral adipose tissue lipolysis and cardiovascular disease risk factors in men. *Eur J Clin Invest* 23: 729-740

Mauriege P, Prud'Homme D, Lemieux S, Tremblay A, Despres JP (1995): Regional differences in adipose tissue lipolysis from lean and obese women: existence of postreceptor alterations. *Am J Physiol* 269: E341-E350

Michael MC, Plogmann C, Philipp T, Brodde OE (1999): Functional correlates of alpha(2A)-adrenoceptor gene polymorphism in the HANE study. *Nephrol Dial Transplant* 14: 2657-2663

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hust JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997): Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908

Mullis KB, Faloona F (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

Neel JV (1962): A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14: 353-362

Ohara K, Nagai M, Tani K, Tsukamoto T & Suzuki Y (1998): Polymorphism in the promoter region in the alpha (2A)-adrenergic receptor gene and mood disorders. *Neuroreport* 9: 1291-1294

Ohara K, Suzuki Y, Ochiai M & Terada H (2000): Polymorphism in the promoter region of the alpha (2A)-adrenergic receptor gene and panic disorders. *Psychiatry Res* 93: 79-82

Oppert JM, Tourville J, Chagnon M, Mauriege P, Dionne FT, Perusse L, Bouchard C (1995): DNA polymorphisms in the alpha2- and beta2-adrenoceptor genes and regional fat distribution in humans: association and linkage studies. *Obes Res* 3: 249-255

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989a): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2766-2770

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayasi K (1989b): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879

Peterson HR, Rothschild M, Weinberg CR, Fell RD, McLeish KR, Pfeifer MA (1988): Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N Engl J Med* 318: 1077-1083

Porter RK, Brand MD (1993): Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature* 362: 628-630

Prentice AM, Black AE, Coward WA, Davies HL, Goldberg GR, Murgatroyd PR, Ashford J, Sawyer M, Whitehead RG (1986): High levels of energy expenditure of obese women. *Br Med J* 292: 983-987

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341

Pudel V, Westenhöfer J (1992): *Ernährungspsychologie*. Hogrefe, Göttingen

Pudel V (1997): Psychosoziale Aspekte der Adipositas. In: Huth K, Pudel V (Hrsg): *Sozioökonomische Bedeutung der Adipositas*. Lingua-Med, Neu-Isenburg, S.45

Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WC, Boyce V, Howard BV, Bogardus C (1988): Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body weight gain. *N Engl J Med* 318: 467-472

Ravussin E, Swinburn BA (1993): Energy metabolism. In: Stunkard AJ, Wadden TA (eds) *Obesity: theory and therapy*. Raven, New York, pp. 97-123

Reaven GM (1988): Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607

Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK (1988): Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α 2-adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6301-6305

Roberts SB, Savage J, Coward WA, Chew B, Lucas A (1988): Energy expenditure and intake in infants born to lean and overweight mothers. *N Engl J Med* 318: 461-466

Roe DA, Eickworth WR (1976): Relationship between obesity and associated health factors with unemployment among low income women. *JAMA Women's Association* 31: 193-204

Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon SL, Khan, SH, Menchen SM, Heiner CR, Chen SM (1997): New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing pattern. *Nucl Acids Res* 25: 4500-4504

Rutherford J, McGuffin P, Katz RJ, Murray RM (1993): Genetic influences on eating attitudes in a normal female twin population. *Psychol Med* 23: 425-436

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 350-354

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

Scherzinger C, Bourke M, Ladd C, Lee H (1997): DNA Extraction from Liquid Blood using QIAamp. *J Forensic Sci* 42: 893-896

Schutz Y (1998): Der Energiestoffwechsel von Patienten mit Adipositas. In: Wechsler JG, (Hrsg) *Adipositas*. Blackwell, Berlin Wien, S. 93-103

Segal KR, Gutin B (1983): Thermic effects of food and exercise in lean and obese women. *Metabolism* 32: 581-589

Segal KR, Gutin B, Nyman AM, Pi-Sunyer FX (1985a): Thermic effect of food at rest, during exercise, and after exercise in lean and obese men of similar body weight. *J Clin Invest* 76: 1107-1112

Segal KR, Gutin B, Presta E, Wang J, Itallie TB (1985b): Estimation of human body composition by electrical impedance methods: a comparative study. *J Apply Physiol* 58: 1565-1571

Segal KR (1994): Impact of exercise on insulin mediated glucose metabolism in lean and obese men. *Int J Obes* 18 (Suppl 2): 96 (abstract)

Seidell JC, Flegal KM (1997): Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull* 53: 238-252

Selby JV, Newman B, Quesenberry CP, Fabsitz RR, Carmelli D, Meaney FJ, Slemenda C (1990): Genetic and behavioral influences on body fat distribution. *Int J Obes* 14: 593-602

Sivenius K, Lindi V, Niskanen L, Laakso M, Usuitupa M (2001): Effect of a three-amino acid deletion in the α_2B -adrenergic receptor gene on long-term body weight change in Finnish non-diabetic and type 2 diabetic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1609-1614

Small KM, Forbes SL, Brown KM, Liggett SB (2000): An Asn to Lys polymorphism in the third intracellular loop of the human α_{2A} -adrenergic receptor imparts enhanced agonist-promoted G_i coupling. *J Biol Chem* 275: 38518-38523

Small KM, Brown KM, Forbes SL, Liggett SB (2001): Polymorphic deletion of three acidic residues of the α_2B -adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. *J Biol Chem* 276: 4917-4922

Soerensen TIA, Holst C, Stunkard AJ, Stovgaard LT (1992): Correlations of body mass index of adult adoptees and their biological and adoptive relatives. *Int J Obes* 16: 227-236

Spraul M, Ravussin E, Fontvieille AM, Rising R, Larson DE, Anderson EA (1993): Reduced sympathetic nervous activity. A potential mechanism predisposing to body weight gain. *J Clin Invest* 92: 1730-1735

Staffierie JR (1967): A study of social stereotype of body image in children. *J Psych Soc Pers* 7: 101-104

Stock MJ (1997): Sibutramine: a review of the pharmacology of a novel anti-obesity agent. *Int J Obes Rel Metab Disord* 21 (Suppl.1): S25-S29

Strader CD, Sigal IS, Dixon RAF (1989): Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 3: 1825-1832

Stunkard AJ, Sørensen TIA, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schelsinger F (1986): An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 314: 193-198

Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen VL, McClearn GE (1990): The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322: 1483-1487

Sugano K, Kyogoku A, Fukayama N, Ohkura H, Shimosato Y, Sekiya T, Hayashi K (1993): Rapid and simple detection of c-Ki-ras2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Laboratory Investigation* 68: 361-366

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpeper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ (1995): Identification and expression cloning of a human leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271

Ullmann A, Jacob F, Monod J (1967): Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J.Mol. Biol.* 24: 339-343

Wahrenberg H, Lonnqvist F, Arner P (1989): Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84: 458-467

WHO report obesity (1998): Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. World Health Organization, Geneva

Willet WC, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1995): Weight, weight change and coronary heart disease in women. *JAMA* 273: 461-466

Wirth A (2000): Adipositas: Epidemiologie, Ätiologie, Folgekrankheiten, Therapie. 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York

Wooley OK, Wooley SC, Dyrenforth SR (1979): Obesity and Women II: A neglected topic. *Women's Studies International Quarterly* 2: 81-92

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432

Zurlo F, Ferraro R, Fontvieille AM, Rising R, Bogardus C, Ravussin E (1992): Spontaneous physical activity and obesity: cross-sectional and longitudinal studies in Pima Indians. *Am J Physiol* 263: E296-E300

Zwiauer A (1998): Adipositas im Kinder-und Jugendalter- Prävention und Therapie. In: Wechsler JG (Hrsg) Blackwell, Berlin Wien, S. 181-198

G. Anhang

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Greten, Direktor der Medizinischen Kernklinik, sowie bei Herrn Prof. Dr. med. F. U. Beil, Leiter der Medizinischen Poliklinik, für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit und für die mir gewährte Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Andreas Hamann, der mir als Betreuer hilfsbereit zur Seite stand und mich an das wissenschaftliche Arbeiten heranführte. Er war während der vergangenen Jahre mein ständiger Ansprechpartner für alle Fragen und Probleme. Seine wertvollen Anregungen und Tips, die dank moderner Kommunikationsmedien jeglichen Städtegrenzen trotzten, trugen sehr zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Für die außerordentlich freundliche und kompetente Unterstützung im Labor möchte ich Frau Britta Schwarzloh danken. Ihre Erfahrung und ermunternden Ratschläge waren einer der Gründe dafür, daß sich das Kennenlernen der „Laborgeheimnisse und Gepflogenheiten“ zu einem anregenden Exkurs entwickelte.

Ebenso richtet sich mein Dank an Frau Dr. rer. nat. Heike Münzberg, die bei schwierigen Fragen stets eine Antwort fand.

Bedanken möchte ich auch bei meinem „Mit-Doktoranden“ Philip Buttron. Die Zusammenarbeit empfand ich als sehr kooperativ und bereitete mir viel Freude.

Schließlich möchte ich mich bei den Optifast Zentren der Hamburger Krankenhäuser Bethanien, Groß Sand und Wandsbek bedanken, die durch ihre bereitwillige Kooperation diese Arbeit erst ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Claudia Brieske
Geburtsdatum/-ort	16.11.1974/ Bremen
Familienstand	ledig
Eltern	Rembert Brieske, Rechtsanwalt Hildegard Brieske, Lehrerin

Schulausbildung:

1981-1985	Grundschule in der Vahr, Bremen
1985-1991	Sekundarstufe I/ Schulzentrum Sebaldsbrück, Bremen
1991-1992	Davis High School, Kaysville, Utah, (USA)
1992-1994	Gymnasium an der Kurt-Schumacher-Allee, Bremen Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschullaufbahn:

Oktober 1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
September 1996	Physikum
September 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1997	Beginn der Untersuchung zu der vorliegenden Arbeit
April 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Beginn des Praktischen Jahres: Concord Hospital, Sydney, Australien (Chirurgie) AK St. Georg, Hamburg (Chirurgie) AK Wandsbek, Hamburg (Innere Medizin) AK Barmbek, Hamburg (Neurologie)
Mai 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Vorläufige Approbation

Ärztliche Tätigkeit:

September 2001	Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Abteilung des AK Eilbek, Hamburg (Direktor: Prof. Dr. med. H. Heidemann)
----------------	---

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.