

Aus der Abteilung für Molekulare Zellbiologie
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. Ulrike Beisiegel

Assoziationen des A→G Polymorphismus
im Gen des Uncoupling Protein 1
mit Adipositas in der deutschen Bevölkerung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Gesa Hagemann
aus Kiel
Hamburg, 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Die Adipositas.....	3
1.2.1	Epidemiologie	3
1.2.2	Krankheitswert	5
1.2.3	Regulation des Körpergewichts	6
1.2.4	Genetik der Adipositas	8
1.3	Das Uncoupling Protein 1	11
1.3.1	Die Familie der Entkopplungsproteine	12
1.3.2	Funktionsweise des UCP1.....	12
1.3.3	Regulation von UCP1	14
1.3.4	Die Thermogenese im braunen Fettgewebe und Adipositas.....	14
1.3.5	Der A→G Polymorphismus im UCP1 Gen	17
1.4	Fragestellung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Patientengut.....	19
2.1.1	Adipositas Kollektiv.....	20
2.1.2	Patienten aus der Medizinischen Klinik.....	22
2.1.3	Blutspender	23
2.1.4	Vergleich der Kollektive	24
2.2	Bestimmung des UCP1 Genotyps.....	24
2.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Blut.....	26
2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	27
2.2.3	Restriktionsverdau mit Bcl 1	31
2.2.4	Gel-Elektrophorese	32
2.2.5	Gelfärbemethoden	33
2.3	Statistische Berechnungen	36

3	Ergebnisse	38
3.1	Verteilung des UCP1 Genotyps im Gesamtkollektiv	38
3.1.1	UCP1 Genotypverteilung bei Männern und Frauen.....	39
3.1.2	Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz	39
3.1.3	Assoziationen des UCP1 Genotyps mit klinischen Daten	40
3.2	Analyse der Patientenkollektive.....	42
3.2.1	Eignung der Kontrollgruppe	43
3.2.2	Vergleich der Allelfrequenzen in sechs Kollektiven.....	45
3.3	UCP1 Genotyp und BMI.....	47
3.3.1	Allelfrequenzen nach BMI-Kategorien.....	48
3.3.2	Klinische Werte von Adipösen, Normalgewichtigen und Blutspendern ...	50
3.3.3	Zusammenhang von BMI und Alter bei UCP1 Genotyp	54
3.4	UCP1 Genotyp und Stoffwechselkrankheiten	61
3.4.1	UCP1 Genotyp und Lipidstoffwechsel	61
3.4.2	UCP1 Genotyp und Diabetes mellitus Typ 2	65
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	66
4	Diskussion.....	68
4.1	Allelfrequenzen	68
4.2	Assoziationen mit dem BMI	70
4.3	Assoziationen mit Stoffwechselkrankheiten	76
4.4	Ausblick	78
5	Zusammenfassung	80
	Literaturverzeichnis	81
	Anhänge.....	91
	Anhang A Materialien	91
	Anhang B Abkürzungen	94

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen dem A→G Polymorphismus in der Promotorregion des Uncoupling Protein 1 (UCP1) Gens und Stoffwechselveränderungen wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Dyslipidämien zu untersuchen. Diese Studie liefert einen Beitrag zur Erforschung der genetischen Faktoren, die mit der Entstehung von Adipositas assoziiert sind.

Übergewicht entsteht, wenn Energieaufnahme und Energieverbrauch nicht im Gleichgewicht sind. Ein niedriger Energieverbrauch ist mit einem höheren Risiko der Gewichtszunahme verbunden und teilweise genetisch bedingt. Einen Anteil am Energieverbrauch hat die zitterfreie Thermogenese im braunen Fettgewebe. Im Tierversuch zeigte sich, daß ein Mangel an braunem Fettgewebe bei genetisch veränderten Mäusen zu Adipositas führt. Die Bedeutung des braunen Fettgewebes für den Menschen wird kontrovers diskutiert.

Das Schlüsselmolekül für die Thermogenese im braunen Fettgewebe ist das UCP1, welches Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportiert und dabei Atmungskette und oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Die Energie aus der Oxidation der Nährstoffe wird bei Aktivität von UCP1 nicht in Form von ATP gespeichert, sondern in Wärme umgewandelt. Dieser Mechanismus ist in Anwesenheit von freien Fettsäuren aktiviert und hormonell reguliert. Durch Erhöhung des Energieverbrauchs könnte UCP1 der Entstehung von Adipositas entgegenwirken. Aufgrund dieser Eigenschaften wird das UCP1 Gen als Kandidatengen eingestuft. Variationen der Gensequenz könnten durch veränderte Regulation oder eingeschränkte Funktion von UCP1 die Entstehung von Übergewicht fördern.

Ein Zusammenhang zwischen Kandidatengen und Krankheit wird angenommen, wenn Mutationen des in Frage kommenden Gens bei betroffenen Personen häufiger auftreten als bei gesunden Personen. Eine Mutation wird als Polymorphismus bezeichnet, wenn die Varianten (Allele) mit einer Häufigkeit von über 0,01 in der Bevölkerung vorkommen. Für das UCP1 Gen ist ein Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) mit einer Basensubstitution (A→G) in der Promotorregion bekannt. Da der Promotor die Transkription eines Gens startet, kann eine Mutation in dieser Region zur Änderung der Genexpression führen.

Einige Populationsstudien zum A→G Polymorphismus im UCP1 Gen zeigten, daß das G Allel mit einer erhöhten Fähigkeit zu Gewichtszunahme und mit einer geringeren Gewichtsabnahme während einer kalorienreduzierten Diät einhergeht. Zudem wurde eine Reduktion der UCP1 Gen Expression durch das seltenere Allel G beschrieben. Andere Arbeitsgruppen stellten hingegen keinen Unterschied zwischen den Genotypen fest.

Aufgrund der ungeklärten Frage der Bedeutung des UCP1 Polymorphismus in der deutschen Bevölkerung und des Fehlens von entsprechenden Untersuchungen mit großem Stichprobenumfang, wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt. Das Studienkollektiv bestand aus 877 nicht verwandten Personen, darunter Patienten mit morbidem Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie. Als gesunde Kontrollgruppe wurden Blutspender eingesetzt. Der Einfluß des Polymorphismus wurde anhand von klinischen Parametern in Zusammenhang mit Adipositas geprüft. Ein Teil der Ergebnisse ist im International Journal of Obesity veröffentlicht (*Evans et al.*, 2000).

1.2 Die Adipositas

Die Fähigkeit zur Speicherung der Energie im Fettgewebe war lange Zeit eine wesentliche Voraussetzung für das Überleben. Die Unsicherheit des Nahrungsangebots erforderte, in Zeiten des Überflusses einen Energievorrat anzulegen, der in Zeiten des Mangels zur Deckung des Energiebedarfs mobilisiert werden konnte. Erbanlagen, welche die Energiespeicherung fördern, stellten einen Vorteil dar und konnten sich in der Evolution durchsetzen (*Hamann und Greten, 1999*). In der heutigen Gesellschaft mit Überangebot an Nahrungsmitteln hat die Fähigkeit zur Fettspeicherung an Bedeutung verloren, und die negativen Begleiteffekte einer übermäßigen Fettspeicherung sind in den Vordergrund getreten.

1.2.1 Epidemiologie

Fettsucht oder Adipositas wird definiert als pathologische Fettleibigkeit, die durch eine generalisierte Vermehrung des Fettgewebes infolge positiver Energiebilanz entsteht. Ein Überschuß an Fettgewebe ist vorhanden, wenn der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht bei Frauen 30 % oder bei Männern 20 % übersteigt. Die direkte oder indirekte Messung der Menge an Fettgewebe ist aufwendig; einfacher ist die Abschätzung des Fettanteils durch den Körpermassenindex (Body mass index, BMI). Zur Berechnung des BMI wird das Körpergewicht durch das Quadrat der Körpergröße dividiert.

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße}^2 \text{ (m}^2\text{)}}$$

Der BMI korreliert gut ($r = 0,927$) mit der mittels bioelektrischer Impedanzmessung gemessenen Fettmenge (*Kato et al., 1996*). Die Weltgesundheitsorganisation WHO hat eine Einteilung des Übergewichts bei Erwachsenen auf Grundlage des BMI vorgenommen, nach der Übergewicht definiert wird als $BMI \geq 25$ und Adipositas als $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (*Kucz-*

marcki et al., 1997). Eine morbide Adipositas oder Adipositas per magna wird bei einem BMI ≥ 40 kg/m² diagnostiziert (*Kuczmarski et al.*, 1997). Die in Tabelle 1 genannten Richtlinien gelten für Erwachsene, für Kinder wird die Anwendung von BMI-Alter-Perzentilen empfohlen (*Seidell*, 1999).

Tabelle 1 Klassifikation des Übergewichts bei Erwachsenen anhand des BMI.

Gewichtsklasse	BMI (kg/m ²)
Normalgewicht	18,5 – 25
Übergewicht	≥ 25
- Präadipositas	25 – 30
- Adipositas Grad I	30 – 35
- Adipositas Grad II	35 – 40
- Adipositas Grad III = morbide Adipositas = Adipositas per magna	≥ 40

Die Prävalenz der Adipositas hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen (*Kuczmarski et al.*, 1994). Die amerikanische NHANES-Untersuchung (*National Health and Nutrition Examination Surveys*) beobachtete im Zeitraum 1976 bis 1980 im Vergleich zu 1988 bis 1994 einen Anstieg des Anteils der Adipösen an der Gesamtbevölkerung von 14,5 % auf 22,5 % (*Flegal et al.*, 1998). In den europäischen Ländern wurden Häufigkeiten zwischen 10 % in Dänemark und 32 % in Rumänien festgestellt (*Kluthe und Schubert*, 1985). In Deutschland sind fast 50 % der Bevölkerung übergewichtig, etwa 16 % adipös und 1 % morbid adipös (*Hoffmeister et al.*, 1994). Aufgrund der hohen und weiter steigenden Prävalenz stellt die Adipositas in Deutschland ein wichtiges Gesundheitsproblem dar (*Wechsler et al.*, 1996). Die durch Adipositas und ihre Folgeerkrankungen verursachten Kosten betragen in Deutschland 5 bis 10 % der Gesamtkosten im Gesundheitswesen (*Kohlmeier et al.*, 1993).

1.2.2 Krankheitswert

Der Zusammenhang zwischen Sterblichkeit und Körpergewicht wurde erstmals von der Metropolitan Life Insurance Company 1959 überzeugend nachgewiesen und 1979 bestätigt (*Society of Actuaries*, 1959 und 1979). Danach steigt das Risiko eines frühen Todes in dem Maße an, wie das Körpergewicht vom „Idealgewicht“ abweicht. Nachfolgende Untersuchungen belegten, daß das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko sich mit dem Grad der Adipositas erhöht (*Manson et al.*, 1995). Die Nurses Health Study mit einem Studienkollektiv von mehr als 115.000 Frauen ermittelte für Frauen mittleren Alters mit einem BMI > 32 im Vergleich zu Frauen mit einem BMI < 19 ein um den Faktor 4,1 erhöhtes Risiko, an einer kardio-vaskulären Erkrankung zu sterben (*Manson et al.*, 1990). Die Bewertung der Adipositas als chronische Erkrankung und der Adipositas-Therapie als ärztliche Aufgabe findet allerdings erst seit einigen Jahren zunehmend Verbreitung (*Hamann und Greten*, 1999).

Die eingeschränkte Lebenserwartung von Adipösen ist bedingt durch das gehäufte Auftreten von kardio-vaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ 2 (*Colditz et al.*, 1990), arterieller Hypertonus (*Su et al.*, 1995) und Dyslipidämien (*Wechsler et al.*, 1981). Die Adipositas gilt darüber hinaus auch als eigenständiger Risikofaktor für Herz- und Gefäßkrankheiten (*Hubert et al.*, 1983). Die Prävalenz vieler anderer Krankheiten, darunter degenerative Gelenkveränderungen, Schlafapnoe-Syndrom, Gallensteinleiden und Karzinome ist bei Übergewichtigen erhöht (*Wirth*, 1997).

Nicht nur das Ausmaß des Übergewichts, sondern auch die Art der Fettverteilung beeinflusst das individuelle Gesundheitsrisiko. Stammbetonte oder androide Adipositas ist im Vergleich zur hüftbetonten oder gynoiden Fettverteilung häufiger mit Störungen des Glukose- und Lipidstoffwechsels (*Deprés*, 1991) und mit koronarer Herzkrankheit (*Rexrode et al.*, 1998) assoziiert. Der Zusammenhang von Fettverteilung und erhöhter Mortalität wurde sowohl für Männer (*Larsson et al.*, 1984) als auch für Frauen (*Lapidus et al.*, 1984) nachgewiesen. Das gemeinsame Vorkommen von Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Glukoseintoleranz, arterieller Hypertonie, Dyslipoproteinämien (VLDL erhöht, HDL erniedrigt) und androider Adipositas wird als metabolisches Syndrom oder Syndrom X bezeichnet (*Reaven*, 1993). Die Verteilung des Fettgewebes wird durch den Quotienten aus Taillen- und

Hüftumfang beschrieben (Waist-Hip-Ratio, WHR). Für Frauen gilt ein $WHR > 0,8$, für Männer ein $WHR > 1,0$ als ungünstig (Lean et al., 1995).

Viele der genannten mit Adipositas assoziierten Gesundheitsstörungen sind reversibel, wenn eine Gewichtsreduktion erfolgt (Wechsler 1997). Der Wille zur Gewichtsreduktion ist bei Übergewichtigen auch aus kosmetischen und gesellschaftlichen Gründen meist vorhanden (Hauner, 1997). Trotz aller Bemühung hat die Behandlung der Adipositas aber meist nur geringe und zeitlich begrenzte Erfolge (Müller et al., 1998). Das Interesse an der Erforschung der Ursachen und neuer Ansatzpunkte zur Therapie der Adipositas ist dementsprechend groß.

1.2.3 Regulation des Körpergewichts

Die Adipositas entsteht durch ein Ungleichgewicht von Kalorienaufnahme und Energieverbrauch. Übersteigt die Aufnahme den Verbrauch, liegt eine positive Energiebilanz vor, was langfristig zur übermäßigen Speicherung von Körperfett führt. Eine Zunahme des Körpergewichts entsteht nicht nur durch eine überschüssige Nahrungsaufnahme sondern auch durch einen eingeschränkten Energieverbrauch (Ravussin et al., 1988). Der Energieverbrauch besteht aus dem Grundumsatz zur Erhaltung der Zellfunktionen, dem Kalorienverbrauch bei körperlicher Aktivität und aus einem fakultativen Anteil, der eine Anpassung an die Umwelt darstellt. Dieser wird durch Aktivität des Sympathikus gesteigert und beinhaltet unter anderem die regulierte Entkopplung der Atmungskette durch UCP1 in braunen Adipozyten.

Da durch Schädigungen im Hypothalamus in Tierexperimenten Adipositas induziert werden konnte (Hetherington und Ranzen, 1942), wurde schon sehr früh postuliert, daß das Gleichgewicht des Körpergewichts über zentral wirksame Faktoren im Hypothalamus gesteuert wird. Humorale Signale, die bei gefüllten Körperfettspeichern ausgeschüttet werden, sollten im Zentralen Nervensystem (ZNS) wirken, um die Nahrungsaufnahme zu verringern oder den Energieverbrauch zu erhöhen. Erst in den letzten Jahren ermöglichten neue Erkenntnisse ein genaueres Bild der Regulation des Körpergewichts.

Im folgenden wird der Regelkreislauf vereinfacht beschrieben (nach *Porte et al.*, 1998). Das Hormon Leptin wird im Fettgewebe sezerniert, wenn die Fettspeicher gefüllt sind. Über die Blutbahn gelangt es ins Gehirn und, nach aktivem Transport über die Blut-Hirn-Schranke, zum Leptinrezeptor im Hypothalamus (vgl. Abbildung 1). Ein wichtiger anaboler Faktor ist das Neuropeptid Y (NPY), das insbesondere im Hypothalamus synthetisiert wird. NPY stimuliert den Appetit und fördert so eine Gewichtszunahme. Durch Bindung von Leptin an den Leptinrezeptor wird die NPY Produktion inhibiert, und der anabole Effekt unterdrückt. Katabole Elemente des Regelkreislaufs wie das Neuropeptid Corticotropin Releasing Hormon (CRH) bewirken über Stimulation des Sympathikus an β_3 -Rezeptoren durch Steigerung von Lipolyse und Thermogenese die Mobilisation der Fettspeicher.

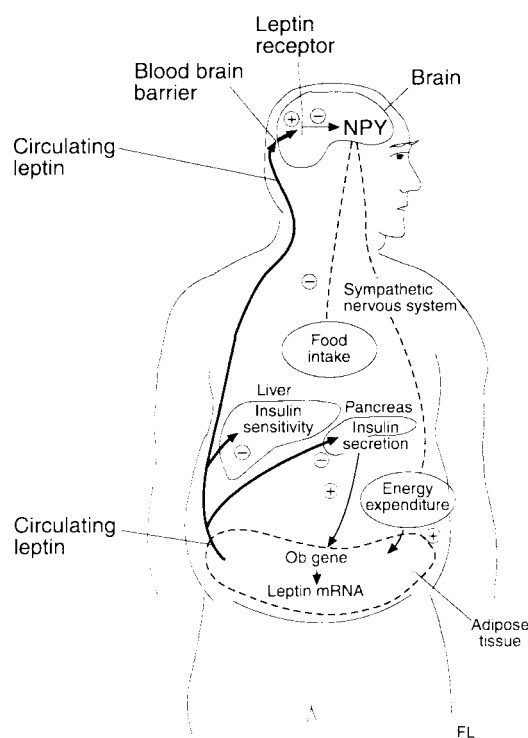


Abbildung 1 Hypothetische Rolle von Leptin.

Das Fettgewebe sezerniert das *ob*-Genprodukt Leptin, welches mit der Blutzirkulation zum Gehirn transportiert wird. Leptin wird aktiv durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert und erreicht den Hypothalamus. Hier bindet Leptin an spezifische Leptinrezeptoren, wodurch die Ausschüttung von NPY verringert wird. Nachfolgend wird der Appetit gesenkt, und der Energieverbrauch über die Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen erhöht. Noradrenalin führt an den β_3 -Adrenorezeptoren im braunen Fettgewebe zu gesteigerter Aktivität von UCP1 (nach *Lönnqvist et al.*, 1999).

Beim Fasten wird weniger Leptin ausgeschüttet. Da die Hemmung des NPY durch Leptin ausbleibt, wird der anabole Stoffwechsel aktiviert. Der anabolische Effekt des NPY wird durch Steigerung des Appetits sowie durch eine Hemmung des sympathischen Nervensystems erreicht, wodurch die Thermogenese im braunen Fettgewebe reduziert wird und der Energieverbrauch sinkt. Beim Menschen korrelieren Plasma-Leptinspiegel mit dem Körpergewicht. Hier ist möglicherweise eine Leptinresistenz vorhanden, die den ausbleibenden katabolen Effekt der erhöhten Leptinspiegel erklärt.

1.2.4 Genetik der Adipositas

Das Körpergewicht ist ein multifaktorielles Merkmal, bei dem genetische und Umweltfaktoren eine Rolle spielen (*Weck und Fischer, 1997*). Der genetische Anteil wird, in Abhängigkeit vom Studiendesign, zwischen 10 und 80 % geschätzt (*Bouchard, 1996*). In Zwillingsstudien wurden mit 50 bis 80 % die höchsten Werte ermittelt. In Familienuntersuchungen (30 bis 50 %) und Adoptionsstudien (10 bis 30 %) wurde die Erbllichkeit der Adipositas etwas geringer eingestuft (*Chagnon et al., 1997*). Die genetische Prädisposition zur abdominalen Adipositas wird auf über 70 % geschätzt (*Carey et al., 1996; Pérusse et al., 1996*). Bei einer positiven Familienanamnese in Bezug auf Adipositas ist das Risiko um den Faktor zwei bis drei erhöht und steigt mit dem Schweregrad der Adipositas weiter an (*Allison et al., 1996*).

Es sind bislang 24 monogene Krankheiten mit Adipositas identifiziert, die einem Erbgang nach Mendel folgen (*Pérusse et al., 1998*). Die bekanntesten sind das Bardet-Biedl, Prader-Willi, Cohen und das Wilson-Turner Syndrom. Diese Syndrome, die mit schwerwiegenden anderen Störungen, besonders häufig mit mentaler Retardierung, einhergehen, werden autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbt (*Gunay Aygun et al., 1997*). Die auslösenden genetischen Defekte sind häufig bereits bekannt, insgesamt jedoch extrem seltene Ursachen der Adipositas. (*Echwald, 1999*). Abgesehen von den genannten Syndromen sind die genetischen Faktoren, die zur Adipositas führen, noch weitgehend ungeklärt (*Winick und Friedman, 1998*).

Die Untersuchung von Tiermodellen mit monogenen Formen der Adipositas hat viel zum derzeitigen Wissen der Regulation des Körpergewichts beigetragen (Echwald, 1999). Einige Gendefekte, die bei Nagetieren zu Adipositas führen, wurden identifiziert (Tabelle 2). Bei den *ob*-Mäusen ist die Fettleibigkeit auf eine Mutation im *ob*-Gen zurückzuführen, durch die ein inaktives Genprodukt (Leptin) entsteht. Exogene Leptingabe verhindert die Adipositas (Zhang *et al.*, 1994). Eine Mutation im Leptinrezeptor als Auslöser der Adipositas wurde bei den *db*-Mäusen (Tartaglia *et al.*, 1995) sowie bei den *fa*-Ratten (Chua *et al.*, 1996), den *cp*-Ratten (Lee *et al.*, 1997) und den *Koletsky*-Ratten (Takaya *et al.*, 1996) erkannt. Durch den defekten Leptinrezeptor resultiert eine Leptinresistenz. Auch die Adipositas auslösenden Gene der *Agouti*-Maus (Bultman *et al.*, 1992), der *tubby*-Maus (Kleyn *et al.*, 1996 bzw. Noben-Trauth *et al.*, 1996) und der *fat*-Maus (Naggert *et al.*, 1995) wurden gefunden. Nach der Identifikation der jeweiligen menschlichen Gene wurden große Studienkollektive auf die Mutationen untersucht. In einigen Familien mit morbidem Adipositas war ein Gendefekt im Leptinigen (Montague *et al.*, 1997) oder im Leptinrezeptorgen (Clement *et al.*, 1998) vorhanden. In den meisten Fällen wurde jedoch keiner der genannten Gendefekte gefunden, so daß die hohe Prävalenz der Adipositas durch diesen Ansatz nicht erklärt ist (Maffei *et al.*, 1996 bzw. Considine *et al.*, 1996).

Tabelle 2 Mutationen bei Tiermodellen mit monogener Form der Adipositas.

Mutation	Spezies	Gen	Genprodukt	Defekt	Referenz
ob	Maus	Lep	Leptin	Defekt im Leptinigen	Zhang, 1994
db	Maus	Lepr	Leptinrezeptor	Defekter Leptinrezeptor	Tartaglia, 1995
fa	Ratte	Lepr	Leptinrezeptor	Defekter Leptinrezeptor	Chua, 1996
Kol	Ratte	Lepr	Leptinrezeptor	Defekter Leptinrezeptor	Takaya, 1996
Cp	Ratte	Lepr	Leptinrezeptor	Defekter Leptinrezeptor	Lee, 1997
Ay	Maus	Agouti	Agouti Signalprotein	Ektope Expression des MCR Antagonisten	Bultman, 1992
tub	Maus	Tubby	Phospho- diesterase	Apoptosis im Hypothalamus ?	Noben-Trauth, 1996; Kleyn, 1996
Fat	Maus	CPE	CPE	CPE Aktivität aufgehoben	Naggert, 1995

ob = obese, db = diabetes, Ay = Agouti yellow, tub = tubby, fa = Zucker fatty, Kol = Kolietsky, cp = corpulent.
CPE = Carboxipeptidase E.

Die Genetik der Adipositas entspricht in der Regel nicht dem klassischen Erbgang nach Mendel, sondern einem polygenen Vererbungsmodus, d.h. erst die Kombination mehrerer sogenannter Suszeptibilitätsallele macht die Adipositas-Disposition eines Individuum aus (Comuzzie und Allison, 1998). Aufgrund der Vielfalt der Einflußfaktoren ist die Identifizierung der auslösenden Gene erschwert. Grundsätzlich können die zwei Ansätze zur Aufklärung von polygenen Eigenschaften unterschieden werden: Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien (Pérusse und Chagnon, 1997). In Kopplungsanalysen werden die chromosomalen Regionen (Quantitative trait loci) und Phänotypen von Geschwisterpaaren verglichen. Für Assoziationsstudien muß zunächst ein Kandidatengen definiert werden (Strachnan, 1994).

Kandidatengene

Kandidatengene beruhen auf besonderen Eigenschaften des Genprodukts, die mit einer eventuellen Beteiligung an der Pathogenese in Einklang stehen. Zur Identifizierung von Kandidatengen eignet sich die Übertragung der im Tiermodell erkannten Krankheitsgene auf den Menschen. Eine andere Möglichkeit, ein Kandidatengen zu benennen, entstammt dem Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge (Strachnan und Read, 1996). Die entsprechenden Gene werden auf Polymorphismen untersucht. Ein Polymorphismus liegt vor, wenn für einen Genlocus mehrere Varianten (Allele) bekannt sind, von denen jede mindestens mit einer Häufigkeit von 0,01 in der Bevölkerung auftritt. In Assoziationsstudien wird versucht, den möglichen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus und einem bestimmten Phänotyp aufzudecken.

Eine Reihe von Hormonen, Rezeptoren und Proteinen werden aufgrund des derzeitigen Verständnis der Gewichtsregulation (vgl. auch Abbildung 1) als Kandidatengene für Adipositas eingestuft (Comuzzie und Allison, 1998). Eine Übersicht ist in Tabelle 3 gegeben. Die Entkopplungsproteine UCP1, UCP2 und UCP3 haben möglicherweise durch die Regulation des Energieverbrauchs einen Einfluß auf das Körpergewicht (z.B. Oppert *et al.*, 1994 bzw. Fleury *et al.*, 1997, und Solanes *et al.*, 1997). Das NPY und der NPY-Rezeptor werden wegen der Beteiligung an der Steuerung der Nahrungsaufnahme in genetischen Studien

untersucht (z.B. *Roche et al.*, 1997). Die β_2 und β_3 Adrenorezeptoren sowie PPAR- γ (Peroxisome proliferator activated receptor- γ) werden unter anderem wegen ihrer Funktion in der Fettgewebsdifferenzierung als Kandidatengene für die Adipositasentstehung beurteilt (*Arner et al.*, 1999 bzw. *Brun et al.*, 1997).

Tabelle 3 Ausgewählte Kandidatengene für Adipositas und beim Menschen.

Gen	Funktion	Chromosomenlokation	Referenz
NPYR5	Appetitregulation	4q31-q32	z.B. Roche, 1997
UCP1	Energiehaushalt	4q31	z.B. Oppert, 1994
UCP2	Energiehaushalt	11q13	z.B. Fleury, 1997
UCP3	Energiehaushalt	11q13	z.B. Solanes, 1997
PPAR- γ	Adipozyten-Differenzierung	3p25	z.B. Brun, 1997
β_2 AR	Adipozyten-Differenzierung		z.B. Arner, 1999
β_3 AR	Adipozyten-Differenzierung	8p11.1-p12	z.B. Arner, 1999

NPY = Neuropeptid Y, PPAR- γ = Peroxisome proliferator activated receptor- γ , UCP = Uncoupling protein, β_2 AR = β_2 -Adrenorezeptor, β_3 AR = β_3 -Adrenorezeptor

1.3 Das Uncoupling Protein 1

Während das weiße Fettgewebe seine Funktion als der Energiespeicher hat, dient das braune Fettgewebe der Wärmeproduktion, der sogenannten zitterfreien Thermogenese, mit erhöhtem Energieverbrauch (*Lowell und Flier*, 1997). Typisch für ein Gewebe mit hohem Sauerstoffverbrauch verfügt das braune Fettgewebe über besonders viele Mitochondrien (*Nnodim et al.*, 1988). Die Cytochrome in den Mitochondrien bewirken die charakteristische braune Farbe des Fettgewebes (*Ricquier et al.*, 1982). Isolierte Mitochondrien aus braunen Fettzellen weisen eine hohe Protonen-Permeabilität auf. Hierfür ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich, das Entkopplungsprotein, Thermogenin oder Uncoupling Protein (UCP) genannt wurde (*Nicholls und Locke*, 1984). Seit der Identifizierung verwandter Proteine hat sich die Bezeichnung Uncoupling Protein 1 (UCP1) durchgesetzt.

1.3.1 Die Familie der Entkopplungsproteine

Die Entkopplungsproteine haben die Eigenschaft, die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP zu entkoppeln und dabei Wärme zu produzieren. Die Isolierung des UCP1 gelang 1980 (*Lin und Klingenberg, 1980*). Die erst kürzlich entdeckten Proteine, die dem UCP1 in Struktur und Funktion ähneln, wurden UCP2 und UCP3 genannt (*Fleury et al., 1997* und *Vidal-Puig et al., 1997*). Die Aminosäuresequenz des UCP2 ist zu 59 %, die des UCP3 zu 57 % mit der von UCP1 übereinstimmend. UCP2 und UCP3 sind zu 73 % übereinstimmend (*Boss et al., 1997*).

Da UCP1 ausschließlich in braunen Adipozyten vorhanden ist, wird es auch als Marker für das braune Fettgewebe eingesetzt (*Ricquier et al., 1991*). Im Gegensatz dazu, wurde UCP2 und UCP3 in weiteren Geweben nachgewiesen. UCP2 findet sich in den meisten Geweben, so auch in weißem Fettgewebe, Lunge, Leber, Milz und Makrophagen (*Gimeno et al., 1997*). UCP3 ist überwiegend in Muskelgewebe, aber auch in braunem Fettgewebe lokalisiert (*Vidal-Puig et al., 1997*). Das Gen des UCP1 liegt auf Chromosom 4 und die Gene von UCP2 und UCP3 liegen auf Chromosom 11. Die physiologischen Funktionen von UCP2 und UCP3 sind noch nicht vollständig geklärt. Die derzeit bekannten Eigenschaften wurden für das UCP2 von *Fleury und Sanchis, 1999*, und für das UCP3 von *Langin et al., 1999*, zusammengefaßt. Die Expression von UCP2 wird durch Triiodthyronin und Leptin stimuliert (*Fleury et al., 1997*). Das UCP3 wird durch eine hochkalorische Diät, eine hyperthyreote Stoffwechsellage und pharmakologische Stimulation der β_3 -Adrenorezeptoren gefördert. Wider Erwarten wurde festgestellt, daß auch durch Fasten vermehrt UCP2 und UCP3 im Muskel gebildet werden. (*Millet et al., 1997*).

1.3.2 Funktionsweise des UCP1

Die Funktion des UCP1 als Entkoppler von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien ist in Abbildung 2 nach *Löffler und Petrides, 1990*, schematisch dargestellt. Das 33 kDa große UCP1 liegt als Dimer vor und ist in die innere

Mitochondrienmembran der braunen Fettzellen integriert (Jezek und Garlid, 1998). Die beiden identischen Dimere bestehen jeweils aus sechs transmembranösen Domänen, deren C- und N- Enden zum Zytosol orientiert sind. UCP1 transportiert Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix, die zuvor von den Enzymen der Atmungskette in den Intermembranraum gepumpt wurden. Damit verringert sich der Gradient über der Mitochondrienmembran, ohne daß ATP generiert wird. Die gewöhnlich vorhandene Kopplung von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung wird durch UCP1 aufgehoben, und die oxidative Energie wird in Form von Wärme freigesetzt (Nicholls und Locke, 1984).

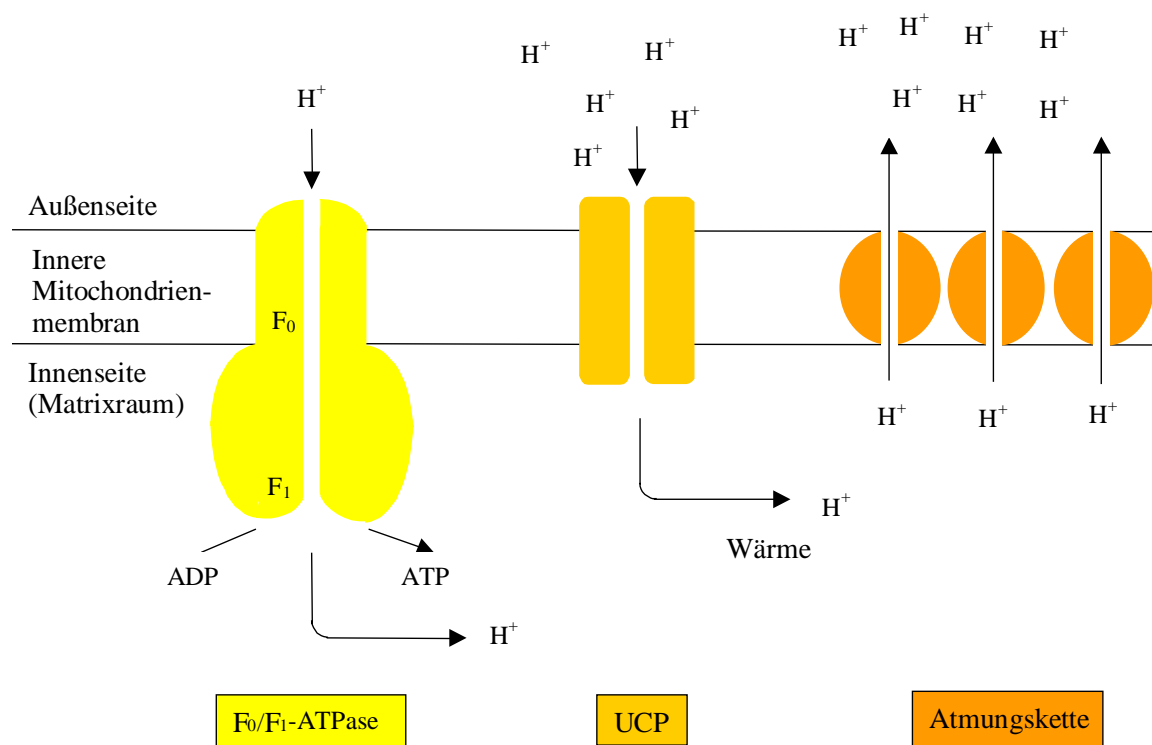


Abbildung 2 Funktion von UCP als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Der durch UCP gebildete Kanal konkurriert mit der F_0/F_1 -ATPase um Protonen beim Rückstrom in den Matrixraum der Mitochondrien (nach Löffler und Petrides, 1990).

1.3.3 Regulation von UCP1

Der Entkopplungsmechanismus von UCP1 ist nicht permanent aktiv. Das Ausmaß der UCP1 Aktivität korreliert mit der Thermogenese im braunen Fettgewebe und wird anhand des Sauerstoffverbrauchs des Gewebes abgeschätzt. Die Transkription von UCP1 wird durch Kältereiz, Stimulation des sympathischen Nervensystems und Schilddrüsenhormone angeregt (*Silva und Rabelo, 1997*). Noradrenalin stimuliert die β_3 -Adrenorezeptoren, eine ausschließlich in Fettgewebe vorhandene Isoform der adrenergen Betarezeptoren (*Arner und Hoffstedt, 1999*). Über Aktivierung der Adenylatzyklase wird cAMP generiert. Das cAMP bewirkt eine gesteigerte Transkription von UCP1 und der Lipoproteinlipase. Die Lipoproteinlipase ermöglicht die Aufnahme extrazellulärer Lipide. In Adipozyten führt die Stimulation des sympathischen Nervensystems so zur Aktivierung der Lipolyse und Bereitstellung von freien Fettsäuren. Der Protonentransport des UCP1 wird durch freie Fettsäuren aktiviert und durch Purinnukleotide (ATP, ADP, GTP, GDP) inhibiert.

Die pharmakologische Stimulation der Rezeptoren ist in Zellkultur und Tierversuch erfolgreich durchgeführt worden. Die Substanz SR59230A, ein selektiver β_3 -Adrenorezeptor-Agonist, induziert die UCP1 Gen Expression in braunen Adipozyten, während das Leptin Gen inhibiert wird (*Tonello et al., 1998*). Die Behandlung von adipösen Ratten mit dem Agonisten CL316,243 führt zu vermehrter Expression von UCP1 in braunem und in weißem Fettgewebe und zur Gewichtsreduktion zwischen 15 und 27 % (*Umekawa et al., 1997*). Der Effekt ist bei älteren Ratten geringer als bei jüngeren Tieren (*Kumar et al., 1999*).

1.3.4 Die Thermogenese im braunen Fettgewebe und Adipositas

Die meisten Erkenntnisse über die zitterfreie Thermogenese entstammen Tierversuchen. Winterschläfer haben am Nacken eine auffällige Ansammlung von braunem Fettgewebe, die auch als Winterschlafdrüse bezeichnet wird. Die Thermogenese im braunen Fettgewebe liefert die Wärme, die in Aufwachphasen des Winterschlafs benötigt wird (*Nicholls und Locke, 1984*). Bei Nagetieren werden dem braunen Fettgewebe zwei wichtige Funktionen im Wärme- und Energiehaushalt zugewiesen. Die Thermogenese im braunen Fettgewebe er-

möglicht den Nagetieren eine Anpassung an Kälte in Form der Kälte-induzierten Thermogenese. Außerdem wird die Thermogenese stimuliert, um den Energieverbrauch nach übermäßiger Kalorienzufuhr zu steigern und so einer Gewichtszunahme entgegenzuwirken, was als Kost-induzierte Thermogenese bezeichnet wird (*Nicholls und Locke, 1984*). Das Ausmaß der zitterfreien Thermogenese ist abhängig von der Umgebungstemperatur und der Kalorienzufuhr. Außerdem ist der Entwicklungsstand der Tiere von Bedeutung, da bei älteren Tieren weniger zitterfreie Thermogenese stattfindet.

Verstärkte Expression von braunem Fettgewebe und UCP1 wirkt der Entstehung von Adipositas entgegen. Im Tierversuch wurden die Auswirkungen der Fütterung einer hochkalorischen Kost untersucht. Die Versuchstiere nahmen 76 % mehr Energie auf als die Kontrolltiere unter normaler Kost. Dennoch kam es nicht zu einer starken Gewichtszunahme der Versuchstiere. Im Vergleich zu normal ernährten Tieren zeigten die hochkalorisch ernährten Tiere nicht nur eine Verdopplung der Menge an braunem Fettgewebe sondern zudem eine gesteigerte Aktivität des braunem Fettgewebe. (*Rothwell und Stock, 1979*). Die erhöhte Energieaufnahme wurde durch einen gesteigerten Energieverbrauch im braunem Fettgewebe kompensiert. Denervierung oder Exzision des interscapulären braunen Fettgewebes bewirken hingegen eine Zunahme der Körperfettmasse (*Dulloo und Miller, 1984*).

Weitere Erkenntnisse entstammen der Untersuchung transgener Mäuse, deren braunes Fettgewebe durch Expression von Diphtheria Toxin A (DTA) in diesem Gewebe stark reduziert war. (*Lowell et al., 1993*). Diese Tiere entwickeln eine extreme Adipositas und, im Alter von 6 Wochen, zusätzlich eine Hyperphagie. Die Adipositas geht einher mit Stoffwechseleränderungen wie Insulinresistenz und Dyslipidämie. Bei fettreicher Ernährung der UCP-DTA-Mäuse zeigt sich in Bezug auf das Ausmaß der Adipositas und ihrer Folgen ein synergistischer Effekt (*Hamann et al., 1996*). Zudem finden sich erhöhte Leptinwerte. Anders als bei normalen Tieren (*Frederich et al., 1995*) führt exogene Leptingabe nicht zu Gewichtsreduktion der UCP-DTA Mäuse. Diese sind offenbar resistent gegenüber der anorektischen Wirkung von Leptin (*Hamann et al., 1997*).

Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen gelang es, das UCP Gen durch partielle Deletion zu inaktivieren (*Enerbäck et al., 1997*). Im braunen Fettgewebe

dieser Mäuse konnte kein UCP nachgewiesen werden. Wider Erwarten sind jedoch Mäuse mit genetischem Mangel an UCP1 zwar kälteempfindlich, aber nicht adipös. Die Autoren diskutieren die Kompensierung des UCP1 Mangels durch einen alternativen Stoffwechselweg oder verstärkte Expression eines verwandten Proteins (UCP2). Eine andere Mutation mit Einfluß auf die Thermogenese im braunen Fettgewebe, ist bei Mäusen mit genetischem Mangel an β_3 -Rezeptoren vorhanden. Die Tiere haben einen leicht erhöhten Körperfettanteil, entwickeln jedoch auch keine ausgeprägte Adipositas, möglicherweise durch kompensatorische Aktivität im β_2 -Rezeptor (*Susulic et al.*, 1995).

Transgene Mäuse, in denen das UCP Gen unter Kontrolle des fettspezifischen konstitutiven $\alpha 2$ Promotors ist, bilden UCP sowohl in weißem als auch in braunem Fettgewebe. Im Vergleich zu Kontrolltieren nimmt das Körpergewicht der transgenen Mäuse bei einer hochkalorischen Diät weniger zu (*Kopecky et al.*, 1995). Der β_3 -Adrenorezeptor-Agonist CI216,243 bewirkt bei Versuchstieren einen sechsfach erhöhten UCP-Gehalt im braunen Fettgewebe und Ausbildung von UCP in weißem Fettgewebe. Die Applikation des Agonisten führt bei genetisch fettleibigen Mäusen zu einer Reduktion des Körpergewichts (*Nagase et al.*, 1996).

Zitterfreie Thermogenese findet beim Menschen perinatal in großem Ausmaß statt, während Erwachsene Wärme überwiegend durch Kältezittern in Form von gesteigerter Muskelaktivität generieren. Entsprechend ist beim Säugling braunes Fettgewebe insbesondere an Hals, Brust und retroperitoneal gut erkennbar, während beim Erwachsenen nur kleine Depots im Nacken oder in der Fettkapsel der Niere vorhanden sind. Postmortal kann in der Nierenkapsel in 25 % der Fälle kein braunes Fettgewebe identifiziert werden (*Ito et al.*, 1991); offenbar atrophiert das braune Fettgewebe oder es wird in weißes Fettgewebe transformiert. Bemerkenswert ist jedoch, daß das perirenale braune Fettgewebe von Patienten mit Phäochromozytom oft besonders stark ausgeprägt ist, was auf Katecholamin induzierbare Proliferation hinweist (*Ricquier et al.*, 1982). Bei Adipösen wurde im Vergleich zu schlanken Personen ein signifikant niedrigerer Gehalt an UCP1 mRNA im intraperitonealen Fettgewebe vorgefunden (*Oberkofler et al.*, 1997). Die Bedeutung des braunen Fettgewebes für den erwachsenen Menschen ist letztlich noch ungeklärt (*Ricquier et al.*, 1999).

1.3.5 Der A→G Polymorphismus im UCP1 Gen

Das Gen des UCP1 liegt auf Chromosom 4q31 (*Cassard et al.*, 1990). Es gibt sechs kodierende Exons (*Gong et al.*, 1997). Da das UCP1 und die adrenerge UCP-Stimulation von besonderer Bedeutung für die Funktion des braunen Fettgewebes ist, wurden das UCP1 und das β_3 -Adrenorezeptor Gen als Kandidatengene für die Entstehung der Adipositas eingestuft. Die erste Untersuchung von DNA Sequenzvariationen im UCP1 Gen wurde 1994 durchgeführt (*Oppert et al.*, 1994). Ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) mit zwei Allelen wurde identifiziert mit Allelhäufigkeiten von 0,28 und 0,72. Die Schnittstelle des Bcl I Restriktionsenzym wurde 1996 identifiziert (*Cassard-Doulier et al.*, 1996). Der Polymorphismus resultiert aus einer Punktmutation, bei der A durch G ersetzt wurde. Die Substitution befindet sich strangaufwärts an Position –3826 in der Promotorregion des UCP Gens. In einer kanadischen Studie, der sogenannten Quebec Family Study, wurden 261 Personen (123 Eltern und 138 Kinder aus 64 Familien) untersucht. Es wurde eine Assoziationstudie bei nicht verwandten Personen sowie eine sib-pair-linkage Analyse bei Geschwistern durchgeführt. Eine signifikante Assoziation zwischen dem UCP1 Genotyp und Körperfett wurde nicht gefunden, die Allelfrequenz des seltenen G-Allels war jedoch größer bei Personen, die in dem beobachteten Zeitabschnitt mehr Körperfett zugenommen hatten (*Oppert et al.*, 1994).

Der Einfluß des A→G Polymorphismus auf den Gewichtsverlust von adipösen Patienten während einer kalorienreduzierten Diät wurde untersucht (*Fumeron et al.*, 1996). Studienpatienten waren 176 Patienten mit einem BMI > 27 kg/m². Gemessen wurden Körpergewicht und BMI bei Studienbeginn und nach 2,5 Monaten. Im Zuge der Diät hatten die Normaltypen im Durchschnitt 7,1 kg abgenommen, während die Heterozygoten und Homozygoten nur 5,7 kg bzw. 4,6 kg/m² verloren hatten. Der A→G Polymorphismus war assoziiert mit einer Resistenz gegenüber Gewichtsreduktion durch kalorienreduzierte Diät. Dieses Ergebnis unterstützte die Hypothese einer Bedeutung von UCP in der Regulation des Körpergewichts

Mutationen eines Promotors können zu Aufhebung der Genfunktion oder Veränderung der Genexpression führen (*Strachnan und Read*, 1996). Durch kompetitive RT-PCR wurde

im intra- und extraperitonealem Fettgewebe adipöser Menschen der UCP1 mRNA Gehalt bestimmt. Eine starke Assoziation des intraperitonealen UCP1 mRNA Gehalts mit der Mutation im UCP1 Gen wurde festgestellt. Diese erklärte fast 20 % der interindividuellen Variabilität. Das seltenere Allel führte zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der UCP1 Gen Expression (*Esterbauer et al.*, 1998).

Andere Studien mit z.T. großen Studienkollektiven und umfangreichen Untersuchungen konnten keinerlei Zusammenhang zwischen dem UCP1-Genotyp und Merkmalen der Adipositas nachweisen (*Urhammer et al.*, 1997; *Gagnon et al.*, 1998; *Schäffler et al.*, 1999). Die Bedeutung des Polymorphismus wird daher derzeit widersprüchlich eingeordnet. Das Vorkommen weiterer Polymorphismen im Gen des UCP1 wurde in einer deutschen Studie (*Hamann et al.*, 1998) untersucht. In einem 293 Studienkollektiv von adipösen Kindern und Jugendlichen wurden vier Mutationen gefunden. Für die Entstehung der Adipositas scheinen diese Polymorphismen von eher geringer Bedeutung zu sein.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung des UCP1 Polymorphismus in der deutschen Bevölkerung für die Prävalenz der Adipositas, des Diabetes mellitus Typ 2 und der Dyslipidämien. In die Studie wurden 877 nicht verwandte Personen eingeschlossen, darunter Blutspender als gesunde Kontrollgruppe und Patienten mit morbidem Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie. Der Einfluß des Polymorphismus wird anhand von Patientendaten in Zusammenhang mit Adipositas geprüft. Es wird untersucht, ob im Gesamtkollektiv bei den klinischen Werten, insbesondere bezüglich BMI, Leptin und Lipidwerten, Assoziationen in Abhängigkeit vom Genotyp nachzuweisen sind. Die Genotypverteilung in verschiedenen Untersuchungskollektiven, mit den Eigenschaften Adipositas per magna, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämien und in einer Kontrollgruppe (Blutspender) wird verglichen. Zur genaueren Analyse des Zusammenhangs zwischen UCP1 Genotyp und Adipositas wird die Allelfrequenz des UCP1 Polymorphismus bei verschiedenen Graden der Adipositas untersucht.

2 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Genotyp des A→G Polymorphismus im Gen von UCP1 bei Personen mit Adipositas und anderen Stoffwechselerkrankungen und bei Gesunden bestimmt und mögliche Assoziationen zwischen Genotyp und Phänotyp untersucht. Dieser Abschnitt beinhaltet die Beschreibung des Patientenguts und der verwendeten Methoden. Die Zusammensetzung der Lösungen und Puffer und die Herstellernachweise der eingesetzten Reagenzien und Geräte sind im Anhang aufgeführt. Im ersten Teil wird das Gesamtkollektiv der Untersuchung vorgestellt, es folgt die Charakterisierung der einzelnen Kollektive anhand klinischer Daten. Der zweite Teil befaßt sich mit den Methoden zur Bestimmung des UCP1 Genotyps. Hier wird jeweils zunächst das Prinzip der Methode und nachfolgend die Durchführung des Versuchs beschrieben. Zuletzt wird auf die statistischen Methoden zur Auswertung der Daten eingegangen.

2.1 Patientengut

Um die Hypothese zu prüfen, ob der UCP1-Polymorphismus mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 oder Fettstoffwechselstörungen assoziiert ist, wurden Patienten mit entsprechendem Phänotyp in die Untersuchung aufgenommen. Für den Vergleich wurden Personen gesucht, welche die Normalbevölkerung repräsentieren. Hierzu wurde eine Gruppe von Blutspendern aus dem Transfusionszentrum des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) eingesetzt. Insgesamt wurden 877 Personen für den A→G Polymorphismus genotypisiert, die sechs verschiedenen Kollektiven entstammten. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis, an einer genetischen Studie teilzunehmen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Bezeichnung der Kollektive, Einschlußkriterien, Anzahl der Personen und Ort der Rekrutierung. In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Patientengruppen näher beschrieben.

Tabelle 4 Übersicht der sechs Untersuchungskollektive

Kollektiv	Anzahl	Einschlußkriterium	Abteilung	Krankenhaus
Adipositas	304	morbide Adipositas + Gastric-Banding OP	Chirurgie	Ev. KH Dinslaken
Blutspender	199	Blutspender	Transfusionszentrum	UKE
Hypercholesterin	97	Hypercholesterinämie	Med. Poliklinik	UKE
HLP	97	Hypertriglyzeridämie oder gemischte Hyperlipidämie	Med. Poliklinik	UKE
Diabetes	86	Diabetes mellitus Typ II	Med. Poliklinik	UKE
Station	94	Stationärer Aufenthalt	Med. Kernklinik	UKE

Hypercholesterin = Hypercholesterinämie, HLP = Hyperlipidämie, Med. = Medizinisch, Ev. KH = Evangelisches Krankenhaus, UKE = Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

Bei den Patienten wurden Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes-Status und Lipidwerte ermittelt. Der BMI ist bei Blutspendern nicht bekannt. Bei Blutspendern und bei einem Teil der Patienten mit morbidem Adipositas wurden auch die Leptinwerte bestimmt. LDL-Cholesterinwerte wurden nach der Friedewald-Formel berechnet, die nur für Triglyzeridwerte unter 400 mg/dl anzuwenden ist. Bei Patienten mit höheren Triglyzeridwerten konnten keine LDL-Werte bestimmt werden.

2.1.1 Adipositas Kollektiv

Die 304 Patienten in der Adipositas-Gruppe wurden im Evangelischen Krankenhaus Dinslaken rekrutiert, wo sie zur Durchführung einer Magenbandoperation (Gastric-Banding OP) aufgenommen worden waren. Ziel der Operation ist, durch Verkleinerung des Magenvolumens die Nahrungsaufnahme zu erschweren und ein schnelleres Sättigungsgefühl zu gewährleisten. Die Operation ist indiziert bei Patienten mit einer morbidem Adipositas (BMI ≥ 40 kg/m²). Um das Operationsrisiko zu rechtfertigen, sollten in der Vorgeschichte mehrere konservative Versuche der Gewichtsreduktion liegen. Die Indikation besteht insbesondere bei Vorliegen von Komplikationen der Adipositas, die durch Gewichtsreduktion zu bessern sind.

Bei den Adipositas-Patienten wurden Alter, Geschlecht, BMI, Diabetes-Status, Leptinwerte und ein Lipidprofil erhoben. Von den 246 Frauen war bei 19 % ein Diabetes mellitus Typ 2 bekannt. Bei den 58 Männern war der Anteil an Diabetikern mit 29 % größer (Tabelle 5). Der mittlere BMI betrug $52 \pm 8 \text{ kg/m}^2$. Die Laborwerte zeigten die für Adipöse typischen Veränderungen mit hohen Leptinwerten, erhöhten Triglyzeriden und VLDL-Cholesterin, niedrigem HDL-Cholesterin und Apoprotein A. Die Leptinwerte lagen bei Frauen erwartungsgemäß fast doppelt so hoch wie bei Männern. Die Lipidwerte der Männer waren ungünstiger als die der Frauen. Insbesondere waren die Werte für HDL-Cholesterin und Apoprotein A niedriger bei Männern, während die Werte für Gesamtcholesterin, Triglyzeride, LDL-Cholesterin und Apoprotein B bei Männern höher waren.

Tabelle 5 Eigenschaften der 304 Patienten aus dem Adipositas Kollektiv.

		Männer	Frauen	Referenzbereich
Anzahl		58	246	
Diabetes mellitus	%	29	19	
Alter	Jahre	39 ± 9	38 ± 9	
BMI	(kg/m^2)	52 ± 9	52 ± 8	19-25
Leptin	(ng/ml)	38 ± 18	68 ± 34	
Gesamt-Cholesterin	(mg/dl)	224 ± 42	202 ± 36	< 220
Triglyzeride	(mg/dl)	264 ± 182	161 ± 78	< 150
LDL-Cholesterin	(mg/dl)	137 ± 28	128 ± 31	< 150
HDL-Cholesterin	(mg/dl)	34 ± 7	43 ± 10	> 40
VLDL-Cholesterin	(mg/dl)	40 ± 19	31 ± 13	< 30
Apoprotein B	(mg/dl)	128 ± 32	110 ± 28	> 138/148
Apoprotein A ₁	(mg/dl)	119 ± 18	129 ± 24	< 120

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Leptinwerte wurden nur bei 29 Männern und 98 Frauen bestimmt. Der Referenzwert für Apoprotein A₁ ist für Männer niedriger als für Frauen.

2.1.2 Patienten aus der Medizinischen Klinik

Aus der Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf wurden 374 Patienten in die Studie aufgenommen. Hiervon kamen 280 Patienten aus der Poliklinik. Anhand des führenden Befundes wurden drei Untergruppen gebildet, die im folgenden „Hypercholesterinämie“, „HLP“ (für Hyperlipoproteinämie) und „Diabetes“ Kollektiv genannt werden. Von den Stationen wurden 94 Patienten rekrutiert; dieses Kollektiv wird im folgenden als „Station“ bezeichnet. Die klinischen Werte sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Das Einschlußkriterium für die 97 Patienten im Hypercholesterinämie Kollektiv waren erhöhte Werte für Gesamt-Cholesterin (> 220 mg/dl), LDL-Cholesterin (> 150 mg/dl) und Apoprotein B (> 120 mg/dl). Die 97 Patienten im HLP Kollektiv wurden wegen Hypertriglyzeridämie in der Poliklinik behandelt. Da neben erhöhten Triglyzeriden (> 150 mg/dl) oft auch erhöhte Werte für Gesamt- und LDL-Cholesterin festgestellt wurden, lag überwiegend eine gemischte Hyperlipidämie (HLP) vor.

Tabelle 6 Eigenschaften der Patienten aus der Medizinischen Klinik.

		Hypercholesterin	HLP	Diabetes	Station
Anzahl		97	97	86	94
Diabetes	Prozent	2 %	27 %	100 %	21 %
Alter	Jahre	46 ± 13	47 ± 12	65 ± 132	68 ± 10
BMI	(kg/m ²)	25 ± 4	28 ± 4	28 ± 7	25 ± 4
Gesamt-Chol.	(mg/dl)	303 ± 88	290 ± 106	196 ± 57	199 ± 47
Triglyzeride	(mg/dl)	155 ± 98	566 ± 634	268 ± 239	158 ± 92
LDL-Chol.	(mg/dl)	225 ± 87	174 ± 66	107 ± 34	126 ± 37
HDL-Chol.	(mg/dl)	46 ± 15	33 ± 11	37 ± 14	42 ± 16
VLDL-Chol.	(mg/dl)	29 ± 16	52 ± 16	38 ± 18	29 ± 13
Apo A ₁	(mg/dl)	128 ± 24	120 ± 32	123 ± 29	117 ± 31
Apo B	(mg/dl)	161 ± 56	157 ± 54	107 ± 33	102 ± 24

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichungen. Chol. = Cholesterin. Die klinischen Werte, die als Einschlußkriterium dienten, sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Im HLP Kollektiv sind auch erhöhtes VLDL-Cholesterin (> 30 mg/dl) und niedrige Werte für HDL-Cholesterin (< 40 mg/dl) sowie niedriges Apoprotein A (< 138 bzw. < 148 mg/dl für Männer bzw. Frauen) vorherrschend. Einen Diabetes mellitus Typ 2 haben 27 % der HLP-Patienten. Die 86 Patienten im Diabetes Kollektiv wurden wegen eines Diabetes mellitus Typ 2 behandelt

2.1.3 Blutspender

Als gesunde Kontrollgruppe wurden Blutspender des Transfusionszentrums am UKE rekrutiert. Bei diesen sind Angaben zu Alter, Geschlecht, Lipidprofil und Leptin verfügbar (Tabelle 7). Der BMI ist nicht bekannt, da die Blutproben der Spender anonymisiert bearbeitet wurden. Die mittleren Leptinwerte sind bei Frauen erwartungsgemäß höher als bei Männern. Die Lipidwerte liegen überwiegend im Normbereich, für Apoprotein A sind die mittleren Werte sowohl bei Frauen als auch bei Männern erniedrigt, bei Männern fällt auch der Mittelwert der Triglyzeride aus dem Referenzbereich.

Tabelle 7 Klinische Daten der Blutspender.

		Männer	Frauen	Referenzbereich
Anzahl		138	61	
Alter	Jahre	51 ± 6	50 ± 6	
Leptin	(ng/ml)	7 ± 5	18 ± 13	
Gesamt-Cholesterin	(mg/dl)	206 ± 32	194 ± 35	< 220
Triglyzeride	(mg/dl)	154 ± 83	109 ± 66	< 150
LDL-Cholesterin	(mg/dl)	131 ± 30	117 ± 31	< 150
HDL-Cholesterin	(mg/dl)	45 ± 12	56 ± 13	> 40
VLDL-Cholesterin	(mg/dl)	31 ± 17	22 ± 13	< 30
Apoprotein B	(mg/dl)	99 ± 20	85 ± 28	< 120
Apoprotein A ₁	(mg/dl)	133 ± 16	145 ± 24	$> 138/148$

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für Apoprotein A liegt der Referenzbereich für Frauen höher als für Männer.

2.1.4 Vergleich der Kollektive

Neben den Besonderheiten, die sich aus den Einschlußkriterien der Kollektive ergeben, weisen die Kollektive der Medizinischen Klinik und die Blutspender einige Unterschiede zum Adipositas Kollektiv auf. Insgesamt wurden im Adipositas Kollektiv mit 81 % wesentlich mehr Frauen als bei den Blutspendern und den Kollektiven der Medizinischen Klinik (zwischen 22 und 43 %) rekrutiert. Operationen zur Therapie der Adipositas werden bei Patienten im Alter von 18 bis 60 Jahren durchgeführt, was den Schnitt von 38 Jahren im Adipositas Kollektiv erklärt. Im Vergleich dazu liegt das Durchschnittsalter der übrigen Kollektive mit Werten zwischen 46 und 68 Jahren deutlich höher. Diabetiker finden sich nicht nur im Diabetes Kollektiv, sondern auch in den anderen Kollektiven (zwischen 2 und 21 %); nur bei den Blutspendern waren gemäß den Einschlußkriterien keine Diabetiker zu verzeichnen. Die Werte der Patienten sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8 Gegenüberstellung der Kollektive.

Kollektiv	Alter (Jahre)	Frauen (%)	Männer (%)	Diabetes mellitus (%)
Adipositas	38 ± 9	81	19	21
Hypercholesterinämie	46 ± 13	43	57	2
HLP	47 ± 12	22	78	27
Diabetes	65 ± 13	42	58	100
Station	68 ± 10	41	59	21
Blutspender	50 ± 6	31	69	0

2.2 Bestimmung des UCP1 Genotyps

Der A→G Polymorphismus des UCP1 Gens ist ein Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), da durch den Polymorphismus die Schnittstelle eines Restriktionsenzym verändert wird. Bei Vorliegen des A-Allels hat das Restriktionsenzym BclI eine

Schnittstelle; bei Vorliegen des G-Allels ist diese derart verändert, daß das Enzym nicht schneidet. Diese Eigenschaft wird zur Bestimmung des Genotyps ausgenutzt.

Hierzu wurde bei allen Personen chromosomale DNA aus Blut isoliert. Ein den Polymorphismus enthaltendes DNA-Fragment wurde mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt und mit dem Restriktionsenzym Bcl 1 verdaut. Die durch den Verdau entstandenen Fragmente wurden mit Hilfe der Elektrophorese in Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Färbung sichtbar gemacht. Ein Foto eines solchen Gels ist in Abbildung 3 gezeigt. Durch Analyse der Restriktionsfragmentlängen wurde nun der Genotyp bestimmt. Nachfolgend werden die Prinzipien der Methoden und die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben.

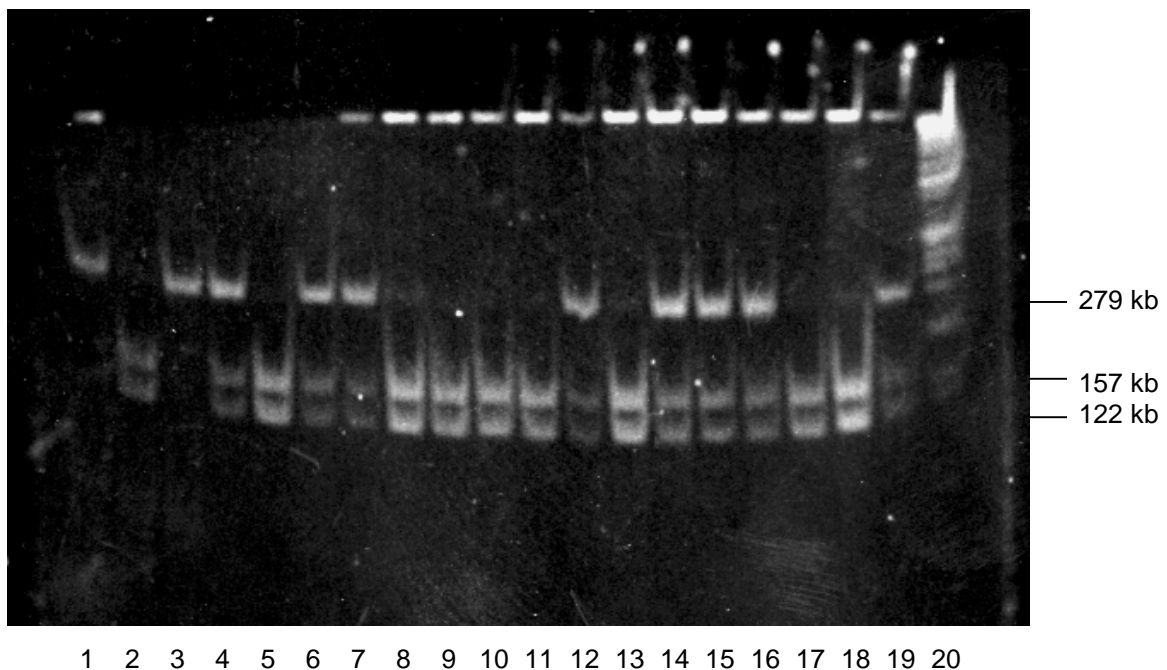


Abbildung 3 Foto eines mit Ethidiumbromid gefärbten Polyacrylamidgels. In die Geltaschen am oberen Bildrand wurden 19 Proben (Spur 1-19), sowie der Kb-Marker (Spur 20) aufgetragen. Durch Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgeteilt, wobei kleinere Fragmente schneller in Richtung des unteren Bildrandes wandern. Der häufige AA-Genotyp ist an den zwei Banden von 157 und 122 kb Größe zu erkennen (z.B. Spur 2). Der GG-Genotyp entspricht einer einzigen Bande von 279 kb Größe, wie in Spur 1 und Spur 3 zu sehen. Der AG-Genotyp ist an dem Vorkommen von drei Banden zu erkennen (z.B. Spur 4).

2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Blut

Blut ist eine leicht zugängliche Quelle für chromosomale DNA und gut zur Isolierung geeignet. Die DNA Extraktion wurde nach dem Verfahren von *Miller* (1988) mit dem nachstehenden Prinzip durchgeführt. Bei gehemmter Blutgerinnung und osmotischer Lyse der Erythrozyten können die kernhaltigen Leukozyten, welche die DNA enthalten, durch mehrere Zentrifugationsschritte isoliert werden. Die Inkubation mit Lyse-Puffer, Proteinase K und SDS 10 % bewirkt die Lyse der Membranen, anschließend werden die Proteine mit NaCl-Lösung ausgefällt. Durch Zugabe von Ethanol 100 % kann die DNA nun gefällt und mit einer Pasteur-Pipette ausgedreht werden. Die einzelnen Schritte der DNA Extraktion sind im folgenden beschrieben.

Je 10 ml EDTA Blut wurden für 10 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Das Plasma wurde für die serologische Untersuchung aliquottiert. Die direkt unterhalb des Plasmas angesiedelte Zellfraktion, genannt Buffy Coat, enthält die Leukozyten. Es wurden 2 ml Buffy Coat in NUNC Tubes pipettiert und für mindestens zwei Stunden bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Buffy Coat in ein 15 ml Spitzröhrchen überführt, mit STE-Puffer aufgefüllt und nach Umschwenken für 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde mit STE-Puffer aufgefüllt, und das Sediment durch Klopfen gelöst. Es folgte ein Zentrifugierschritt bei 3000 Upm für 15 min. Wiederum wurde der Überstand verworfen. Das Pellet mit den Leukozyten wurde mit 3 ml Lyse-Puffer, 1 ml Proteinase K und 200 μl SDS (10 %) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Ansätze mit 3,4 ml Lyse-Puffer und 2,3 ml einer 6 molaren NaCl-Lösung versetzt und durch Umschwenken gemischt. Anschließend wurde bei 3000 Upm für 20 min zentrifugiert. Die obere DNA-haltige Phase wurde in ein 50 ml Tube mit 30 ml Ethanol 100 % überführt. Durch leichtes Schwenken wurde die DNA gefällt und war dann als Knäuel zu erkennen. Mit einer sterilen Pasteur-Pipette wurde die DNA in ein 15 ml Tube übertragen und mit 10 ml Ethanol 70 % gewaschen. Zuletzt wurde die DNA in ein autoklaviertes Eppendorf-Gefäß gegeben, mit 500 μl TE-Puffer versetzt und für 48 Stunden auf dem Rotator bei 37°C gelöst. Die DNA Proben wurden im Kühlraum bei 4°C gelagert.

2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Theoretische Grundlagen

Die PCR (Polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren. Spezifische DNA-Sequenzen können in hoher Ausbeute *in vitro* amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1985). Das Reaktionsprinzip ähnelt der Replikation der DNA *in vivo*. Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen DNA-Matrize. Künstlich synthetisierte Oligonucleotide, die mit dem Matrizenstrang hybridisieren, dienen dabei als Starter (Primer). Diese sind aus flankierenden Bereichen der DNA-Matrize abgeleitet, d.h. das zu amplifizierende Fragment wird von ihnen eingegrenzt. Die PCR beruht auf der vielfachen Wiederholung von Zyklen mit drei temperaturabhängigen Teilschritten, Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation (Abbildung 4). Zuerst wird durch Denaturierung (90-95°C) die DNA in Einzelstränge aufgeteilt. Im zweiten Schritt, bei 50-70°C, hybridisieren die beiden Primer mit den entsprechenden Abschnitten der Matrizen-DNA. Im dritten Schritt, der Polymerisation (72°C), werden ausgehend von den Primern neue DNA-Stränge synthetisiert. Damit verdoppelt sich mit jedem Reaktionszyklus die Menge des von den Primern eingerahmten Matrizenfragments.

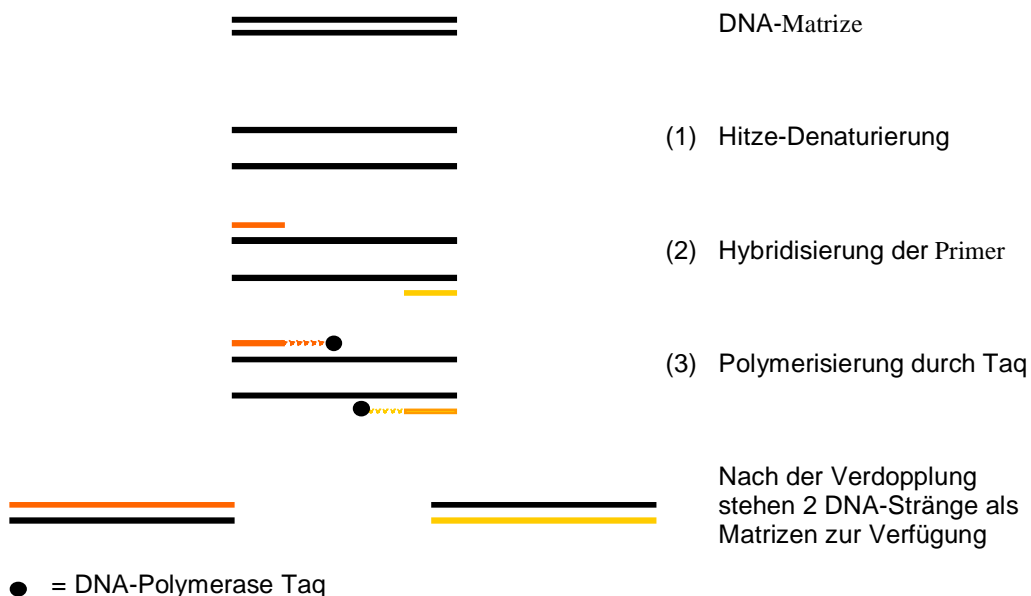


Abbildung 4 Schematische Darstellung der PCR.

Für die Reaktion werden grundsätzlich eingesetzt: DNA als Matrize, ein Primerpaar, Desoxynukleotide (dNTP), die bei der Synthese eingebaut werden, und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Außerdem werden Magnesium-Ionen und ein Puffersystem zur Einstellung des pH-Werts (pH-Optimum pH 8,8) benötigt. Durch die spezifischen Primerpaare wird es möglich, selektiv einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Die beiden Primer flankieren den zu vervielfältigen Bereich, wobei einer an den Sinnstrang bindet und der andere an den Gegensinnstrang.

Die Polymerase Taq wurde ursprünglich aus dem hitzeunempfindlichen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und ist beständig gegen die hohen Temperaturen während der Denaturierungsphase (Saiki *et al.*, 1988). Das Enzym ist in einem weiten Temperaturbereich aktiv (20-95°C), die Polymerisation wird meistens bei 72°C, nahe am Temperaturoptimum des Enzyms, durchgeführt. Die Enzymaktivität ist abhängig von zweiwertigen Kationen, wobei optimale Bedingungen mit 10 mM Mg²⁺ eingestellt werden.

Amplifizierung des A→G Polymorphismus des UCP1 Gens

In dieser Untersuchung sollte ein DNA-Abschnitt in der Promotorregion des UCP1 Gens amplifiziert werden, der den A→G Polymorphismus an Position bp -3826 (Cassard-Doucier *et al.*, 1996) beinhaltet. Die Sequenz der eingesetzten Oligonucleotide wurde von Valve *et al.* (1998) übernommen und ist in Tabelle 9 angegeben. Die einzelnen Reagenzien wurden in Aliquotts bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Vor der Benutzung wurden die benötigten Aliquotts aufgetaut und gemischt.

Tabelle 9 Primer für die Amplifizierung des A→G Polymorphismus.

Oligonucleotid	Sequenz	Konz.
Primer 1 (vorwärts)	CCA GTG GTG GCT AAT GAG AGA A	10 pmol/μl
Primer 2 (rückwärts)	GCA CAA AGA AGA AGC AGA GAG G	10 pmol/μl

Konz. = Konzentration

Das Protokoll zur Herstellung der Amplifizierungsmischung wurde nach *Valve et al., 1998* modifiziert. Die PCR führte unter den anfänglichen Bedingungen nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, da nicht selten nur eine geringe Produktmenge bzw. das völlige Fehlen eines spezifischen Produkts auftrat. Die Konzentrationen der Reagenzien und die Temperatur des Annealing wurden verändert, um die PCR anzupassen. Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurden verschiedene Magnesium-Ionenkonzentrationen und zwei verschiedene dNTP-Konzentration getestet. Durch Erhöhung der Magnesiumkonzentration und Verringerung der dNTP Konzentration wurde eine bessere Ausbeute der PCR erreicht. Die Amplifizierungsmischung wurde in sterilen Mikrozentrifugenröhrchen nach dem Protokoll in Tabelle 10 durch Zugabe der Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge hergestellt.

In der Regel wurde ein sogenannter Mastermix hergestellt, der einen Ansatz für 20 oder 40 Proben enthielt. Hierdurch werden die einzelnen Mengen genauer pipettiert und die Fehlermöglichkeit reduziert, da die Gesamtzahl der Pipettiervorgänge reduziert wird. Nach sorgfältigem Mischen des Mastermix wurden jeweils 19µl der Flüssigkeit in autoklavierte Eppendorf Gefäße aliquottiert, wobei aus einem Mastermix 20x wegen Volumenverlusten beim Pipettieren in der Regel 19 Proben hergestellt wurden.

Tabelle 10 Herstellung der Amplifizierungsmischung des A → G Polymorphismus.

Reagenz	Ansatz 1x	Mastermix 20x	Endkonzentration
Steriles, bidest H ₂ O	14,7 µl	294 µl	
PCR-Puffer, 10 x.	2,0 µl	40 µl	1 x
Mg ²⁺	0,8 µl	16 µl	2,5 mmol
DNTP	0,4 µl	8 µl	0,2 mmol
Primer 1	0,5 µl	10 µl	5 pmol
Primer 2	0,5 µl	10 µl	5 pmol
Taq DNA-Polymerase	0,1 µl	2 µl	0,5 Units
Volumen	19,0 µl	380 µl	
Genomische DNA	1,0 µl		
Gesamtvolumen	20,0 µl		

Die einzelnen Reagenzien wurden in Aliquotts bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Vor der Benutzung wurden die benötigten Aliquotts aufgetaut und gemischt.

Anschließend wurden die Aliquotts beschriftet und mit 1 μ l DNA der entsprechenden Proben versetzt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde zuletzt jeweils ca. 50 μ l Mineralöl auf die Oberfläche geschichtet. Alle Proben wurden gemischt und kurz abzentrifugiert, um die Proben von Luftblasen zu befreien und die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes zu sammeln. Die Amplifizierung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll mit 35 Zyklen im Thermocycler von Perkon-Elmer. Die PCR wurde versuchsweise mit Annealing Temperaturen von 50, 55 und 60°C durchgeführt, wobei bei 60°C die besten Ergebnisse erzielt wurden. Die Temperatur zur Denaturierung betrug 95°C, für die Elongation wurden 72°C festgesetzt. Die einzelnen Phasen hatten eine Dauer von 1 Minute mit Ausnahme des ersten und letzten Zyklus mit 5 bzw. 10 Minuten. Das Protokoll ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Temperaturen und Inkubationszeiten zur Amplifizierung des A \rightarrow G Polymorphismus.

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer
Erster Zyklus	Denaturierung	95°C	5 min
	Annealing	60°C	1 min
	Elongation	72°C	1 min
33 Zyklen	Denaturierung	95°C	1 min
	Annealing	60°C	1 min
	Elongation	72°C	1 min
Letzter Zyklus	Denaturierung	95°C	1 min
	Annealing	60°C	1 min
	Elongation	72°C	10 min

Probleme bei der Durchführung der PCR

Um das Risiko einer Kontamination der Proben mit DNA zu verringern, wurde der Mastermix und die Aliquotts an einem speziellen Arbeitsplatz (Clean Bench) und räumlich getrennt von den weiteren Arbeitsschritten hergestellt. Außerdem wurde von jedem Mastermix ein Ansatz ohne Zusatz von DNA verarbeitet, um eine mögliche Kontamination identifizieren zu können.

2.2.3 Restriktionsverdau mit Bcl 1

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in doppelsträngiger DNA eine spezifische Sequenz von 4-8 Nukleotiden erkennen und dort die DNA spalten. Es handelt sich dabei normalerweise um Palindrome, d.h. die Basensequenz ist vom 5' Phosphatende gelesen identisch in den beiden Strängen. Eingesetzt wird die Restriktionsanalyse eines PCR-Produkts zur Identifizierung von Schnittstellen für die Klonierung oder, wie in der vorliegenden Arbeit, zur Erkennung eines Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP). Ein RFLP entsteht aufgrund eines Polymorphismus an den Restriktionsschnittstellen und führt zu Unterschieden in der Größe aller Restriktionsfragmente.

Die Restriktionsendonuklease Bcl 1 entstammt dem *Bacillus caldolyticus* und erkennt die Sequenz T/GATCA. Diese Sequenz liegt in der Promotorregion des UCP1 Gens, 3826 bp strangaufwärts von der TATA Box, wenn das A-Allel des A→G (-3826) Polymorphismus vorliegt (Abbildung 5). Durch Inkubation mit Bcl 1 entstehen bei AA-Genotyp aus dem PCR-Produkt (Größe 279 bp) zwei Fragmente (157 bp und 122 bp). Das G-Allel, mit Austausch der Base Adenin durch Guanin (A→G), bewirkt eine Maskierung der Bcl 1 Schnittstelle. Daher schneidet Bcl 1 bei Vorliegen des GG-Genotyp nicht, das Fragment von 279 bp bleibt erhalten. Heterozygote Personen (AG) weisen alle drei Fragmentlängen (279 bp, 157 bp, 122 bp) auf. Da der GG-Genotyp durch den Verdau nicht verändert wird, wurde der Versuch bei allen GG-Genotypen zur Bestätigung des Genotyps wiederholt.

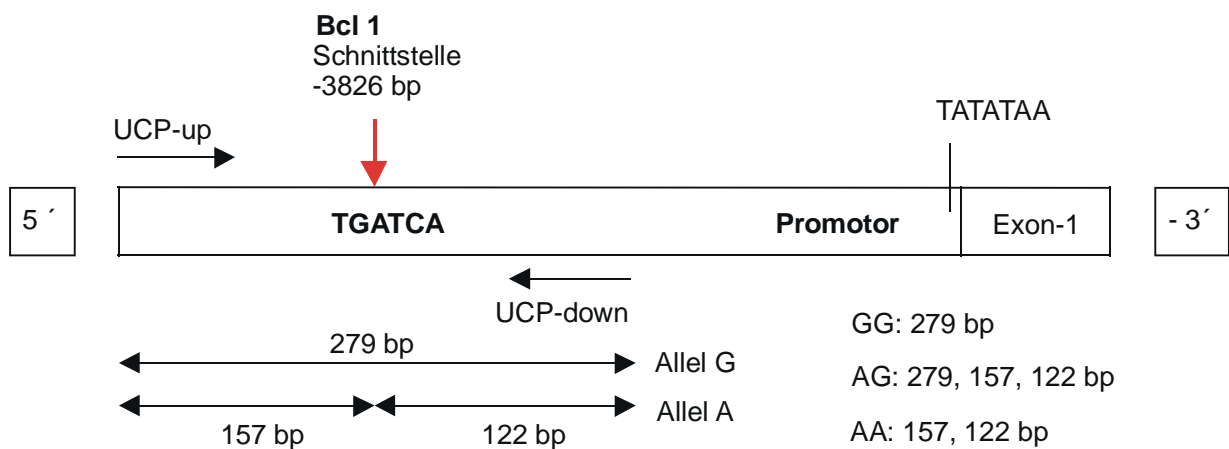


Abbildung 5 Promotorregion des UCP1 Gens.

Die Schnittstelle des Bcl1-Restriktionsenzym ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

UCP-up = Vorwärts Primer, UCP-down = Rückwärts-Primer

Zur Durchführung des Restriktionsverdau wurde das Enzym auf Eis verarbeitet, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern. Das Enzym, welches in einer Konzentration von 10 Units/ μ l vorlag, wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:7 mit dem mitgelieferten Inkubationspuffer M versetzt. Der Puffer M besteht aus 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 1 mM Dithioerythrit. Im Anschluß an die Amplifizierung wurden 2 μ l des Gemischs direkt in die Eppendorf-Gefäße gegeben. Die Proben wurden durch Schwenken gemischt. Im Wärmeschrank wurde unter leichtem Schwenken bei der empfohlenen Temperatur von 50°C für mindestens zwei Stunden, in der Regel jedoch über Nacht, inkubiert.

2.2.4 Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der Fragmente wurde nach dem Restriktionsverdau mit Bcl I eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandert DNA in Trägermedien im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit ist dabei proportional der Feldstärke und der Ionenladung und umgekehrt proportional der Viskosität des Mediums und dem Teilchenradius. Kürzere DNA-Fragmente laufen demnach schneller im Gel als längere, wodurch die Auftrennung von Fragmenten entsprechend ihrer Größe gelingt. Die einzelnen Schritte zur Durchführung einer Gel-Elektrophorese sind im folgenden beschrieben.

Gelherstellung

Die Viskosität eines Polyacrylamidgels wird durch das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt (hier 29:1) sowie durch die Acrylamid-Konzentration in der Gellösung (hier 10 %). Die Polymerisation des Gels wird durch die Vernetzung von Bisacrylamid in Acrylamid erreicht. Katalysatoren für diese Reaktion sind TEMED (0,2 %) und AMP (1 %). Polyacrylamid-Gele mit den Abmessungen 80 x 70 x 0,6 mm wurden in vertikalen Gießkassetten hergestellt, die sich aus je zwei Glasplatten zusammensetzen und über vier Klammern zusammengehalten werden. Eine der beiden Platten ist an den vertikalen Rändern mit zwei 0,6 mm dicken Glas-Spacern versehen. Zwischen den Platten wird zur Dichtung ein U-förmiges Gummi eingespannt. Für die Gellösung wurden 2,5 ml Acrylamid (40 %),

sowie 0,1 ml Ammoniumpersulfat 10 % und 0,025 ml TEMED mit 6,4 ml H₂O und 1 ml TBE 10x versetzt, so daß insgesamt ein Volumen von 10 ml mit 10 % Konzentration von Acrylamid vorlag. Die Lösung wurde durch leichtes Schwenken gemischt und luftfrei in die vorbereitete Gießkassette gegossen. Mit Hilfe eines Kunststoffkamms wurden 20 Taschen im Gel hergestellt. Nach wenigen Minuten war die Lösung polymerisiert. Der Kamm wurde vorsichtig herausgezogen und die nun entstandenen Taschen mit TBE 1x gespült. Das Gel ist jetzt gebrauchsfertig.

Elektrophorese

Nach Entfernung des Dichtungsgummis wurden die Glasplatten mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Anschließend wurden die Puffertanks der Trennkammern mit 1 x TBE als Pufferlösung gefüllt. 5µl der im Verhältnis 1:2 mit Loading Puffer versetzten Proben wurden vorsichtig in die Auftragetaschen einpipettiert. Jeweils die letzte Tasche wurde mit dem 1 kb DNA Ladder Marker versehen, um einen Standard zur Auswertung der Fragmentgrößen zu gewährleisten und die korrekte Reihenfolge der Proben sicherzustellen. Anode und Kathode wurden mit dem Stromgeber verbunden und eine Stromstärke von 30 mA für 30 Minuten eingestellt. Gel-Viskosität, Stromstärke und Laufdauer wurden so gewählt, daß eine gute Trennung der Restriktionsfragmente erreicht wurde.

2.2.5 Gelfärbemethoden

Nach der Elektrophorese liegen die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt vor, sind aber noch nicht sichtbar. Eine bewährte Methode zur Anfärbung von PCR-Produkten auf Polyacrylamidgelen ist die Ethidiumbromidfärbung, die hier als Standardverfahren eingesetzt wurde. In einigen Fällen wurde zusätzlich eine Silberfärbung durchgeführt, die im Vergleich zur Ethidiumbromidfärbung eine höhere Empfindlichkeit aufweist. Mit Hilfe des Standardmarkers wurde nun die Größe der Banden festgestellt und der Genotyp anhand des Musters der Fragmente bestimmt.

Ethidiumbromidfärbung

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-Ethyl-5-Phenanthridiumbromid) ist ein fluoreszierender Stoff, der sich an Doppelstrang DNA anlagert. Es handelt sich dabei um eine interkalative Substanz, deren Moleküle die Zwischenräume zwischen den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix besetzen. Daraus ergibt sich zum einen die Verwendung zur Anfärbung von PCR-Produkten innerhalb eines Gels, andererseits aber auch die mutagene Wirkung der Lösung. Die Färbung wird daher unter Verwendung besonderer Schutzmaßnahmen wie spezieller Handschuhe durchgeführt.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 5 µl Ethidiumbromid in 100 ml 1 x TBE verdünnt, die Konzentration betrug dann 50 µg Ethidiumbromid / 100 ml. Die Gele wurden für 5 – 10 Minuten in der Ethidiumbromidlösung geschwenkt, bis eine ausreichende Anlagerung von Ethidiumbromid erreicht wurde. Unter dem UV-Transilluminator werden die Gele bei einer Wellenlänge im Bereich 254 – 300 nm bestrahlt. Die DNA wird in Form fluoreszierender Banden sichtbar. Die Gele wurden mit einer Polaroid Kamera bei einer Belichtungszeit von 3 Sekunden für die Dokumentation fotografiert (Abbildung 3).

Silberfärbung

Das Prinzip der Silberfärbung ähnelt dem fotografischen Prozeß mit Silberhalogeniden. Dabei wird ausgenutzt, daß einwertige farblose Silberverbindungen wie Silberbromid (AgBr) oder Silbernitrat (AgNO₃) zu elementarem schwarzen Silber reduziert werden. Bei der Silberfärbung wird das Gel in Silbernitrat-Lösung gegeben. Silber-Ionen gehen mit Makromolekülen wie DNA, nicht jedoch mit Polyacrylamid, Komplexbildungen ein. Die komplex gebundenen Silber-Ionen werden durch Formaldehyd unter Ausbildung von Silberkeimen reduziert, wodurch das latente (unsichtbare) Bild entsteht. Durch das Entwickeln in alkalischer Carbonatlösung mit Formaldehyd (HCHO) wird die unmittelbare Umgebung der Silberkeime ebenfalls reduziert, wodurch das latente Bild zunehmend verstärkt wird. Mit Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃) werden nicht gebundene Silber-Ionen unter Bildung farbloser Bisargentat-Komplexe aus der Gelschicht herausgelöst. Das Überführen des Gels in Essigsäure unterbricht den Entwicklungsvorgang.

Die Silberfärbung wurde nach *Bassam et al.* (1991) durchgeführt. Zur Übersicht sind die Vorschriften zur Herstellung der Lösungen sowie die Dauer der einzelnen Schritte in Tabelle 12 zusammengefaßt. Im Anschluß an die Elektrophorese wird das Gel für mindestens 20 Minuten in 10 % Essigsäure gelegt. Es folgen drei kurze Waschgänge in destilliertem H₂O. Nun wird das Gel für 30 Minuten in Silbernitrat-Lösung inkubiert. Anschließend wird das Gel zunächst in Wasser, dann in 1/3 der vorbereiteten Carbonatlösung kurz geschwenkt. Zur Entwicklung der Banden wird das Gel in die restliche Carbonatlösung gegeben, die abgedunkelt einwirken muß. Unter wiederholten Sichtkontrollen wird die Ausprägung der Silberbanden verfolgt. Nach einer Zeit von 2 bis 15 Minuten werden Banden sichtbar, die in kurzer Zeit an Intensität zunehmen. Der Zeitpunkt zum Abbruch der Entwicklung ist gegeben, wenn die Farbtiefe der spezifischen Banden ausreichend ist und durch weiteres Einwirken nur das Verschleiern des Bildes erreicht wird. Das Gel wird für 20 Minuten in Essigsäure gewaschen und in Methanol 30 % und Glycerin 3 % fixiert.

Tabelle 12 Protokoll zur Durchführung einer Silberfärbung.

Schritt	Reagenzien	Mengen	Dauer
1. Fixierung	Essigsäure 10 %	100 ml	20 min
2. Waschen	Wasser	500 ml	3 x 2 min
3. Imprägnierung	Silbernitrat 10 %	2 ml	30 min
	Formaldehyd 37 %	150 µl	
	Wasser	100 ml	
4. Waschen	Wasser	200 ml	2 min
5. Entwicklung	Natriumcarbonat 10 %	60 ml	1 min 2-15 min
	Natriumthiosulfat 20 mg/ml	60 µl	
	Formaldehyd 37 %	300 µl	
	Wasser	140 ml	
6. Entwicklungsstop	Essigsäure 10 %	100 ml	20 min
7. Fixierung	Methanol 30 %		Bis zur Trocknung
	Glycerin 3 %		

Alle Lösungen werden eiskühlt verwendet.

2.3 Statistische Berechnungen

Für die statistische Auswertung wurden die Programme *Statistica* für Windows, Version 5.1, und *Microsoft Excel*, Version 97 verwendet. Die klinischen Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Bestimmung der Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen wurden nach der Genzähl-Methode ermittelt. Da A und G die einzigen Allele für den Locus des UCP1 Polymorphismus sind, sind die beiden Allelfrequenzen unmittelbar voneinander abhängig.

$$\text{Allelfrequenz A} = \frac{2N_{AA} + N_{AG}}{2N}$$

$$\text{Allelfrequenz G} = \frac{2N_{GG} + N_{AG}}{2N} = 1 - \text{Allelfrequenz A}$$

Hardy-Weinberg-Gesetz

Die Allelfrequenz A entspricht p , die Allelfrequenz G entspricht q . Daraus ergibt sich die folgende theoretische Verteilung der Genotypen. Für den Genotyp AA wird eine relative Häufigkeit von p^2 erwartet, für AG von $2pq$ und für GG von q^2 .

$$p + q = 1$$
$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = \frac{N'_{AA} + N'_{AG} + N'_{GG}}{N} = 1$$

Chi-Quadrat-Test

Die Verteilung von Häufigkeiten wurden mit dem Chi Quadrat Test statistisch ausgewertet. Chi-Quadrat (χ^2) ist das statistische Maß für die Abweichung von beobachteten und erwarteten Werten. Dazu wurden die Differenzen zwischen beobachteten und erwartetem Wert quadriert und durch den Erwartungswert dividiert. Die Summe der einzelnen Werte ergibt χ^2 .

$$\chi^2 = \sum \frac{(N_{\text{Beobachtet}} - N'_{\text{Erwartet}})^2}{N'_{\text{Erwartet}}}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade ist bestimmt durch die Zahl der Klassen, die beliebig festgesetzt werden können. Für die Hardy-Weinberg-Verteilung wurde ein Freiheitsgrad (df=1) angenommen, da die erwartete Verteilung nur von zwei Größen, den Frequenzen für Allel A und G abhängig ist. Damit liegt der kritische Wert für ein Signifikanzniveau von 95 % bei $\chi^2 = 3,84$.

Mann-Whitney-U-Test

Zur Beurteilung von Assoziationen des UCP1 Polymorphismus werden die Eigenschaften der durch den Genotyp definierten Gruppen verglichen. Bei dieser Untersuchung wird geprüft, ob sich die klinischen Werte der Personen in Abhängigkeit vom Genotyp unterscheiden. Der t-Test wird am häufigsten verwendet, um die Unterschiede zwischen parametrischen Kriterien in zwei Gruppen zu überprüfen. Der t-Test setzt jedoch Normalverteilung und Varianzhomogenität voraus. Diese Bedingungen waren hier nicht erfüllt. Daher wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, der auf Rangfolgen basiert. Die Unterschiede zwischen den Genotypen wurden zum einen für den Vergleich von Normaltyp und Heterozygoten, zum anderen für den Vergleich von Normaltyp und Homozygoten ermittelt.

3 Ergebnisse

Zunächst wird die UCP1 Genotypverteilung auf Unabhängigkeit vom Geschlecht und Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz geprüft. Die klinischen Werte Alter, BMI, Leptin und Lipidwerte aus dem Gesamtkollektiv werden auf Assoziationen mit dem Genotyp untersucht. Nach einer Gegenüberstellung der Patientenkollektive und der Untersuchung der Kontrollgruppe werden die Häufigkeiten der UCP1 Genotypen in den Kollektiven verglichen. Es folgt eine detaillierte Prüfung des Zusammenhangs von UCP1 Genotyp und BMI anhand der klinischen Werte und Vergleich der Genotypverteilung nach Einteilung der Patienten in Gewichtskategorien. Zuletzt werden Einflüsse des UCP1 Genotyps bei Patienten mit Diabetes mellitus und Dyslipidämien untersucht. Der Abschnitt schließt mit einer Zusammenfassung.

3.1 Verteilung des UCP1 Genotyps im Gesamtkollektiv

Für die Promotorregion des UCP1 Gens sind für die Position -3826 zwei Allele bekannt, das häufigere Allel A und das seltenere Allel G. Da jede Person zwei Allele besitzt, ergeben sich für UCP1 drei Genotypen, nämlich AA (Normaltyp), AG (Heterozygot) und GG (Homozygot). Im Gesamtkollektiv wurden 465 Normaltypen (N_{AA}), 349 Heterozygote (N_{AG}) und 63 Heterozygote (N_{GG}) vorgefunden. Nach der Genzähl-Methode wurden die Allelfrequenzen ermittelt. Die Allelfrequenz A beträgt 0,729, die Allelfrequenz G entsprechend 0,271.

Tabelle 13 Verteilung des UCP1 Genotyps im Gesamtkollektiv.

	AA	AG	GG	Gesamtkollektiv
Anzahl	465	349	63	887
Anteil [%]	53,0	39,8	7,8	100

3.1.1 UCP1 Genotypverteilung bei Männern und Frauen

Vor der weiteren Analyse wurde geprüft, ob die Verteilung der UCP1 Genotypen grundsätzliche Unterschiede bei Männern und Frauen zeigt. Bei einer ungleichen Genotypverteilung unter Männern und Frauen könnte bei den Allelfrequenzen der Kollektive oder bei den klinischen Werten eine Abhängigkeit vom Genotyp vorgetäuscht werden. Das Gesamtkollektiv wurde unter Berücksichtigung des Geschlechts in zwei Gruppen aufgeteilt. Neun Personen wurden nicht aufgenommen, da hier Angaben zum Geschlecht fehlten. In Tabelle 14 sind neben den gezählten Häufigkeiten die relativen Anteile aufgeführt sowie die Frequenz für das Allel G. Die Frequenz des Allels G ist bei Frauen mit 0,273 nur geringfügig höher als bei Männern mit 0,268 und ohne statistische Signifikanz ($P = 0,965$). Für die weiteren Untersuchungen von Allelfrequenzen wurden die Geschlechter daher zusammengefaßt.

Tabelle 14 Verteilung der UCP-Genotypen bei Männern und Frauen.

	AA	AG	GG	AA %	AG %	GG %	Allel G
Frauen	233	177	32	52,7	40,0	7,2	0,273
Männer	227	170	29	53,3	39,9	6,8	0,268

Chi-Quadrat = 0,071; Freiheitsgrade 2; P-Wert = 0,965.

Bei neun Personen aus dem Gesamtkollektiv ist das Geschlecht nicht bekannt.

3.1.2 Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz

Anhand der berechneten Allelfrequenzen wurde geprüft, ob die beobachtete Genotypverteilung im Gleichgewicht nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz ist. Die Unterschiede von beobachteter und erwarteter Verteilung ergeben ein Chi-Quadrat von 0,051 und einen p-Wert von 0,82. Daraus folgt, daß die Genotypverteilung in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz ist. Die Daten wurden in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15 Verteilung der Genotypen im Gesamtkollektiv.

Genotyp	Beobachtet		Erwartet		(B-E) ² /E
	Anzahl	Anteil (%)	Anzahl	Anteil (%)	
AA	465	53,0 %	466,3	53,2 %	0,003
AG	349	39,8 %	346,3	39,5 %	0,020
GG	63	7,2 %	64,3	7,3 %	0,027
Summe	877	100 %	877	100 %	0,050

$\chi^2 = 0,050$, Freiheitsgrad = 1, $P = 0,82$.

3.1.3 Assoziationen des UCP1 Genotyps mit klinischen Daten

In den durch den UCP1 Polymorphismus bestimmten Gruppen war der BMI sehr ähnlich mit 38,3 kg/m² bei Normaltypen, 37,7 kg/m² bei Heterozygoten und 38,6 kg/m² bei Homozygoten (nicht signifikant). Auch die Leptinwerte zeigten keine signifikanten Abweichungen zwischen den Genotypen mit 27,2 ng/ml bei AA-Genotyp, 26,4 ng/ml bei AG-Genotyp und 22,9 ng/ml bei GG-Genotyp. Dabei war überraschend, daß bei GG-Genotyp im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen der niedrigste Leptinwert und der höchste BMI vorkam. Der Anteil an Diabetikern in den drei Gruppen lag zwischen 22 und 23 Prozent.

Bei den Lipidwerten traten Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp auf. Für Normaltypen wurden für HDL-Cholesterin und Apoprotein A mit 42,9 mg/dl bzw. 128 mg/dl höhere Werte als für Heterozygote mit 40,7 mg/dl bzw. 125 mg/dl festgestellt ($P = 0,016$ bzw. $P = 0,032$). Das LDL-Cholesterin war bei Normaltypen mit 137 mg/dl niedriger als bei Heterozygoten mit 145 mg/dl (nicht signifikant). Entsprechend war die HDL/LDL Ratio mit 3,4 bei AA-Genotyp günstiger als mit 3,8 bei AG-Genotyp ($P = 0,005$). Bei Heterozygoten wurden im Vergleich zu Normaltypen insgesamt ungünstigere Lipidwerte beobachtet. Dagegen zeigten Homozygote im Verhältnis zu Heterozygoten und zu Normaltyp günstige Lipidwerte. Diese Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant, eventuell aufgrund der kleinen Fallzahlen des GG-Genotyps. Die Werte sind in Tabelle 16 aufgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Tabelle 16 Charakterisierung des Gesamtkollektivs (N = 877) unter Berücksichtigung des Genotyps.

		AA (n = 465)	AG (n = 349)	<i>P</i>	GG (n = 63)	<i>P</i>
Diabetes	%	22,1	23,1	0,738	23,0	0,881
Alter	Jahre	49 ± 14	48 ± 14	0,237	50 ± 13	0,425
BMI	kg/m ²	38 ± 14	38 ± 14	0,739	39 ± 16	0,945
Leptin	ng/ml	27 ± 33	26 ± 29	0,990	23 ± 5	0,704
Gesamt-Chol.	mg/dl	222 ± 71	226 ± 69	0,368	220 ± 60	0,919
Triglyzeride	mg/dl	208 ± 208	221 ± 319	0,217	217 ± 304	0,556
HDL-Chol.	mg/dl	43 ± 14	41 ± 13	0,016	44 ± 14	0,539
LDL-Chol.	mg/dl	137 ± 55	145 ± 60	0,066	135 ± 44	0,926
LDL/HDL	Ratio	3,4 ± 1,6	3,8 ± 1,9	0,005	3,2 ± 1,7	0,295
VLDL-Chol.	mg/dl	32 ± 16	33 ± 16	0,108	29 ± 14	0,447
Apo A₁	mg/dl	128 ± 25	125 ± 25	0,032	131 ± 22	0,315
Apo B	mg/dl	115 ± 41	120 ± 43	0,089	108 ± 32	0,216

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht und Diabetes die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$) sind fettgedruckt.

Zusammenfassung zur Verteilung des UCP1-Polymorphismus im Gesamtkollektiv

Die Verteilung des UCP1-Polymorphismus im Gesamtkollektiv ist in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Es zeigt sich keine Abhängigkeit vom Geschlecht. Der BMI der drei Genotypen ist vergleichbar. Bei Heterozygoten wurden im Vergleich zu Normaltypen ungünstigere Werte für HDL-Cholesterin, Apoprotein A und HDL/LDL Ratio festgestellt.

3.2 Analyse der Patientenkollektive

Die Gesamtstichprobe wurde aus sechs verschiedenen Kollektiven rekrutiert, die im Abschnitt 2 näher klassifiziert wurden. Um einen Überblick über die Besonderheiten der Kollektive zu ermöglichen, wurden die Häufigkeiten bestimmter Eigenschaften in den einzelnen Gruppen gegenübergestellt (Tabelle 17). Die Kollektive weisen dem jeweiligen Selektionskriterium entsprechende Unterschiede auf, darüber hinaus variiert die Verteilung von unspezifischen Merkmalen wie Alter und Geschlecht. Jüngere Patienten kommen mit 83 % vor allem im Adipositas Kollektiv sowie im Hypercholesterin und im Hyperlipoproteinämie (HLP) Kollektiv vor. Der Anteil an Frauen liegt zwischen 81 % bei den morbid Adipösen und 22 % im Hyperlipoproteinämie Kollektiv. Der Anteil an Diabetikern lag zwischen 100 % im Diabetes Kollektiv und 0 % bei Blutspendern.

Tabelle 17 Häufigkeiten bestimmter Eigenschaften in den sechs Kollektiven.

		Adipositas	Blutbank	Hypercholesterin	HLP	Diabetes	Station
Anzahl	N	304	199	97	97	86	94
Männer	%	19	69	57	78	58	59
Frauen	%	81	31	43	22	42	41
Alter < Median*	%	83	34	56	48	8	0
Diabetes mellitus	%	21	0	2	27	100	21
BMI ≥ 30 kg/m ²	%	100	n.b.	6	25	34	11
BMI ≥ 40 kg/m ²	%	97	n.b.	1	0	4	0
Hohes Leptin **	%	94	11	n.b.	n.b.	18	n.b.
Tg ≥ 150 mg/dl	%	50	35	35	100	61	43
LDL ≥ 150 mg/dl	%	22	23	82	60	13	22
HDL < 40 mg/dl	%	46	26	41	77	69	46

*Median des Alters ist 48 Jahre. **, Als Grenzwert für hohes Leptin wurde für Männer 15 pg/ml und für Frauen 30 pg/ml festgelegt. Bei Blutspendern wurde der BMI nicht bestimmt (n.b.). Leptin wurde nicht bei allen Personen bestimmt (n.b.). Die dem Einschlußkriterium entsprechenden Werte sind fett gedruckt.

Eine Adipositas konnte erwartungsgemäß bei allen Patienten im Adipositas Kollektiv festgestellt werden, außerdem bei 34 % der Diabetiker und 25 % der HLP Patienten. Eine morbide Adipositas ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) wurde bei 97 % der Adipositas Patienten festgestellt, ansonsten nur in Einzelfällen. Bei Blutspendern und einem Teil der Adipositas und Diabetes Patienten sind Leptinwerte bekannt. Leptinwerte korrelieren mit dem BMI. 94 % der Patienten mit morbidem Adipositas hatten hohe Leptinwerte. Bei Diabetikern und Blutspendern waren es mit 18 % bzw. 11 % wesentlich weniger.

Die Häufigkeiten von auffälligen Lipidwerten wurden bestimmt. Für die Bevölkerung wird eine Prävalenz der Hyperlipoproteinämie von 20 bis 40 % angegeben. Erwartungsgemäß hatten alle HLP-Patienten erhöhte Triglyzeride. Im Hypercholesterinämie Kollektiv hingegen hatten nicht alle Patienten erhöhte LDL-Cholesterinwerte. Bei 18 % lagen die aufgenommenen Werte unter dem Grenzwert von 150 mg/dl. Es handelt sich hierbei um Patienten aus der Lipidambulanz mit bekannter Hypercholesterinämie, bei denen nur Werte unter Therapie mit Lipidsenkern verfügbar waren. Erhöhte LDL-Cholesterinwerte wurden zudem bei 60 % der HLP Gruppe und bei rund 20 % der übrigen Personen beobachtet. Niedrige HDL-Werte sind in allen Kollektiven vertreten, von 77 % und 69 % in der HLP- und der Diabetes Gruppe über 46 % bei Adipositas- und stationären Patienten. Im Diabetes und Adipositas Kollektiv lag bei 61 % bzw. 50 % der Patienten auch eine Hypertriglyzeridämie vor.

3.2.1 Eignung der Kontrollgruppe

Blutspender wurden als Kontrollgruppe eingesetzt, da diese eine zufällige Auswahl an gesunden Personen der durchschnittlichen Bevölkerung repräsentieren. Nachteilig ist die fehlende Angabe des BMI. Um die Aussagekraft als Vergleichskollektiv abzuschätzen, wurden die Leptinwerte der Blutspender gewählt. Bei übergewichtigen Menschen korrelieren die Plasma-Leptinspiegel mit der Menge an Fettgewebe. Erhöhte Werte liefern einen Anhaltspunkt für das Vorliegen einer Adipositas, wobei die Werte bei Frauen etwa doppelt

so hoch sind wie bei Männern. Weiterhin finden sich bei Adipösen häufig Veränderungen der Lipidwerte, insbesondere erhöhte Triglyzeride und erniedrigte HDL-Cholesterinwerte.

Die klinischen Daten der Blutspender und der Patienten mit morbidem Adipositas wurden in Tabelle 18 gegenübergestellt. Im Adipositas-Kollektiv waren die Leptinwerte deutlich höher als bei Blutspendern ($P < 0,001$). Auch die Triglyzeride und die HDL-Cholesterinwerte zeigten signifikante Unterschiede zwischen Blutspendern und Adipositas Patienten. Zudem war auch das Alter der beiden Personengruppen verschieden. Zusammenfassend wird festgestellt, daß die Blutspender als Kontrollgruppe im Vergleich zum Adipositas Kollektiv geeignet sind, auch wenn diese deutlich älter sind.

Tabelle 18 Vergleich von Blutspendern und Adipositas Patienten.
Oben: Männer. Unten: Frauen

		Blutspender	Adipositas	<i>P</i>
<u>Männer</u>	Anzahl	138	58	
Leptin	ng/ml	7 ± 5	38 ± 18	< 0,001
Triglyzeride	mg/dl	154 ± 83	264 ± 182	< 0,001
HDL-Cholesterin	mg/dl	45 ± 12	34 ± 7	< 0,001
Alter	Jahre	51 ± 6	39 ± 9	< 0,001
<u>Frauen</u>	Anzahl	61	246	
Leptin	ng/ml	18 ± 13	68 ± 34	< 0,001
Triglyzeride	mg/dl	109 ± 66	161 ± 78	< 0,001
HDL-Cholesterin	mg/dl	56 ± 13	43 ± 10	< 0,001
Alter	Jahre	50 ± 6	38 ± 9	< 0,001

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.
Der P-Wert wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

3.2.2 Vergleich der Allelfrequenzen in sechs Kollektiven

Die Verteilung des UCP1 Genotyps in diesen Untergruppen wurde mit der Fragestellung, ob der UCP-Polymorphismus in einem der Kollektive auffällig häufig vorkommt, geprüft. Von besonderem Interesse war der Vergleich der Patienten mit morbidem Adipositas und der Blutspender.

Die höchste Allelfrequenz G wurde mit 0,293 bei den stationären Patienten aus der medizinischen Klinik vorgefunden. Im Diabetes Kollektiv wurde mit 0,244 die niedrigste Allelfrequenz bestimmt. Hypercholesterin und Adipositas Kollektive liegen mit Allelfrequenzen von 0,289 und 0,276 über dem Mittel, Blutspender und Hyperlipoproteinämie Patienten liegen mit 0,259 und 0,263 darunter. In Abbildung 6 sind die relativen Anteile von AG und GG Genotyp als Stapelbalken (linke Y-Achse) und die Allelfrequenz G als Linie (rechte Y-Achse) eingezeichnet.

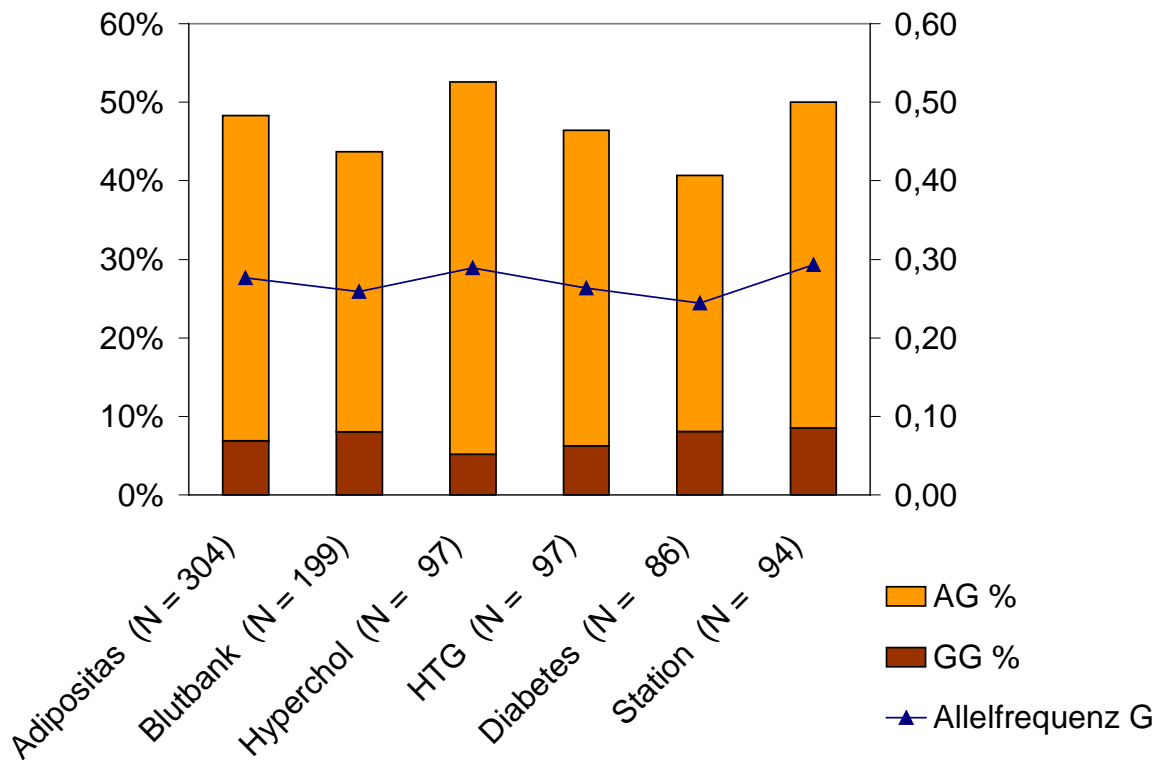


Abbildung 6 Verteilung des UCP1 Genotyps in den sechs Kollektiven.

Bei der Betrachtung der Allelfrequenzen wird deutlich, daß es sich um relativ geringe Unterschiede zwischen den Kollektiven handelt. Die Verteilung der UCP1 Genotypen in den sechs Kollektiven war insgesamt statistisch unauffällig mit Chi-Quadrat von 6,83, $df=10$ und $P = 0,741$ (vergleiche Tabelle 19). Auch die für Frauen und Männer getrennt durchgeführte Analyse ($P = 0,360$; $P = 0,927$), genauso wie die direkte Gegenüberstellung der Kollektive mit höchster und niedrigster beobachteter Allelfrequenz (Chi-Quadrat = 1,07; $df = 2$; $P = 0,30$), ergab keine signifikanten Unterschiede (Werte nicht gezeigt).

Tabelle 19 Chi-Quadrat der Verteilung der UCP-Genotypen in den Kollektiven. Oben: Beobachtete Verteilung. Unten: Erwartete Verteilung.

Beobachtet	AA	AG	GG	Summe	AA %	AG %	GG %	Allel G
Adipositas	157	126	21	304	51,6	41,4	6,9	0,276
Blutbank	112	71	16	199	56,3	35,7	8,0	0,259
Diabetes	51	28	7	86	59,3	32,6	8,1	0,244
Station	47	39	8	94	50,0	41,5	8,5	0,293
Hypercholesterin	46	46	5	97	47,4	47,4	5,2	0,289
HTG	52	39	6	97	53,6	40,2	6,2	0,263
Erwartet	AA	AG	GG	Summe	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	Summe
Adipositas	161,2	121,0	21,8	304	0,11	0,21	0,03	0,35
Blutbank	105,5	79,2	14,3	199	0,40	0,85	0,20	1,45
Diabetes	45,6	34,2	6,2	86	0,64	1,13	0,11	1,88
Station	49,8	37,4	6,8	94	0,16	0,07	0,23	0,46
Hypercholesterin	51,4	38,6	7,0	97	0,57	1,42	0,56	2,55
HTG	51,4	38,6	7,0	97	0,01	0,00	0,13	0,14
Summe	465	349	63	877	1,89	3,68	1,27	6,83

Chi-Quadrat = 6,83; Freiheitsgrade 10; P-Wert = 0,741.

Die Prozentanteile der Homozygoten hatten eine relativ kleine Spannbreite in den Untergruppen zwischen 5,2 % bei Patienten mit Hypercholesterinämie und 8,5 % bei Patienten aus der Medizinischen Klinik. Viel stärker schwankten dagegen die Anteile der Normaltypen (59,3 % und 47,4 %) und der Heterozygoten (32,6 bis 47,4 %). Diese Extreme wurden zum einen bei den Diabetikern gefunden zum anderen bei den Patienten mit Hypercholesterinämie. Möglicherweise sind die Abweichungen durch die niedrigen Fallzahlen von nur 86 und 97 zu erklären. Die Verteilung der Genotypen in diesen beiden Gruppen entspricht weniger gut dem Hardy-Weinberg-Gesetz mit Chi-Quadrat von 2,32 ($P = 0,13$) im Hypercholesterin Kollektiv und 1,20 ($P = 0,27$) im Diabetes Kollektiv. Werden die drei Kollektive aus der Poliklinik, d.h. Patienten mit Hypercholesterinämie, Hyperlipoproteinämie und Diabetes mellitus zu einer Gruppe mit 280 Fällen zusammengefaßt, ergibt sich eine Allelfrequenz von 0,266. Die Verteilung ist dann in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz ($P = 0,58$).

Zusammenfassung der Analyse der Patientenkollektive

Die Kollektive weisen starke Unterschiede entsprechend der Einschlußkriterien auf. Zudem gibt es eine auffällige Verteilung von Alter und Geschlecht in den Kollektiven. Die Blutspender sind aufgrund der Analyse der Leptin und Lipidwerte als Kontrollgruppe zum Adipositas-Kollektiv geeignet, auch wenn der BMI unbekannt ist. Die Verteilung des UCP1 Genotyps in den sechs Kollektiven zeigt keine signifikanten Unterschiede.

3.3 UCP1 Genotyp und BMI

Um den Zusammenhang von Körpergewicht und UCP1 Genotyp genauer zu untersuchen, wurden die Patienten gemäß der WHO-Klassifikation eingeteilt in Normalgewichtige (BMI 18 – 25 kg/m²), Übergewichtige (BMI 25 – 30 kg/m²) und Adipöse mit den Katego-

rien BMI 30 – 40 kg/m² und BMI ≥ 40 kg/m². Als Kontrollgruppe wurden die gesunden Blutspender eingesetzt. Aufgrund fehlender Angaben zum BMI wurden 20 Personen nicht berücksichtigt.

3.3.1 Allelfrequenzen nach BMI-Kategorien

Insgesamt zeigt die Verteilung der UCP1 Genotypen nach Gewichtskategorien keinen einheitlichen Trend. Die höchste Allelfrequenz wurde mit 0,308 in der Kategorie BMI 25-30 kg/m² beobachtet, die niedrigste mit 0,246 bei BMI 30-40 kg/m². Morbid Adipöse und Normalgewichtige haben nahezu die gleiche Allelfrequenz mit 0,268 und 0,269, die Allelfrequenz der Blutspender ist mit 0,259 geringfügig niedriger (Abbildung 7). Der Anteil der AA-Genotypen beträgt zwischen 44,5 % und 60,9 %, und der Anteil der Heterozygoten bzw. der Homozygoten zwischen 29,0 % und 49,3 % bzw. zwischen 6,2 % und 10,1 %.

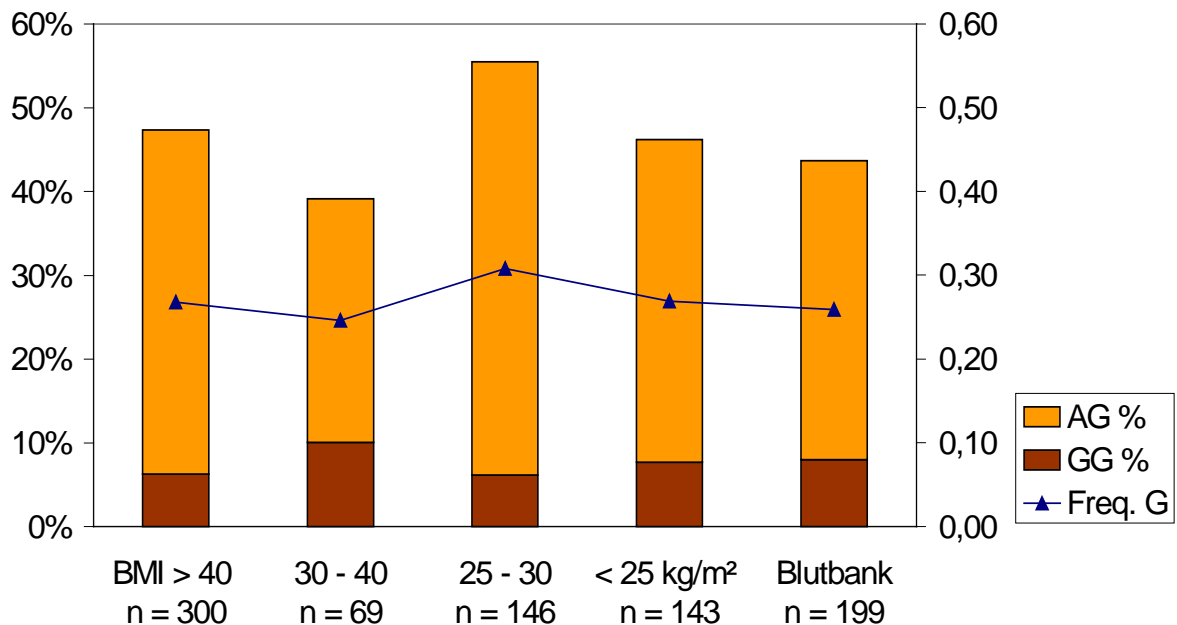


Abbildung 7 Relative Anteile der UCP1 Genotypen nach BMI – Kategorien.

Mit dem Chi-Quadrat Test wurde die Verteilung des UCP1 Genotyps in den Gewichtskategorien geprüft (Tabelle 20). Die Unterschiede waren nicht signifikant ($P = 0,19$). Auch die nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse erbrachte keine statistischen Auffälligkeiten mit Chi-Quadrat von 4,35 ($P = 0,82$) für Frauen und 11,0 ($P = 0,20$) für Männer (nicht gezeigt). In der Kategorie BMI 30 – 40 kg/m² wurde eine ungewöhnliche Verteilung mit niedrigem Anteil an Heterozygoten (29,0 %) und hohem Anteil von Homozygoten (10,1 %) beobachtet ($P = 0,068$). Möglicherweise sind diese Abweichungen durch die geringe Fallzahl von 72 zu erklären. In der Gruppe BMI 25 – 30 kg/m² fällt der hohe Anteil der Heterozygoten (49,3 %) bei gleichzeitig niedrigem Prozentsatz an Homozygoten (6,2 %) auf.

Tabelle 20 Chi-Quadrat der Verteilung der UCP-Genotypen in den vier Gewichtskategorien und bei den Blutspendern.

Beobachtet	AA	AG	GG	Summe	AA %	AG %	GG %	Allel G
BMI \geq 40	158	123	19	300	52,7	41,0	6,3	0,268
BMI 30 – 40	42	20	7	69	60,9	29,0	10,1	0,246
BMI 25–30	65	72	9	146	44,5	49,3	6,2	0,308
BMI < 25	77	55	11	143	53,8	38,5	7,7	0,269
Blutbank	112	71	16	199	56,3	35,7	8,0	0,259
Erwartet	AA	AG	GG	Summe	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	Summe
BMI \geq 40	158,9	119,4	21,7	300	0,01	0,11	0,34	0,45
BMI 30 – 40	36,6	27,5	5,0	69	0,81	2,02	0,81	3,64
BMI 25 – 30	77,3	58,1	10,6	146	1,97	3,33	0,23	5,53
BMI < 25	75,8	56,9	10,3	143	0,02	0,06	0,04	0,13
Blutbank	105,4	79,2	14,4	199	0,41	0,85	0,18	1,43
Summe	454	341	62	857	3,22	6,37	1,60	11,19

Chi-Quadrat = 11,19; Freiheitsgrade 8; P-Wert = 0,191.

3.3.2 Klinische Werte von Adipösen, Normalgewichtigen und Blutspendern

Der Einfluß des UCP1 Genotyp auf die klinischen Werte wurde für Patienten mit morbid Adipositas (N = 304) und für Patienten mit einem BMI < 30 kg/m² (N = 288) getrennt geprüft. Auf diese Weise wurden in Hinblick auf den BMI zwei relativ homogene Gruppen hergestellt, in denen auch feinere Unterschiede analysiert werden können. Für die Untersuchung von Normalgewichtigen wurden aus der Gesamtstichprobe alle Personen mit einem BMI < 30 kg/m² ausgewählt. Als Vergleichsgruppe wurden die Blutspender aufgeführt.

Patienten mit morbid Adipositas

Im Adipositas Kollektiv war der mittlere BMI mit 53 kg/m² bei Homozygoten am höchsten. Dieses wurde durch hohe Werte bei homozygoten Frauen (55 kg/m²) verursacht, während bei homozygoten Männern ein Mittelwert von 46 kg/m² bestimmt wurde. Normaltypen und Heterozygote hatten mit 52 kg/m² bzw. 51 kg/m² einen geringfügig niedrigeren BMI als Homozygote. Keiner dieser Unterschiede war statistisch signifikant. Die Leptinwerte der Normaltypen lagen mit einem Durchschnitt von 64 ng/ml höher als Heterozygoten (57 ng/ml) und Homozygoten (58 ng/ml). Diese Unterschiede sind durch den höheren Anteil an Frauen bei den Normaltypen mit 82,2 % gegenüber 79,4 % und 81,0 % bei den Heterozygoten bzw. Homozygoten zu erklären.

Beim Vergleich der drei Gruppen wurde festgestellt, daß die Träger des G-Allels im Vergleich zu AA-Genotyp jünger sind. Das Durchschnittsalter betrug 40 Jahre bei AA-Genotyp und 37 bzw. 38 Jahre bei AG- bzw. GG-Genotyp. Für den Vergleich von AA-Genotyp und AG-Genotyp war dieser Unterschied signifikant (Mann-Whitney-U-Test: P = 0,016). Die Unterschiede zwischen AA- und GG-Genotyp waren, möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl des GG-Genotyps, nicht statistisch signifikant. Der Vergleich von Normaltypen gegenüber G-Allel-Trägern (AG und GG Genotyp) ergab hingegen ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied (P = 0,014). Auch bei separater Betrachtung von Männern und Frauen waren Unterschiede in der Altersverteilung zu beobachten, bei Frauen betrug die Mittelwerte 39, 36, 38 Jahre, bei Männern 41, 38 und 34 Jahre.

Die Mittelwerte für HDL-Cholesterin betragen für AA-, AG- und GG- Träger 42,3, 39,5 und 43,1 mg/dl. Die Unterschiede zwischen AA-Genotyp und AG-Genotyp waren statistisch signifikant ($P = 0,043$). Die nach Geschlecht getrennt durchgeführte Analyse ergab ähnliche Ergebnisse. Die entsprechenden Werte für Frauen waren 43,7, 41,1 und 45,2 mg/dl. Bei Männern lagen die Werte erwartungsgemäß insgesamt niedriger. Auch hier hatten Heterozygote mit 33,5 mg/dl niedrigeres HDL-Cholesterin als Normaltypen mit 35,8 mg/dl, die niedrigsten Werte wurden jedoch bei Homozygoten mit 30,7 mg/dl festgestellt. Die übrigen Lipidwerte sind zwischen den Genotypen nicht signifikant verschieden. In Tabelle 21 wurden die Daten der Adipositas-Patienten für die drei Genotypen zusammengefaßt.

Tabelle 21 Eigenschaften des Adipositas Kollektivs (N = 304) unter Berücksichtigung des UCP1 Genotyps.

	AA	AG	P	GG	P
Geschlecht w %	82,2	79,4	0,551	81,0	0,892
Diabetes %	20,4	20,6	0,958	23,8	0,717
Alter Jahre	40 ± 10	37 ± 8	0,016	38 ± 11	0,288
BMI kg/m ²	52 ± 8	51 ± 8	0,354	53 ± 10	0,467
Leptin* ng/ml	64 ± 39	58 ± 26	0,983	58 ± 23	0,944
Gesamt-Chol. mg/dl	206 ± 37	206 ± 37	0,870	211 ± 46	0,900
Triglyzeride mg/dl	177 ± 111	187 ± 118	0,462	160 ± 88	0,625
LDL-Chol. mg/dl	128 ± 30	130 ± 32	0,710	131 ± 27	0,676
HDL-Chol. mg/dl	42 ± 11	39 ± 9	0,043	43 ± 9	0,414
LDL/HDL Ratio	3,2 ± 1,1	3,5 ± 1,3	0,259	3,2 ± 1,4	0,571
VLDL-Chol mg/dl	33 ± 15	32 ± 12	0,683	32 ± 18	0,810
Apo A ₁ mg/dl	128 ± 24	125 ± 22	0,145	130 ± 31	0,493
Apo B mg/dl	112 ± 27	116 ± 32	0,471	113 ± 32	0,861

* Leptin wurde nur bei 128 Patienten bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht und Diabetes die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Die statistisch signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$) sind fett gedruckt.

Patienten ohne Adipositas (BMI < 30 kg/m²)

In der Untergruppe der 288 Patienten ohne Adipositas (BMI < 30 kg/m²) war der BMI der Heterozygoten mit 25,1 kg/m² signifikant höher als der BMI der Normaltypen mit 24,3 kg/m² (P = 0,026). Der Unterschied im BMI war auch beim Vergleich von G-Allel-Trägern mit Normaltypen signifikant (P = 0,04). Homozygote lagen mit einem BMI von durchschnittlich 24,4 kg/m² dazwischen (nicht signifikant). Auffällig war, daß der Leptinwert bei AA-Genotyp mit 10,2 ng/ml am höchsten war, während er bei AG- bzw. GG-Genotyp 9,6 bzw. 6,9 ng/ml betrug (nicht signifikant). Dabei ist zu beachten, daß Leptin nur bei einem kleinen Teil der Patienten (N = 52) bestimmt wurde, so daß die Aussagekraft des Vergleichs eingeschränkt ist. Die Werte sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22 Eigenschaften der 288 Patienten ohne Adipositas (BMI < 30 kg/m²) unter Berücksichtigung des Genotyps

	AA	AG	P	GG	P
Geschlecht w %	37,3	39,4	0,730	47,4	0,398
Diabetes %	29,5	30,1	0,918	31,6	0,852
Alter Jahre	56 ± 17	57 ± 15	0,737	60 ± 11	0,431
BMI kg/m²	24,3 ± 3,0	25,1 ± 3,0	0,026	24,4 ± 2,9	0,861
Leptin* ng/ml	10 ± 12	10 ± 10	0,678	7 ± 5	0,808
Gesamt-Chol. mg/dl	251 ± 104	258 ± 95	0,435	242 ± 79	0,838
Triglyzeride mg/dl	234 ± 233	284 ± 495	0,107	283 ± 478	0,674
LDL-Chol. mg/dl	159 ± 81	173 ± 85	0,198	160 ± 66	0,716
HDL-Chol. mg/dl	42 ± 16	40 ± 15	0,190	42 ± 17	0,929
LDL/HDL Ratio	4,0 ± 2,1	4,6 ± 2,4	0,045	4,0 ± 2,4	0,891
VLDL-Chol. mg/dl	30 ± 16	36 ± 17	0,017	25 ± 7	0,391
Apo A ₁ mg/dl	121 ± 28	123 ± 31	0,838	125 ± 27	0,603
Apo B mg/dl	131 ± 52	138 ± 55	0,408	114 ± 33	0,268

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, bzw. für das Kriterium Geschlecht die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für Unterschiede zwischen AA-Genotyp und AG- bzw. GG-Genotyp. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind fett gedruckt.

Heterozygote hatten höhere Werte für Triglyzeride (284 mg/dl), LDL- und VLDL-Cholesterin (173 und 35,6 mg/dl) als Normaltypen (234, 159, 30,2 mg/dl). Diese Unterschiede waren für VLDL-Cholesterin statistisch signifikant ($P = 0,017$). Außerdem war das HDL-Cholesterin bei Heterozygoten mit 39,6 mg/dl niedriger als bei Normaltypen mit 41,8 mg/dl (nicht signifikant). Entsprechend war das Verhältnis LDL / HDL mit 4,6 bei AG-Genotyp ungünstiger als bei AA-Genotyp mit 4,0 ($P = 0,045$). Die Lipidwerte bei Homozygoten waren im allgemeinen günstiger als bei Heterozygoten und entsprachen eher denen der Normaltypen. Eine Ausnahme bildeten die Triglyzeride, die bei Homozygoten mit 283 mg/dl ähnlich hoch waren wie bei Heterozygoten. Die Altersverteilung zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Blutspender

Bei den morbid Adipösen war aufgefallen, daß G-Allel-Träger im Vergleich zu Normaltypen jünger waren und niedrigere HDL-Werte hatten. Daher war es von besonderem Interesse, diese Untersuchung mit gesunden normalgewichtigen Personen zu wiederholen. Hierzu wurden die Blutspender eingesetzt.

Im Kollektiv der Blutspender war der BMI nicht bekannt. Die Leptinwerte wurden bestimmt, um einen Rückschluß auf das Körpergewicht der Blutspender zu ermöglichen, da Leptinwerte nachweislich eine starke Korrelation mit dem BMI aufweisen. In Tabelle 23 sind die klinischen Daten in Prozenz bzw. als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Anders als in den vorangegangenen Untersuchungen zeigte weder die Verteilung des Alters noch die Verteilung der Lipidwerte signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom UCP1 Genotyp. Auch die Leptinwerte waren ohne Auffälligkeiten unter den UCP1 Genotypen verteilt. Bei Blutspendern wurden insgesamt keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Tabelle 23 Eigenschaften der 199 Blutspender in Abhängigkeit des UCP1 Genotyps.

	AA	AG	<i>P</i>	GG	<i>P</i>
Geschlecht w %	32,2	30,0	0,715	25,0	0,566
Alter Jahre	50 ± 6	50 ± 6	0,764	52 ± 5	0,168
Leptin* ng/ml	11 ± 11	9 ± 8	0,232	10 ± 8	0,991
Gesamt-Chol. mg/dl	202 ± 33	205 ± 36	0,648	197 ± 27	0,727
Triglyzeride mg/dl	141 ± 81	140 ± 84	0,903	137 ± 69	0,911
LDL-Chol. mg/dl	126 ± 31	130 ± 34	0,545	118 ± 24	0,332
HDL-Chol. mg/dl	48 ± 14	47 ± 13	0,762	52 ± 14	0,247
LDL/HDL Ratio	2,9 ± 1,1	3,0 ± 1,3	0,482	2,4 ± 0,9	0,154
VLDL-Chol. mg/dl	28 ± 16	28 ± 17	0,942	27 ± 14	0,883
Apo A ₁ mg/dl	137 ± 18	135 ± 17	0,592	141 ± 17	0,232
Apo B mg/dl	94 ± 21	98 ± 24	0,315	88 ± 19	0,276

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Der BMI ist bei Blutspendern nicht bekannt.

3.3.3 Zusammenhang von BMI und Alter bei UCP1 Genotyp

Aufgrund der Beobachtung, daß in der Adipositas-Gruppe G-Allel-Träger jünger sind als Normaltypen, wurde geprüft, ob der UCP1 Polymorphismus bei jungen Adipösen besonders häufig auftritt. Die Gesamtstichprobe wurde aufgeteilt in jüngere und ältere Personen in Anlehnung an den Median des Alters (48,6 Jahre). Die Allelfrequenzen waren mit 0,270 und 0,272 ähnlich in beiden Gruppen ($P = 0,12$). Anschließend wurden die Personen in Adipöse und Schlanke aufgeteilt.

Allelfrequenzen in BMI-Kategorien bei Patienten unter 48 Jahre

Bei morbid Adipösen und bei Personen mit BMI 25-40 kg/m² unter 48 Jahre lag der Anteil an Normaltypen bei 48,6 % und 45,0 %, während bei Schlanken und Blutspendern 61,4 % bzw. 62,7 % beobachtet wurden (Tabelle 24). Dabei betrug die Allelfrequenz G bei Übergewichtigen 0,289 Tabelle 24 bzw. 0,308 und war damit deutlich höher als bei Schlanken und Blutspendern mit 0,216 bzw. 0,201 (Tabelle 24).

Tabelle 24 UCP1 Genotyp in vier BMI Kategorien bei jüngeren Personen.

	AA	AG	GG	N	AA %	AG %	GG %	Allel G
BMI ≥ 40 kg/m ²	120	111	16	247	48,6	44,9	6,5	0,289
BMI 25 – 40 kg/m ²	27	29	4	60	45,0	48,3	6,7	0,308
BMI < 25 kg/m ²	27	15	2	44	61,4	34,1	4,5	0,216
Blutbank kg/m ²	42	23	2	67	62,7	34,3	3,0	0,201

Chi-Quadrat = 7,27; Freiheitsgrade 6. P = 0,297

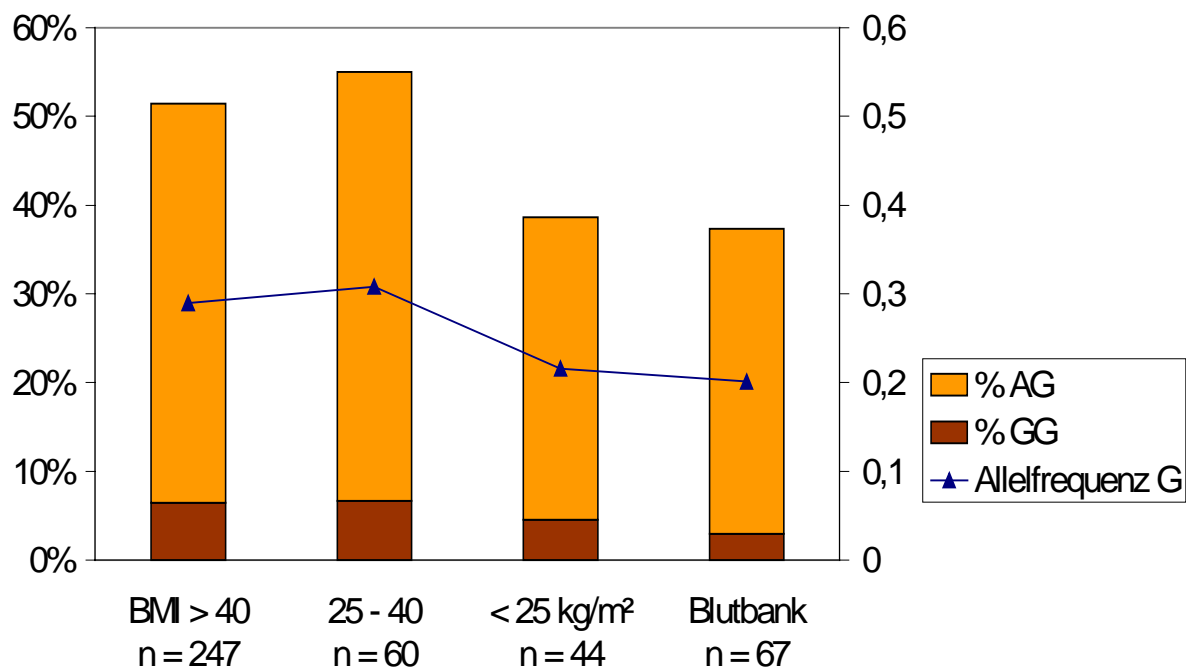


Abbildung 8 UCP1 Genotyp und BMI bei jüngeren Personen.

Tabelle 25 UCP-Genotyp in zwei Gewichtskategorien bei jüngeren Patienten.

Beobachtet	AA	AG	GG	N	AA %	AG %	GG %	Allel G
BMI \geq 25	147	140	20	307	47,9	45,6	6,5	0,293
BMI < 25/Blutbank	69	38	4	111	62,2	34,2	3,6	0,207
Erwartet	AA	AG	GG	N	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	Summe
BMI \geq 25	158	131	18	307	0,854	0,657	0,320	1,831
BMI < 25/Blutbank	58	47	6	111	2,363	1,817	0,883	5,063
Summe	216	178	24	418	3,217	2,474	1,203	6,894

Chi-Quadrat = 6,894; Freiheitsgrade 2; P-Wert = 0,032.

Die Unterschiede der Verteilung der UCP1 Genotypen in den vier Kategorien waren jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,297$). Aufgrund der ähnlichen Allelfrequenzen der Übergewichtigen mit BMI 25 – 40 kg/m² und der morbid Adipösen wurden die beiden Gruppen zusammengefaßt und einer Vergleichsgruppe bestehend aus Blutspendern und Schlanken gegenübergestellt. Der Unterschied dieser beiden Gruppen mit $P = 0,032$ signifikant (Tabelle 25), der besonders durch Unterschiede bei Frauen verursacht wurde (Frauen $P = 0,039$; Männer $P = 0,331$). Der Vergleich der Allelfrequenzen ($P = 0,013$) und der Vergleich Normaltypen gegen G-Allel-Träger ($P < 0,01$) unterstreichen die Beobachtung, daß junge Übergewichtige häufiger als junge Normalgewichtige Träger des G-Allels sind.

Klinische Werte der Patienten unter 48 Jahre

Anhand der klinischen Daten der Patienten wurde der Einfluß des Genotyps bei den jüngeren Patienten weiter untersucht. Insbesondere sollte geprüft werden, ob in dieser Personengruppe signifikante Unterschiede des BMI bei den Trägern der drei Genotypen vorhanden waren. Aus dem Gesamtkollektiv wurden wiederum alle Personen im Alter unter 48 Jahre berücksichtigt.

Tabelle 26 Eigenschaften junger Patienten unter Berücksichtigung des Genotyps.

		AA	AG	P	GG	P
Geschlecht w	%	64	61	0,494	67	0,802
Diabetes	%	15	15	0,814	21	0,495
Alter	Jahre	37 ± 7	37 ± 7	0,243	36 ± 8	0,479
BMI	kg/m ²	44 ± 14	45 ± 13	0,753	50 ± 14	0,079
Gesamt-Chol.	mg/dl	222 ± 65	225 ± 63	0,421	221 ± 55	0,844
Triglyzeride	mg/dl	193 ± 181	206 ± 140	0,012	200 ± 194	0,778
LDL-Chol.	mg/dl	140 ± 54	146 ± 55	0,148	134 ± 33	0,947
HDL-Chol.	mg/dl	44 ± 13	39 ± 10	0,002	43 ± 10	0,996
LDL/HDL	Ratio	3,3 ± 1,4	3,9 ± 1,8	0,013	3,3 ± 1,3	0,743
VLDL-Chol.	mg/dl	30 ± 15	34 ± 15	0,003	33 ± 19	0,472
Apo A₁	mg/dl	130 ± 23	124 ± 22	0,020	127 ± 19	0,723
Apo B	mg/dl	118 ± 43	123 ± 43	0,209	115 ± 31	0,875

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht und Diabetes die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind fett gedruckt.

Auch in dieser Untergruppe waren die GG- und AG-Genotypen mit 35,9 und 36,6 Jahren jünger als die AA-Genotypen mit 37,2 Jahren. Der mittlere BMI betrug bei AA-Genotyp 44,0, bei AG- und GG-Genotyp war er mit 44,6 bzw. 49,7 kg/m² etwas höher. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (P = 0,753, P = 0,079). Der Anteil an Diabetikern war bei mit 21 % bei GG-Genotyp höher als bei AA- und AG-Genotyp mit jeweils 15 % (nicht signifikant). Die Werte sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Bei den Lipidwerten wurden auffällige Unterschiede bei den Genotypen beobachtet. Die Werte für Triglyzeride, VLDL-Cholesterin und LDL/HDL-Ratio waren signifikant höher bei G-Allel-Trägern als bei AA-Genotyp, was im Vergleich von AA- und AG-Genotyp statistisch signifikant war (P = 0,012, P = 0,003, P = 0,013). Die Werte für HDL-Cholesterin und Apoprotein A waren höher bei Heterozygoten als bei Normaltypen (P =

0,002, $P = 0,020$) und Homozygoten (nicht signifikant). Die Unterschiede in den klinischen Parametern waren stärker durch die Werte der Frauen beeinflusst, hier waren die oben genannten Werte gleichermaßen signifikant verschieden, bei den Männern nur die VLDL-Werte mit $P = 0,021$.

Allelfrequenzen nach BMI-Kategorien bei Patienten über 48 Jahre

Die entsprechenden Daten für Personen über 48 Jahre zeigten eine entgegengesetzte Verteilung der UCP1 Genotypen in den verschiedenen BMI-Kategorien. Hier waren Normalgewichtige häufiger Träger des UCP1 Polymorphismus als Adipöse. Der Anteil der AA-Genotypen betrug bei den Adipösen mit einem BMI von 30 – 40 kg/m^2 bzw. $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ 72 % bzw. 69 %, während bei Übergewichtigen ($\text{BMI} 25 - 30 \text{ kg/m}^2$) 45 %, bei Normalgewichtigen 50 % und bei Blutspendern 53 % beobachtet wurden (Abbildung 9).

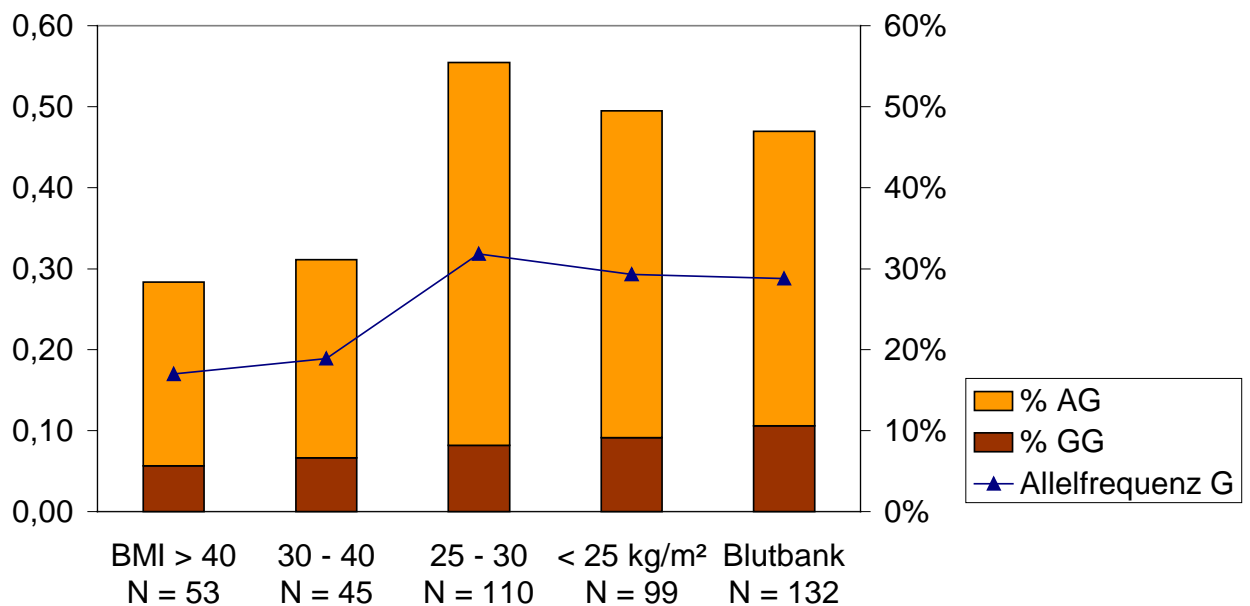


Abbildung 9 UCP Genotyp und BMI bei älteren Personen.

Die Allelfrequenz G betrug 0,170 bei Patienten mit morbidem Adipositas und 0,189 bei Patienten mit einem BMI zwischen 30 und 40 kg/m² (Tabelle 27). Für Schlanke (BMI < 25 kg/m²) und Blutspender ergaben sich für das Allel G mit 0,293 bzw. 0,288 deutlich höhere Allelfrequenzen. In der Gruppe BMI 25-30 kg/m² trat mit 0,318 die höchste Allelfrequenz auf. Die Verteilung des UCP1 Genotyps war statistisch signifikant (P = 0,034). Insgesamt ergab sich für alle Adipöse (BMI ≥ 30) eine Allelfrequenz von 0,179; für die übrigen Personen (BMI < 30 kg/m² und Blutspender) mit 0,299 eine deutlich niedrigere Allelfrequenz (P = 0,0012, vergleiche Tabelle 28). Diese Unterschiede waren bei Frauen stärker ausgeprägt mit P = 0,002 als bei Männern mit P = 0,055 (nicht gezeigt). Der Vergleich Normaltyp gegen G-Allel-Träger (P < 0,001) unterstreicht, daß bei älteren Personen Adipöse seltener Träger des G-Allels sind als die übrigen Personen.

Tabelle 27 UCP1 Genotyp in fünf BMI Kategorien bei älteren Personen.

	AA	AG	GG	N	AA %	AG %	GG %	Allel G
BMI ≥ 40 kg/m ²	38	12	3	53	71,7	22,6	5,7	0,170
BMI 30–40 kg/m ²	31	11	3	45	68,9	24,4	6,7	0,189
BMI 25–30 kg/m ²	49	52	9	110	44,5	47,3	8,2	0,318
BMI < 25 kg/m ²	50	40	9	99	50,5	40,4	9,1	0,293
Blutspender	70	48	14	132	53,0	36,4	10,6	0,288

Chi-Quadrat = 16,64; Freiheitsgrade 8. P = 0,034

Tabelle 28 UCP-Genotyp in zwei Gewichtskategorien bei älteren Patienten.

<u>Beobachtet</u>	AA	AG	GG	N	AA %	AG %	GG %	Allel G
BMI ≥ 30	69	23	6	98	70	24	6	0,179
BMI < 30/ Blutspender	169	140	32	341	50	41	9	0,299
<u>Erwartet</u>	AA	AG	GG	N	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	(B-E) ² /E	Summe
BMI ≥ 30	53	36	9	98	4,74	4,92	0,73	10,39
BMI < 30/Blutbank	185	127	29	341	1,36	1,42	0,21	2,99
Summe	238	163	38	439	6,10	6,34	0,94	13,38

Chi-Quadrat = 13,38; Freiheitsgrade 2; P-Wert = 0,0012.

Klinische Werte der Personen ab 48 Jahre

Die Patienten im Alter ab 48 Jahren mit Normaltyp unterschieden sich signifikant im BMI von den gleichaltrigen G-Allel-Trägern. Die Heterozygoten und Homozygoten (BMI $28,5 \pm 8,6$ kg/m²) waren schlanker als die Normaltypen (BMI $32,4 \pm 12,4$ kg/m²) ($P = 0,017$). Dieses Ergebnis war durch den Überhang von Normaltypen ($N=36$ gegenüber 15 G-Allel-Trägern) bei den morbid Adipösen bedingt. Unter Ausschluß des Adipositas Kollektivs waren die BMI-Werte der älteren Personen vergleichbar in den drei Gruppen (AA: 27,0; AG: 26,0; GG: 25,9 kg/m²) ($p = 0,28$). Bei den übrigen klinischen Werten wurde für Personen im Alter von 48 Jahren oder älter bei keiner der Untersuchungen signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von Genotyp beobachtet.

Zusammenfassung der Untersuchungen zum BMI

Die Verteilung des UCP1 Genotyps zeigt in den Gewichtskategorien Normalgewicht, Übergewicht, Adipositas und morbide Adipositas keine signifikanten Unterschiede. In der Gruppe der morbid Adipösen lassen sich keine Abhängigkeiten des BMI vom Genotyp nachweisen. Unter den Normalgewichtigen und mäßig Übergewichtigen (BMI < 30 kg/m²) haben die G-Allel-Träger im Vergleich zu Normaltypen einen höheren BMI (1 kg/m²). Die morbid Adipösen G-Allel-Trägern sind jünger als die morbid adipösen Normaltypen. Junge Übergewichtige (Alter < 48 Jahre, BMI > 25) sind signifikant häufiger G-Allel-Träger als junge Schlanke oder ältere Übergewichtige.

3.4 UCP1 Genotyp und Stoffwechselkrankheiten

Aufgrund der Besonderheit des Gesamtkollektivs mit einer Häufung von Patienten mit Hypercholesterinämie, gemischter Lipoproteinämie und Diabetes mellitus konnte der Zusammenhang des UCP1 Genotyps mit diesen Stoffwechselkrankheiten näher untersucht werden.

3.4.1 UCP1 Genotyp und Lipidstoffwechsel

Im Gesamtkollektiv waren Unterschiede bei den Lipidwerten in Abhängigkeit vom UCP1 Genotyp beobachtet worden. Um den Zusammenhang zu sichern, wurden die Lipidwerten für Männer und Frauen getrennt berechnet. Neun Personen wurden nicht berücksichtigt, da das Geschlecht nicht bekannt war. Die klinischen Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Bei Frauen wurde für Normaltypen höheres HDL-Cholesterin (46,6 mg/dl) und Apoprotein A (134 mg/dl) als für Heterozygote (43,3 mg/dl und 129 mg/dl) festgestellt (Tabelle 29). Diese Unterschiede waren signifikant mit $P = 0,017$ und $P = 0,036$. Die mittleren Werte für LDL-Cholesterin und Apoprotein B bei Normaltypen waren mit 132 mg/dl bzw. 112 mg/dl niedriger als die der Heterozygoten mit 145 mg/dl bzw. 120 mg/dl, das Signifikanzniveau von 95 % wurde jedoch nicht erreicht. Entsprechend der vorher genannten Daten war das Verhältnis LDL zu HDL unterschiedlich in den beiden Gruppen mit 3,0 bei AA-Genotyp und 3,6 bei AG-Genotyp ($P = 0,010$). Auch die mittleren Werte für Triglyzeride und VLDL-Cholesterin waren höher bei Heterozygoten als bei Normaltypen, jedoch nicht statistisch signifikant. Insgesamt wurde bei AG-Genotyp im Vergleich zu AA-Genotyp eine ungünstigere Konstellation der Lipidwerte beobachtet. Dagegen wurden bei GG-Genotyp sowohl im Vergleich mit AG-Genotyp als auch im Vergleich mit AA-Genotyp insgesamt günstigere Lipidwerte gefunden, diese Unterschiede waren jedoch aufgrund der kleinen Fallzahlen des GG-Genotyps nicht statistisch signifikant. Diese bei Frauen festgestellten Unterschiede waren auch bei Männern mit gleicher Tendenz vorhanden (Tabelle 30). Das statistische Signifikanzniveau wurde hier allerdings nicht erreicht.

Tabelle 29 Lipidwerte der 439 Frauen unter Berücksichtigung des Genotyps.

		AA (N = 232)	AG (n = 175)	<i>P</i>	GG (n = 32)	<i>P</i>
Gesamt-Chol.	mg/dl	218 ± 73	222 ± 70	0,547	215 ± 52	0,852
Triglyzeride	mg/dl	181 ± 163	172 ± 112	0,861	161 ± 113	0,573
LDL-Chol.	mg/dl	132 ± 51	145 ± 64	0,108	136 ± 47	0,938
HDL-Chol.	mg/dl	46,6 ± 13,7	43,3 ± 12,5	0,017	47,0 ± 12,7	0,920
HDL/LDL	Ratio	3,0 ± 1,3	3,6 ± 1,8	0,010	3,0 ± 1,2	0,628
VLDL-Chol.	mg/dl	29,9 ± 14,9	30,3 ± 14,0	0,712	26,9 ± 10,6	0,492
Apo A₁	mg/dl	134 ± 26	129 ± 27	0,036	134 ± 20	0,814
Apo B	mg/dl	112 ± 39	120 ± 46	0,178	109 ± 31	0,815

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht und Diabetes die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Statistisch signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

Tabelle 30 Lipidwerte der 423 Männer unter Berücksichtigung des Genotyps.

		AA (N = 227)	AG (n = 168)	<i>P</i>	GG (n = 28)	<i>P</i>
Gesamt-Chol.	mg/dl	226 ± 68	229 ± 68	0,591	224 ± 69	0,707
Triglyzeride	mg/dl	236 ± 242	272 ± 436	0,132	285 ± 425	0,947
LDL-Chol.	mg/dl	142 ± 58	146 ± 55	0,390	130 ± 39	0,370
HDL-Chol.	mg/dl	39,1 ± 13,3	37,9 ± 12,6	0,193	41,0 ± 15,2	0,614
HDL/LDL	Ratio	3,7 ± 1,7	4,0 ± 1,9	0,147	3,5 ± 2,1	0,121
VLDL-Chol.	mg/dl	33,5 ± 17,8	36,6 ± 17,8	0,061	32,3 ± 18	0,817
Apo A ₁	mg/dl	122 ± 23	121 ± 21	0,357	128 ± 25	0,240
Apo B	mg/dl	118 ± 42	121 ± 39	0,309	107 ± 35	0,191

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. P-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp.

Klinische Werte im Hypercholesterinämie Kollektiv

Der BMI, das Alter und der Anteil an Diabetikern war bei den Patienten mit Hypercholesterinämie in den Genotyp-Gruppen vergleichbar. Es fanden sich auffällige Verteilungen für HDL-Cholesterin, die LDL/HDL-Ratio und für Apoprotein A. Heterozygote Patienten zeigten mit 42,6 mg/dl niedrigere HDL-Werte als Normaltypen mit 49,7 mg/dl ($P = 0,21$). Entsprechend war auch die LDL/HDL-Ratio ungünstiger bei Normaltyp als bei Heterozygoten mit 4,9 bzw. 5,6. Eine ähnliche Konstellation wurde beim Vergleich der Apoprotein A Werte gefunden ($P = 0,09$). Die Unterschiede zwischen Heterozygoten und Normaltypen für HDL-Cholesterin waren auch bei getrennter Untersuchung von Männern und Frauen ($P = 0,039$, bzw. $P = 0,031$) nachweisbar. Für Homozygote ergaben sich keine relevanten Unterschiede, wobei sich jedoch die Werte von Homozygoten (HDL = 51,4 mg/dl) von denen der Heterozygoten abhoben. Die Werte sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31 Eigenschaften der 97 Patienten mit Hypercholesterinämie.

		AA (N = 46)	AG (n = 46)	P	GG (n = 5)	P
Geschlecht w	%	37	48	0,291	60	0,316
Diabetes	%	2	2	0,973	0	0,733
Alter	Jahre	44,3 ± 13,2	46,7 ± 13,	0,393	51,0 ± 11,9	0,287
BMI	kg/m ²	25,6 ± 5,4	25,3 ± 3,3	0,715	24,5 ± 3,3	0,634
Gesamt-Chol.	mg/dl	302 ± 85	306 ± 94	0,822	299 ± 55	0,949
Triglyzeride	mg/dl	141 ± 85	173 ± 111	0,123	124 ± 47	0,660
LDL-Chol.	mg/dl	224 ± 84	227 ± 93	0,849	223 ± 58	0,983
HDL-Chol.	mg/dl	49,7 ± 15,3	42,6 ± 13,8	0,021	51,4 ± 14,7	0,813
HDL/LDL	Ratio	4,9 ± 2,6	5,6 ± 2,3	0,005	4,7 ± 2,1	0,295
VLDL-Chol.	mg/dl	26,0 ± 15,3	32,2 ± 17,4	0,100	24,6 ± 9,7	0,840
Apo A₁	mg/dl	134 ± 22	121 ± 24,	0,009	131 ± 27	0,767
Apo B	mg/dl	158 ± 58	166 ± 57,	0,509	146 ± 17	0,641

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht und Diabetes die Häufigkeiten. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Statistisch signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

Klinische Werte im HLP Kollektiv

Im HLP Kollektiv war der mittlere BMI bei Homozygoten mit 28,5 kg/m² höher als bei Heterozygoten und Normaltypen mit 27,7 bzw. 27,6 kg/m² (Tabelle 32). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Der Anteil an Diabetikern war bei AG- und GG-Genotyp mit 36 % bzw. 25 % höher als bei AA-Genotyp mit 20 % (nicht signifikant). Für Heterozygote wurden mit 58,1 mg/dl höhere VLDL-Cholesterinwerte als für Wildtypen 49,5 mg/dl ermittelt ($P = 0,013$). Auch die nach Geschlecht getrennter Analyse ergab ähnliche Werte ($P = 0,088$, $P = 0,118$). Für GG-Genotyp ($N = 5$) waren keine VLDL-Cholesterinwerte bekannt. Die HDL-Cholesterinwerte waren bei AA-Genotyp höher als bei AG oder GG-Genotyp mit Werten von 34,4 mg/dl gegenüber 31,0 bzw. 26,2 mg/dl ($P = 0,177$, $P = 0,101$).

Tabelle 32 Eigenschaften der 97 Patienten mit gemischter Lipoproteinämie unter Berücksichtigung des Genotyps.

		AA (n = 52)	AG (n = 39)	<i>P</i>	GG (n = 6)	<i>P</i>
Geschlecht w	%	26	16	0,275	20	0,769
Diabetes	%	20	36	0,093	25	0,795
Alter	Jahre	45,5 ± 11,4	49,3 ± 12,0	0,193	51,6 ± 11,5	0,254
BMI	kg/m ²	27,7 ± 4,6	27,6 ± 2,8	0,667	28,5 ± 3,1	0,400
Gesamt-Chol.	mg/dl	293 ± 113	280 ± 98	0,686	323 ± 94	0,245
Triglyzeride	mg/dl	526 ± 409	569 ± 844	0,867	933 ± 759	0,124
LDL-Chol.	mg/dl	179 ± 74	170 ± 59	0,725		
HDL-Chol.	mg/dl	34 ± 13	31 ± 9	0,177	26 ± 5	0,101
HDL/LDL	Ratio	4,5 ± 1,7	5,6 ± 2,4	0,144		
VLDL-Chol.	mg/dl	47 ± 14	58 ± 16	0,013		
Apo A ₁	mg/dl	117 ± 27	122 ± 41	0,874	122 ± 13	0,620
Apo B	mg/dl	160 ± 55	157 ± 55	0,863	161 ± 37	0,861

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für Geschlecht und Diabetes die Häufigkeiten. Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp. Bei GG-Genotyp waren keine LDL- und HDL- Cholesterinwerte verfügbar. Signifikante Werte sind fett gedruckt.

3.4.2 UCP1 Genotyp und Diabetes mellitus Typ 2

Für die Untersuchung einer möglichen Assoziation des UCP1 Polymorphismus mit Diabetes mellitus Typ 2 wurde das Gesamtkollektiv gemäß des Diabetes mellitus Status aufgeteilt. Zusätzlich zum Diabetes-Kollektiv wurden 108 Diabetiker der anderen Kollektive berücksichtigt. 17 Personen wurden aufgrund fehlender Angabe zum Diabetes mellitus Status nicht zugeordnet.

Die Genotyphäufigkeit von Diabetikern und Nicht-Diabetikern wurde verglichen (Tabelle 33). Bei der Untersuchung der Allelfrequenzen in den sechs Kollektiven war aufgefallen, daß die Patienten aus dem Diabetes-Kollektiv mit 0,244 die niedrigste Allelfrequenz hatten. Im Gesamtkollektiv hingegen betrug die Allelfrequenz für das Allel G 0,276 bei Diabetikern und 0,268 bei Nicht-Diabetikern. Dieser Trend war bei Frauen mit Allelfrequenzen von 0,288 bzw. 0,269 ausgeprägter als bei Männern mit 0,272 bzw. 0,265. Die Unterschiede der Verteilung waren weder im Gesamtkollektiv ($P = 0,59$) noch nach Geschlecht getrennt ($P = 0,44$ bzw. $P = 0,32$) statistisch signifikant (nicht gezeigt). Die klinischen Werte der Diabetiker wurden in Abhängigkeit vom Genotyp untersucht. Beim Vergleich der Eigenschaften von AA-Trägern und AG/GG-Trägern in der Gruppe der Diabetiker wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (Tabelle 34).

Tabelle 33 Verteilung des UCP-Genotyps bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern.

	AA	AG	GG	Summe	AA (%)	AG (%)	GG (%)	Allel G
Diabetiker	101	79	14	194	52,1	40,7	7,2	0,276
Nicht-Diabetiker	356	263	47	666	53,5	39,5	7,0	0,268
Summe	457	342	61	860	53,0	40,0	7,0	0,270

Chi-Quadrat = 0,117; Freiheitsgrade 2; P-Wert = 0,943.

Tabelle 34 Eigenschaften der 194 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 unter Berücksichtigung des Genotyps.

		AA (N = 101)	AG (n = 79)	<i>P</i>	GG (n = 14)	<i>P</i>
Geschlecht w	%	53	47	0,410	71	0,196
Alter	Jahre	57 ± 15	56 ± 15	0,891	57 ± 13	0,944
BMI	kg/m ²	35,8 ± 12,4	35,3 ± 11,8	0,851	37,2 ± 13,5	0,638
Gesamt-Chol.	mg/dl	202 ± 55	215 ± 68	0,284	207 ± 41	0,866
Triglyzeride	mg/dl	271 ± 279	353 ± 611	0,172	233 ± 167	0,514
LDL-Chol.	mg/dl	115 ± 36	123 ± 34	0,338	125 ± 30	0,347
HDL-Chol.	mg/dl	36,1 ± 12,1	35,5 ± 11,5	0,497	38,2 ± 10,5	0,519
VLDL-Chol.	mg/dl	38,1 ± 17,7	40,7 ± 16,4	0,324	36,1 ± 22,0	0,390
Apo A ₁	mg/dl	128 ± 31	122 ± 23	0,432	122 ± 19	0,728
Apo B	mg/dl	112 ± 33	121 ± 35	0,215	110 ± 28	0,872

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, für das Geschlecht die Häufigkeit. P-Werte wurden mit χ^2 bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet für den Vergleich von AG- bzw. GG-Genotyp und AA-Genotyp.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Verteilung der UCP1 Genotypen im Gesamtkollektiv ist in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz und ist unabhängig vom Geschlecht.
2. Der Vergleich der Häufigkeiten der UCP1 Genotypen in sechs Kollektiven, darunter Patienten mit morbidem Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämien und Kontrollgruppe (Blutspender) erbrachte keine signifikanten Unterschiede.
3. Im Gesamtkollektiv wurden keine Unterschiede im BMI in Abhängigkeit vom UCP1 Genotyp nachgewiesen. Die detaillierte Untersuchung des Zusammenhangs von UCP1 und Adipositas zeigte:

- Unter den Normalgewichtigen und mäßig Übergewichtigen ($\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) haben G-Allel-Träger im Vergleich zu Normaltypen einen höheren BMI (1 kg/m^2).
 - Im Adipositas Kollektiv lassen sich hingegen keine signifikanten Unterschiede im BMI in Abhängigkeit vom Genotyp nachweisen.
 - Im Adipositas Kollektiv sind G-Allel-Trägern jünger als Normaltypen.
 - Junge Übergewichtige (Alter < 48 Jahre, $\text{BMI} > 30$) sind häufiger G-Allel-Träger als ältere Übergewichtige.
4. Heterozygote weisen im Vergleich zu Normaltypen ungünstigere Lipidwerte auf.
- Die Unterschiede (niedrigeres HDL und Apoprotein A, höherer LDL/HDL-Ratio) sind auch bei getrennter Betrachtung von Männern und Frauen nachzuweisen.
 - Auch im Adipositas Kollektiv (niedrigeres HDL) und in der Gruppe der Schlanken (höheres VLDL und LDL/HDL-Ratio) haben Heterozygote ungünstigere Lipidwerte als Normaltypen.
 - Die Analyse der klinischen Daten der HLP und Hypercholesterinämie Kollektive bestätigt, daß G-Allel-Träger im Vergleich zu Normaltypen ungünstigere Lipidwerte (höheres HDL, Apoprotein A, niedrigeres VLDL) aufweisen.
5. Es wurde kein Zusammenhang zwischen UCP1 Genotyp und Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie mit einer Fallzahl von $N = 887$ liefert die Häufigkeiten der Genotypen und die Allelfrequenzen des AG- Polymorphismus in der Promotorregion des UCP1 Gens für die deutsche Bevölkerung. Das besondere an dem untersuchten Patientenkollektiv ist der große Anteil (34 %) an morbid Adipösen sowie die Häufung von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Fettstoffwechselstörungen.

4.1 Allelfrequenzen

Die Verteilung der UCP1 Genotypen in dem untersuchten Studienkollektiv war in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz und unabhängig vom Geschlecht. Im Gesamtkollektiv betrug die Allelfrequenz 0,27 für das Allel G und 0,73 für das Allel A. Die ermittelten Allelfrequenzen werden den Daten aus veröffentlichten Studien gegenübergestellt. Die Tabelle 35 zeigt die verfügbaren Angaben für adipöse Personen (oben) und für Personen aus der normalen Population (unten). Die Reihenfolge entspricht der Höhe der Allelfrequenzen. Bei der Betrachtung der Fallzahlen wird deutlich, daß zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche nur wenig Daten aus ähnlich großen Untersuchungen und keine Daten für die deutsche Bevölkerung vorlagen. Die im September 1999 veröffentlichte Studie von *Schäffler et al.* weist mit einer Fallzahl von 1020 ein größeres Studienkollektiv auf als die vorliegende mit 887 Personen, jedoch ohne ein Kollektiv von morbid adipösen Patienten.

Die im Gesamtkollektiv ermittelte Allelfrequenz von 0,27 für das Allel G im UCP1 Gen ist vergleichbar mit den Daten von anderen Untersuchungen der Kaukasischen Bevölkerung. Die veröffentlichten europäischen und kanadischen Studien nennen Allelfrequenzen zwischen 0,25 und 0,28, nur zwei finnische und eine französische Untersuchung, allerdings mit kleinen Fallzahlen ($N = 112$, $N = 91$, $N = 77$), zeigen mit 0,19 besonders niedrige Al-

Allelfrequenzen für das Allel G (Fogelholm et al., 1998; Valve et al., 1998; Clement et al., 1996). Im Gegensatz dazu wurde in einer japanischen Studie mit 0,51 eine auffällig hohe Allelfrequenz für das Allel G vorgefunden (Hayakawa et al., 1999). Der A→G Polymorphismus scheint in der japanischen Population insgesamt häufiger vorzukommen als in der Europäischen. Diese Besonderheit ist auch von dem Trp64Arg Polymorphismus im β_3 -Adrenorezeptor Gen bekannt (Fujisawa et al., 1998).

Tabelle 35 Allelfrequenzen bei Adipösen (oben) und in der Bevölkerung (unten).

Studie	N	AA [%]	AG [%]	GG [%]	f [G]	Population	Kollektiv
Fogelholm (1998)*	77	63,6	33,8	2,6	0,19	Finnland***	BMI \geq 29
Gagnon (1998)	675	57,0	36,3	6,7	0,25	Schweden	BMI \geq 29
Valve (1998)*	170	52,9	42,4	4,7	0,26	Finnland	BMI \geq 30
Clement (1996)*	238	54,8	37,8	7,4	0,27	Frankreich	BMI \geq 40
Fumeron (1996)*	163	57,1	32,5	10,4	0,27	Frankreich	BMI \geq 27
Diese Studie	304	51,6	41,4	6,9	0,28	Deutschland	morb. Adipos.
Esterbauer (1998)	144	48,6	45,8	5,6	0,28	Österreich	morb. Adipos.
Kogure (1998)	113	31,9	45,1	23,0	0,46	Japan***	BMI \geq 25
Valve (1998)*	112	63,4	35,7	0,9	0,19	Finnland	Population
Clement (1996)*	91	n.a.	n.a.	n.a.	0,19	Frankreich	Schlanke
Gagnon (1998)	310	59,5	33,1	7,4	0,24	Schweden	BMI \leq 27
Urhammer (1997)	379	56,2	36,9	6,9	0,25	Dänemark	Population
Schäffler (1999)	1020	57,0	35,4	7,6	0,25	Deutschland	Population
Diese Studie, Blutbank	199	56,3	35,7	8,0	0,26	Deutschland	Population
Oppert (1994)	123	46,6	43,9	6,5	0,28	Kanada	Population
Hayakawa (1999)*	246	26,2	49,5	24,3	0,51	Japan**	Population
Diese Studie	887	53,0	39,8	7,2	0,27	Deutschland	Gesamtkollektiv

f [G] = Allelfrequenz des Allels G n.a. = nicht angegeben

* β_3 AR Polymorphismus untersucht. ** nur Männer *** nur Frauen

Neben der Herkunft des Studienkollektivs ist die Art der Rekrutierung innerhalb der Bevölkerung von besonderem Interesse für die Interpretation der Allelfrequenzen. Bei den genannten Studienkollektiven handelt es sich einerseits um selektierte Personen mit Übergewicht oder morbid Adipositas, andererseits um schlanke oder zufällig, d.h. ohne Berücksichtigung des BMI, ausgewählte Personen aus der normalen Bevölkerung.

Die in den Studien ermittelten Allelfrequenzen von Schlanken und Adipösen liegen in einem ähnlichen Bereich. Als Tendenz kann zwar festgestellt werden, daß unter den europäischen Untersuchungen die Studien mit adipösen Patienten eher höhere Allelfrequenzen (Österreich 0,28, Frankreich 0,27, Finnland 0,27) aufweisen als die Populationsstudien (Dänemark 0,25, Deutschland 0,25). Auch in der vorliegenden Untersuchung waren die Allelfrequenzen bei morbid Adipösen mit 0,28 etwas höher als bei Schlanken bzw. Blutspendern mit 0,26, ohne daß das statistische Signifikanzniveau erreicht wurde.

Diese Ergebnisse führen zu der Auffassung, daß der A→G Polymorphismus im UCP1 Gen kein alleiniger Risikofaktor für die Entstehung der Adipositas sein kann. Das Vorkommen weiterer Polymorphismen im Gen des UCP1 wurde in einer deutschen Studie (*Hamann et al.*, 1998) untersucht. In einem Studienkollektiv von 293 adipösen Kindern und Jugendlichen wurden vier seltene Mutationen gefunden mit Allelfrequenzen bis zu 0,12. Eine dieser Mutationen wurde häufiger bei adipösen (0,08) als bei schlanken (0,04) Personen gefunden. Für die Entstehung der Adipositas scheinen aber die anderen Polymorphismen im Gen des UCP1 aufgrund ihrer Seltenheit von eher geringer Bedeutung zu sein.

4.2 Assoziationen mit dem BMI

Für die verfügbaren Studien sind die BMI-Werte der drei Genotypen sowie eine Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 36 dargestellt. Das seltenere Allel G des UCP1 Polymorphismus wurde mit einer größeren Zunahme an Fettmasse (*Oppert et al.*, 1994) und mit einer größeren Gewichtszunahme nach dem 20. Lebensjahr in Zusammenhang gebracht

(Clement *et al.*, 1996). Zwei Studien befaßten sich mit dem Gewichtsverhalten in Verbindung mit einer Kalorien reduzierten Kost. Hier wurde ein schlechteres Ansprechen auf die Diät (Fumeron *et al.*, 1996) und eine schnellere Gewichtszunahme nach Beendigung der Diät beobachtet (Fogelholm *et al.*, 1998). Der Einfluß des UCP1-Genotyps auf den Ruheumsatz wurde mit einem reduzierten Kalorienverbrauch von 80 kcal./Tag angegeben (Valve *et al.*, 1998). Schließlich wurde in der japanischen Bevölkerung eine direkte Assoziation von A→G Polymorphismus und BMI festgestellt (Hayakawa *et al.*, 1999).

Tabelle 36 Assoziationen des UCP1 Genotyps mit dem BMI oder verwandten Eigenschaften.

Studie	Jahr	N	BMI AA	BMI AG	BMI GG	Assoziation mit dem Allel G
Oppert	1994	123	25,6	25,0	26,8	Größere Zunahme an Fettmasse im Zeitraum von 12 Jahren
Clement*	1996	238	44,7 48 kg	45,5 56 kg	45,5 56 kg	Größere Gewichtszunahme nach dem 20. Lebensjahr
Fumeron	1996	163	34,6 7,3 kg	33,3 5,7 kg	34,0 4,6 kg	Geringere Gewichtsabnahme durch Diät
Fogelholm*	1998	85	34,3 0,1 kg	33,6 0,6 kg	33,6 0,6 kg	Schnellere Gewichtszunahme im Anschluß an eine Gewichtsreduktion mit Hilfe von VLDC**
Valve	1998	170	34,6	34,9	34,9	Grundumsatz um 80 kcal. / Tag reduziert
Esterbauer	1997	144	43,0	42,1	47,2	Reduzierte intraperitoneale UCP1 mRNA Menge
Hayakawa	1999	246	23,0	24,2	23,6	Größerer BMI
Urhammer	1997	379	23,2	23,1	22,2	Keine
Gagnon	1998	985				Keine
Schäffler	1999	1020	25,5	25,5	25,6	Keine

* Hier wurden keine separate Angaben zu AG und GG Genotyp angegeben.

** VLDC = Very low calorie diet

Es gab jedoch auch Arbeitsgruppen, die keinerlei Assoziation mit dem UCP1 Genotyp feststellen konnten (Tabelle 36). Hier ist die Studie mit gesunden jungen Dänen (*Urhammer et al.*, 1997), eine schwedische Fall-Kontroll-Studie (*Gagnon et al.*, 1998) und eine große Untersuchung der deutschen Bevölkerung (*Schäffler et al.*, 1999) zu nennen. Die dänischen und die deutschen Untersuchungskollektive hatten allerdings keinen großen Anteil an Adipösen. In der schwedischen Studie mit 674 Adipösen und 311 Normalgewichtigen, wurde neben dem aktuellen BMI auch die Gewichtszunahme seit dem 20. Lebensjahr berücksichtigt. Hier wurde, im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Oppert et al.* (1994) und *Clement et al.* (1996), kein Einfluß des UCP1 Genotyps festgestellt.

In der vorliegenden Studie wurde bei der Untersuchung aller schlanken und mäßig übergewichtigen Personen ($\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$, $n = 289$) eine Assoziation zwischen UCP1 Genotyp und BMI festgestellt. In diesem Kollektiv waren die Normaltypen mit einem BMI-Median von $24,2 \text{ kg/m}^2$ etwas schlanker als die G-Allel-Träger mit $25,5 \text{ kg/m}^2$ ($P = 0,04$) (Abbildung 10). In der japanischen Studie wurden Unterschiede in ähnlicher Größenordnung zwischen den Genotypen gefunden (*Hayakawa et al.*, 1999). Hier hatten die Normaltypen einen mittleren BMI von $23,0 \text{ kg/m}^2$, während für AG- und GG-Genotyp $24,2$ bzw. $23,6 \text{ kg/m}^2$ festgestellt wurden.

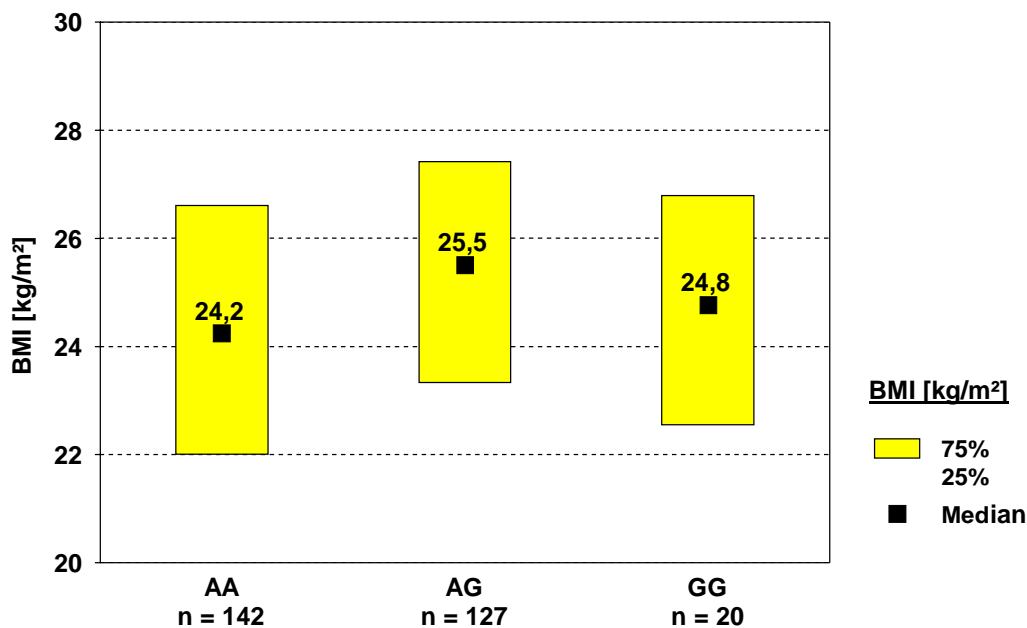


Abbildung 10 UCP1 Genotyp und BMI von normalgewichtigen Personen ($n=289$).

Diese Befunde sprechen dafür, daß der UCP1 Polymorphismus einen, wenn auch geringen, Einfluß auf den BMI haben könnte. Bei einer Person mit einer Größe von 1,70m würde es sich um einen Unterschied von drei kg Körpergewicht handeln. Ein solcher Unterschied würde sich bei den morbid Adipösen mit einer Spanne von 82 bis 262 kg Körpergewicht kaum statistisch nachweisen lassen.

Im Gesamtkollektiv und bei der Analyse aller Adipösen ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) und aller Diabetiker wurde kein Zusammenhang zwischen dem A→G Polymorphismus und dem BMI festgestellt. Von den Patienten mit morbider Adipositas hatten die Homozygoten einen höheren BMI als Heterozygoten und die Normaltypen (Abbildung 11), ohne daß das statistische Signifikanzniveau erreicht wurde ($p = 0,37$). Im Adipositas Kollektiv ergab sich allerdings eine auffällige Altersverteilung ($P = 0,01$). Die morbid adipösen G-Allel-Träger waren im Durchschnitt jünger als morbid adipöse Normaltypen (Abbildung 11). Diese Beobachtung kann derartig interpretiert werden, daß bei G-Allel-Trägern die Indikation zur chirurgischen Adipositas-Intervention bereits in jüngeren Lebensalter gestellt wird aufgrund eines schneller progredienten Krankheitsbildes. Bei Schlanken und Blutspender traten keine signifikanten Altersunterschiede in Abhängigkeit vom UCP-Genotyp auf ($P = 0,21$).

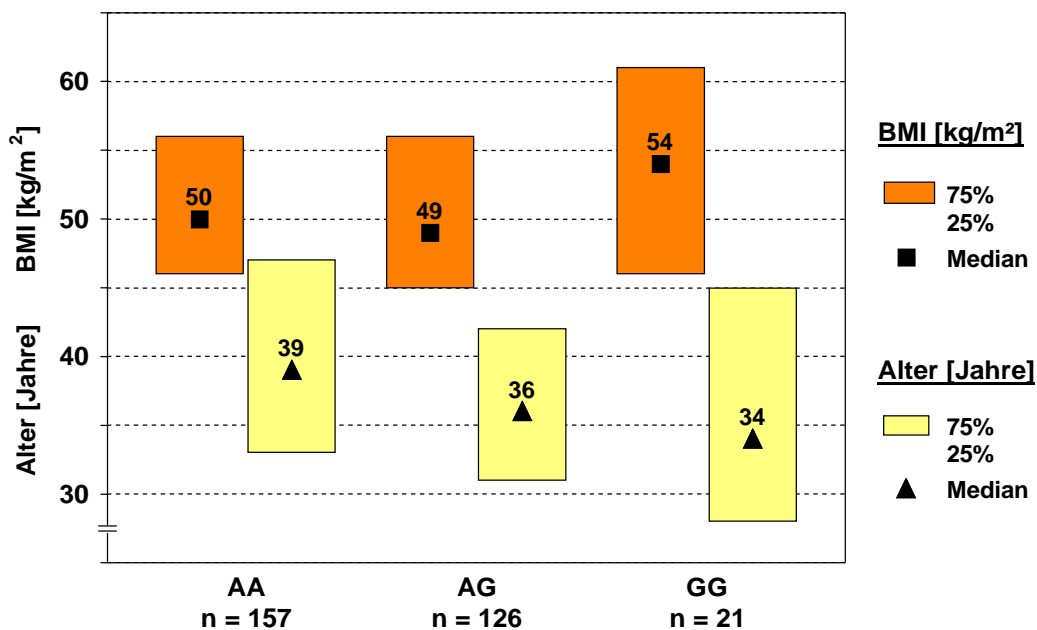


Abbildung 11 BMI und Alter der morbid Adipösen in Abhängigkeit vom UCP1 Genotyp.

Die detaillierte Betrachtung der Faktoren Alter, BMI und UCP1 Genotyp zeigte, daß unter Aufteilung der morbid Adipösen in vier Altersgruppen die jüngsten (Alter unter 30 Jahre) die höchste Allelfrequenz für das Allel G hatten. In den Gruppen höheren Alters wurde eine stetige Abnahme der Allelfrequenz beobachtet (Abbildung 12). Ein gleichartiges Ergebnis zeigt sich auch bei Berücksichtigung aller Patienten mit einem BMI ≥ 30 kg/m². Es ist auch unabhängig von den Faktoren Geschlecht und Diabetes mellitus Typ 2.

Diese Befunde können mit den Ergebnissen von *Oppert et al.* (1994) und *Clement et al.* (1996) in Beziehung gesetzt werden. In diesen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen dem UCP1 Genotyp und der in einem Zeitraum von 12 Jahren aufgetretenen Zunahme an Körperfettmasse und Körpergewicht festgestellt. So ist es vorstellbar, daß Patienten, die schneller an Gewicht und Fettmasse zunehmen, entsprechend früher als Patienten für eine chirurgische Intervention zur Behandlung der Adipositas in Frage kommen als andere Patienten. Da nur der aktuelle BMI bekannt ist, nicht jedoch Angaben zu der Gewichtszunahme in einem bestimmten Zeitraum, kann diese Hypothese nicht genauer untersucht werden.

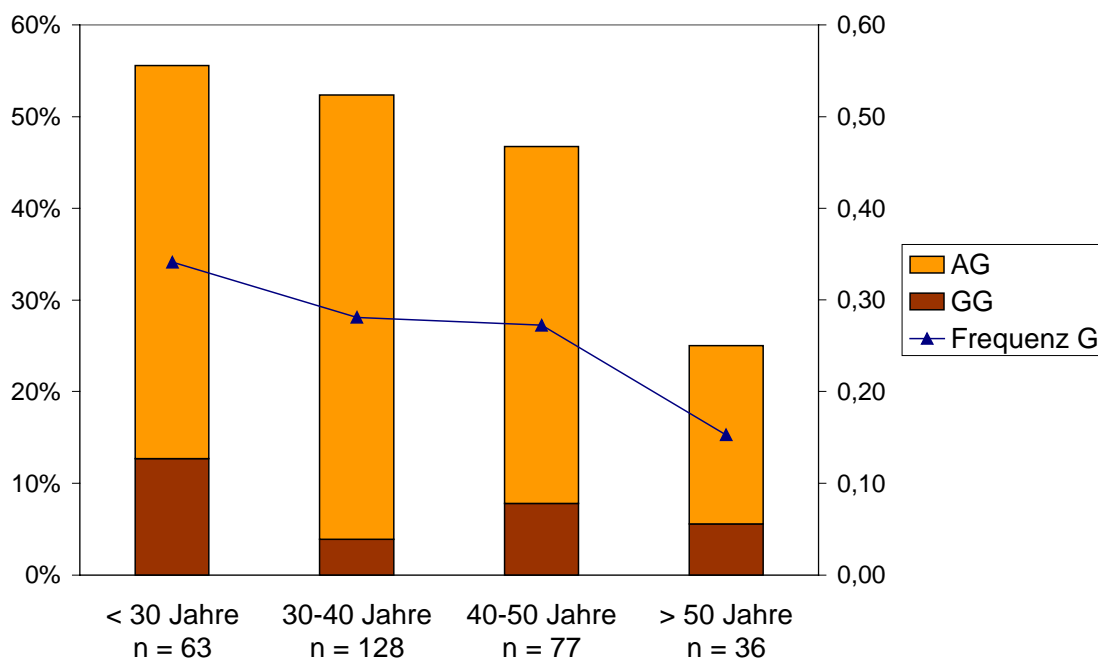


Abbildung 12 UCP1 Genotyp bei morbid Adipösen verschiedener Altersstufen.

Eine gezielte Untersuchung der jüngeren Personen wurde durchgeführt nach Aufteilung des Gesamtkollektivs in zwei Gruppen anhand des Median des Alters, der bei 48 Jahren lag. Es zeigte sich, daß in der Teilgruppe der jüngeren Personen die Übergewichtigen (BMI ≥ 25 kg/m²) häufiger Träger des G-Allels waren als die Schlanken und Blutspender dieser Altersgruppe (P = 0,01). Die Allelfrequenzen für das Allel G betrugen 0,293 bzw. 0,201. Angesichts der Häufung von jungen G-Allel-Trägern im Adipositas-Kollektiv war es nicht überraschend, daß die Allelfrequenz bei jüngeren Personen mit BMI ≥ 25 kg/m² über dem Durchschnitt lag. Unerwartet war allerdings die besonders niedrige Allelfrequenz in der Vergleichsgruppe der Schlanken und Blutspender. Dabei muß berücksichtigt werden, daß aus dem Gesamtkollektiv nur 111 Personen den Kriterien unter 48 Jahre und BMI < 25 kg/m² entsprachen, so daß es sich möglicherweise um einen Ausreißer handelt.

Auch andere Arbeitsgruppen hatten in einigen Fällen so niedrige Allelfrequenzen zu verzeichnen. *Clement et al.* (1996) fanden in ihrer Kontrollgruppe, einem Kollektiv von 91 schlanken Franzosen (Alter 56 ± 14 , BMI < 27 kg/m²), eine Frequenz 0,19, genauso wie *Valve et al.* in der Kontrollgruppe von 112 gesunden Finnen. Allerdings hatte auch *Fogelholm et al.* (1998), mit einer Untersuchung von 91 Übergewichtigen (BMI 29 - 46 kg/m²) Frauen im Alter von 29 bis 46 Jahren eine Allelfrequenz von 0,19. Es wurde versucht, aus der Literatur Vergleichszahlen für junge schlanke Personen zu ermitteln. Die Untersuchung von *Urhammer et al.* (1997) bezieht sich auf 380 gesunde Dänen im Alter von 18 bis 32 Jahren. Der BMI wurde hier als Median (23 kg/m²) mit Quartilsabstand (5 kg/m²) angegeben. Die Allelfrequenz war mit 0,25 höher als die in der vorliegenden Untersuchung ermittelte Frequenz von 0,20. Nichtsdestotrotz würde sich auch aus dem Vergleich der jungen Adipösen mit den dänischen Zahlen ein signifikanter Unterschied ergeben.

4.3 Assoziationen mit Stoffwechselkrankheiten

UCP1 und Lipidwerte

Bei Untersuchung der Lipidwerte im Gesamtkollektiv war aufgefallen, daß G-Allel-Träger niedrigere HDL-Werte hatten als Normaltypen. Bei den separaten Untersuchung der einzelnen Kollektiven konnte dieses bei Patienten mit morbidem Adipositas und bei Patienten mit Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie (nur Frauen) als signifikant bestätigt werden. Bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie waren zudem die VLDL-Werte bei G-Allel-Trägern höher als bei Normaltypen. Bei Diabetikern, Blutspendern und stationären Patienten wurden keine statistischen Unterschiede der Lipidwerte in Abhängigkeit vom UCP1 Genotypen festgestellt. Allerdings waren die HDL-Werte der Normaltypen in keinem Kollektiv niedriger als die der Heterozygoten.

Außerdem wurde festgestellt, daß jüngere Patienten mit einem Alter bis 48 Jahre signifikante Unterschiede in den Lipidwerten zeigten, wohingegen bei den älteren dieser Effekt nicht vorhanden war. Bei den jüngeren Patienten waren HDL und Apoprotein A niedriger bei AG und GG-Genotyp als bei Normaltyp. Zusätzlich waren die Triglyzeride, VLDL und die HDL/LDL Ratio erhöht. Angesichts der Altersverteilung in den Kollektiven ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da die oben genannten Kollektive, die starke Auffälligkeiten zeigten, insgesamt jüngere Patienten beinhalten als die anderen Kollektive.

Überraschend war, daß die Lipidwerte der Patienten mit GG-Genotyp häufig günstiger als die der AG-Genotypen und zum Teil auch günstiger als die der Normaltypen waren. Im Sinne eines Gen-Dosis-Effektes wäre das Gegenteil zu erwarten. Diese Beobachtung kann als Argument gegen das Bestehen eines Zusammenhangs von UCP1 Polymorphismus und Lipidwerten ausgelegt werden.

Da der Einfluß des UCP1 Genotyps in jüngeren Jahren von größerer Bedeutung zu sein scheint als in höherem Lebensalter, ist es vorstellbar, daß aus diesem Grund nur die Personen unter 48 Jahre verschiedenartige Lipidwerte hatten. Andererseits könnte durch eine

bestehende Störung des Stoffwechsels bei Patienten mit morbidem Adipositas oder Dyslipidämien der Einfluß des UCP1 Polymorphismus verstärkt werden. Aus den vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, welcher Faktor den Zusammenhang von UCP1 Genotyp und Lipidwerten verursacht. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um eine zufällige Abweichung handelt.

In der Literatur werden in Bezug auf die Lipidwerte unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. In den Studien von *Oppert et al.* (1994), *Fumeron et al.* (1996), *Valve et al.* (1998), *Fogelholm et al.* (1996) und *Kogure et al.* (1998) sind keine Lipidwerte angegeben. *Clement et al.* (1996), *Urhammer et al.* (1997) und *Schäffler et al.* (1999) stellten in ihren Untersuchungskollektiven keine Unterschiede der Lipidwerte für die drei Genotypen fest. Bei *Esterbauer et al.* (1998) und *Hayakawa et al.* (1999) wurden statistisch signifikante Unterschiede für HDL-Werte beschrieben, die mit den in der vorliegenden Untersuchung gefundenen übereinstimmen. Insbesondere die Studie von *Esterbauer et al.* (1998) mit morbid adipösen Österreichern unterstützt aufgrund des vergleichbaren Untersuchungskollektives die in der vorliegenden Studie gefundenen Ergebnisse.

UCP1 und Diabetes mellitus Typ 2

In der Literatur werden zu dieser Thematik unterschiedliche Befunde geschildert. So wurde von *Clement et al.* (1996) festgestellt, daß in dem Kollektiv von morbid Adipösen signifikant weniger G-Allel-Träger unter Diabetes mellitus Typ 2 litten als die Normaltypen. Es könnte sich demnach um einen protektiven Einfluß handeln. Andererseits wird dem UCP1 Polymorphismus ein additiver Effekt mit dem 3-Adrenorezeptor zugeschrieben. Dieser wiederum war in einigen Untersuchungen mit Diabetes mellitus Typ 2, insbesondere mit dem Auftreten in jüngeren Jahren, assoziiert. Daher könnte der UCP1 Polymorphismus auch als potentieller Risikofaktor betrachtet werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde im Diabetes Kollektiv mit 0,244 die niedrigste Allelfrequenz von den sechs Kollektiven festgestellt. Unter Berücksichtigung aller Diabeti-

ker ergab sich allerdings eine ähnliche Allelfrequenz wie bei Nicht-Diabetikern, d.h. daß die Diabetiker, die eine morbide Adipositas oder Dyslipidämien hatten, häufiger G-Allel-Träger waren als die Patienten des Diabetiker-Kollektivs. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Im Gesamtkollektiv war die Allelfrequenz für das Allel G bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern nahezu identisch. Das Alter war nicht verschieden bei G-Allel-Trägern und Normaltypen. Auch der BMI und die Lipidwerte der Diabetiker unterschieden sich in keinerlei Hinsicht in Abhängigkeit vom UCP1 Genotyp. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in dem untersuchten Kollektiv kein Einfluß des UCP1 Genotyps auf die Entstehung oder den Verlauf des Diabetes mellitus Typ 2 zu erkennen ist.

4.4 Ausblick

Bei Vorliegen einer positiven Familienanamnese für Adipositas mit Ausprägung in jungen Jahren scheint das Risiko für morbide Adipositas größer zu sein als bei Adipositas mit Ausprägung in höherem Lebensalter (*Pérusse et al.*, 1998). In der vorliegenden Studie zeigte sich nur bei den jüngeren Personen ein Überwiegen des A→G Polymorphismus bei morbid Adipösen im Vergleich zu Schlanken und Blutspendern. Die Tatsache, daß die Masse des braunen Fettgewebes und die Stimulierbarkeit der Thermogenese mit zunehmendem Alter abnimmt, unterstützt die besondere Bedeutung des Alters für die Funktion des UCP1. In einer nachfolgenden Untersuchung könnte durch Auswahl eines jungen Patientenguts diese Vermutung näher untersucht werden.

In einigen Untersuchungen wurde das Zusammenspiel des UCP1 Polymorphismus mit einem Polymorphismus im β_3 -Adrenorezeptor-Gen geprüft. *Clement et al.* (1996), *Valve et al.* (1998) und *Fogelholm et al.* (1998) postulierten einen additiven Einfluß des A→G Polymorphismus im UCP1 Gen und des Trp64Arg-Polymorphismus im β_3 -Adrenorezeptor-Gen, während *Fumeron et al.* (1996) und *Hayakawa et al.* (1999) dieses nicht bestätigen konnten. Möglicherweise läßt sich unter Berücksichtigung des Genotyps des Trp64Arg-Polymorphismus der Einfluß des UCP1-Polymorphismus noch genauer abschätzen. Ähnliches sollte für Polymorphismen in weiteren Genen wie UCP2 und UCP3 oder β_2 -

Adrenorezeptor gelten. Da die Adipositas ein polygenes Merkmal ist, sollte unter Einbeziehung möglichst vieler beteiligter Gene die stärkste Aussage in Bezug auf Risikopotential., Präventionsstrategien und individuell abgestimmte Therapiemaßnahmen gelingen.

Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang auch die Studie von *Esterbauer et al.* (1997), welche die Funktionalität des UCP1 Polymorphismus belegt. In einer Untersuchung von 144 morbid adipösen Österreichern konnte gezeigt werden, daß bei G-Allel-Trägern weniger Transkription, meßbar an dem geringeren Vorkommen von mRNA stattfindet. Der UCP1-Genotyp ist demnach für 19 % der interindividuellen Mengenunterschiede des intraperitonealen braunen Fettgewebe verantwortlich. Personen mit relativ geringer Menge an intraperitonealem Fettgewebe sollten besonders von einer therapeutischen Stimulierung des UCP1 profitieren.

5 Zusammenfassung

Das Körpergewicht wird beeinflusst von Umwelt, Verhalten und genetischen Faktoren. Die genauen Mechanismen der Adipositasentstehung sind nur unzureichend geklärt. Durch ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge könnten möglicherweise neue Ansätze zur Prävention und Therapie der Adipositas gefunden werden. Auch im Hinblick auf individuelle Präventionsstrategien besteht ein besonderes Interesse, die genetisch festgelegten Risikofaktoren der Adipositas aufzuklären.

Neben übermäßiger Nahrungsaufnahme ist ein eingeschränkter Energieverbrauch an der Entstehung von Übergewicht beteiligt. Das braune Fettgewebe trägt mit seiner Fähigkeit zur Entkopplung der Atmungskette zum Energieverbrauch bei. Hierbei ist das UCP1 von herausragender Bedeutung. Der A→G Polymorphismus des UCP1 Gens wurde daher als Kandidatengen für die Adipositasentstehung eingestuft. Zur Prüfung dieses Zusammenhangs wurde die vorliegende Untersuchung an einem großen deutschen Studienkollektiv durchgeführt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich in dieser Untersuchung für den A→G Polymorphismus kein großer Einfluß für die Adipositasentstehung abzeichnet. Eine geringe Bedeutung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da bei schlanken Personen eine Differenz von 1 kg/m² mit dem G-Allel assoziiert war. Außerdem wurde eine altersabhängige Komponente festgestellt in der Hinsicht, daß durch den Polymorphismus eine schnelle Gewichtszunahme in jungen Jahren gefördert wird. Die nicht betroffenen Personen sind nicht unbedingt schlanker, vielmehr verstreicht mehr Zeit, bis die Adipositas ausgeprägt ist, da die Gewichtszunahme langsamer von statten geht.

Zudem wurde ein negativer Einfluß des UCP1 Polymorphismus auf die Lipidwerte festgestellt, wobei insbesondere die HDL-Werte der G-Allel-Träger niedriger waren als bei Normaltypen. Für einen Zusammenhang von A→G Polymorphismus und Diabetes mellitus Typ 2 wurden keine Anhaltspunkte gefunden.

Literaturverzeichnis

- Allison DB, Faith MS, Nathan JS (1996) Risch's lambda values for human obesity. *Int. J. Obes.* **20**: 990 – 999.
- Arner P, Hoffstedt J (1999) Adrenoceptor genes in human obesity. *J. Intern. Med.* **245** (6): 667 – 672.
- Bassam BJ, Caetano Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **196** (1): 80 – 83.
- Boss O, Samec S, Paolini-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobini J-P (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* **408**: 39 – 42.
- Bouchard C (1996) The genetics of obesity in humans. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes.* **3**: 29 – 35.
- Brun RP, Spiegelman BM (1997) PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J. Endocrinol.* **155** (2): 217 – 218.
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP (1992) Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* **71**: 1195 – 1204.
- Carey DPG, Nguyen TV, Campbell LV, Chisholm DJ, Kelly P (1996) Genetic influences on central abdominal fat: a twin study. *Int. J. Obes.* **20**: 722 – 726.
- Cassard AM, Bouillaud F, Mattei MG, Hentz E, Raimbault S, Thomas M, Ricquier D (1990) Human uncoupling protein gene: Structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J. Cell. Biochem.* **43**: 255 – 264.
- Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Chagnon M, Gelly C, Dionne FT, Oppert JM, Bouchard C, Chagnon Y, Ricquier D (1996) The Bcl I polymorphism of the human uncoupling protein (UCP) gene is due to a point mutation in the 5' flanking region. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **20** (3): 278 – 279.
- Chagnon YC, Pérusse L, Bouchard C (1997) Familial aggregation of obesity, candidate genes and quantitative trait loci. *Curr. Opin. Lipid.* **8**: 205 – 211.

- Chua SC Jr, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. **271**: 994 – 996.
- Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P (1996) Additive effect of A→G (-3826) variant of the uncoupling protein and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **20** (12): 1062 – 1066.
- 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, Froguel P, Guy Grand B (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**: 398 – 401.
- Colditz GA, Willett WC, Stampfer MR (1990) Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am. J. Epidemiol.* **132**: 501 – 53.
- Comuzzie AG, Allison DB (1998) The search for human obesity genes. *Science*. **280**: 1374 – 1377.
- Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF (1996) The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. **45** (7): 992 – 994.
- Deprés JP (1991) Obesity and lipid metabolism: relevance of body fat distribution. *Curr. Opin. Lipid.* **2**: 5 – 15.
- Dulloo AG, Miller DS (1984) Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **62** (2): 235 – 240.
- Echwald SM (1999) Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *J. Intern. Med.* **245**: 653 – 666.
- Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold sensitive but not obese. *Nature*. **387**: 90 – 94.
- Esterbauer H, Oberkofler H, Liu Y-M, Breban D, Hell E, Krempler F, Patsch W (1998) Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J. Lipid. Res.* **39**: 834 – 844.
- Evans D, Minouche S, Hagemann G, Mann WA, Went D, Wolf A, Beisiegel U (2000) Frequency of and interaction between polymorphisms in the β 3-adrenergic receptor and in uncoupling proteins 1 and 2 and obesity in Germans. *Int. J. Obes.* **24**: 1239 – 1245.

- Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960 - 1994. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22** (1): 39 – 47.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* **15**: 269 – 272.
- Fleury C, Sanchis D (1999) The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31** (11): 1261 – 1278.
- Fogelholm M, Valve R, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Hakkarainen V, Laakso M, Uusitupa M (1998) Additive effects of the mutations in the β_3 -adrenergic receptor and uncoupling protein-1 genes on weight loss and weight maintenance in Finish Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 4146 – 4250.
- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* **1** (12): 1311 – 1314.
- Friedman JM (1997) The alphabet of weight control. *Nature* **385**: 119 – 120.
- Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Ogihara T (1998) Metaanalysis of the assoziation of trp64arg polymorphism of β_3 -adreneergic receptor gene with body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 2441 – 2444.
- Fumeron F, Durack-Bown I, Betoulle D, Cassard-Doulcier AM, Tuzet S, Bouillaud F, Melchior JC, Ricquier D, Apfelbaum M (1996) Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and beta 3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low calorie diet. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **20** (12): 1051 – 1054.
- Gagnon J, Lago F, Chagnon YC, Pérusse L, Naslund I, Lissner L, Sjostrom L, Bouchard C (1998) DNA polymorphism in the human uncoupling protein 1 (UCP1) gene is has no effect on obesity related phenotypes in the Swedish Obese Subjects cohorts. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22** (6): 500 – 505.
- Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA (1997) Cloning and characterization of an uncoupling protein homologue. A potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* **46**: 900 – 906.
- Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β_3 -adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem.* **272**: 24129 – 24132.
- Gunay Aygun M, Cassidy SB, Nicholls RD (1997) Prader Willi and other syndromes associated with obesity and mental retardation. *Behav. Genet.* **27** (4): 307 – 324.

- Hamann A, Flier JS, Lowell BB (1996) Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology*. **137** (1): 21 – 29.
- Hamann A, Greten H (1999) Neue Optionen für die Adipositas-Therapie. *Dt. Ärztebl.* **96**: A3240 – 3242.
- 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** (7): 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 (UCP1) gene in obese and lean subjects: identification of four amino acid variants. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22** (9): 939 – 941.
- Hauner H (1997) Strategie der Adipositas-therapie. *Der Internist* **38** (3): 244 – 250.
- Hayakawa T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Takamura T, Abe T, Nomura G, Kobayashi K (1999) Phenotypic characterization of the β 3-adrenergic receptor mutation and the uncoupling protein 1 polymorphism in Japanese men. *Metabolism* **48** (5): 636 – 640.
- Hetherington AW, Ranson SW (1942) *Am. J. Physiol.* **136**: 609 – 617.
- Hoffmeister H, Mensing GBM, Stolzenberg H (1994) National trends in risk factors for cardiovascular disease in Germany. *Prevent. Med.* **23**: 197 – 205.
- Hubert HB, Feinlieb M, McNamara PM, Castelli WP (1983) Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study. *Circulation*. **67**: 968 – 977.
- Ito T, Tanuma Y, Yamada M, Yamamoto M (1991) Morphological studies on brown adipose tissue in the bat and in humans of various ages. *Arch. Histol. Cytol.* **54** (1): 1 – 39.
- Jezek P, Garland KD (1998) Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30** (11): 1163 – 1168.
- Kato M, Shimazu M, Moriguchi S, Kishino Y (1996) Body mass index (BMI) is a reliable index to estimate obesity as a risk factor for deteriorating health. *Tokushima. J. Exp. Med.* **43**: 1 – 6.
- Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H,

- Glucksmann-Kuis MA, Moore KJ (1996) Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. *Cell*. **85** (2): 281 – 290.
- Kluthe R, Schubert A (1985) Obesity in Europe. *Ann. Intern. Med.* **103**: 1037 – 1042.
- Kogure A, Yoshida T, Sakane N, Umekawa T, Takakura Y, Kondo M (1998) Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and β 3-adrenergic receptor genes on weight loss in obese Japanese. *Diabetologia*. **41**: 1399.
- Kohlmeier L, Kroke A, Pötsch J, Kohlmeier M, Marten K (1993) Ernährungsabhängige Krankheiten und ihre Kosten. Band 27 der Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit. Baden-Baden: Nomos Verlagsgesellschaft.
- Kopecky J, Clarke G, Enerback S, Spiegelman B, Kozak LP (1995) Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the *aP2* gene promoter prevents genetic obesity. *J. Clin. Invest.* **96** (6): 2914 – 2923.
- Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL (1994) Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA* **272** (3): 205 – 211.
- Kuczmarski RJ, Carroll MD, Flegal KM, Troiano RP (1997) Varying body mass index cut-off points to describe overweight prevalence among U.S. adults: NHANES III (1988 to 1994). *Obes. Res.*: **5** (6): 542 – 548.
- Kumar MV, Moore RL, Scarpace PJ (1999) Beta3 adrenergic regulation of leptin, food intake, and adiposity is impaired with age. *Pflugers Arch.* **438** (5): 681 – 688.
- Langin D, Larrouy D, Barbe P, Millet L, Viguerie Bascands N, Andreelli F, Laville M, Vidal H (1999) Uncoupling protein 2 (UCP2) and uncoupling protein 3 (UCP3) expression in adipose tissue and skeletal muscle in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23** Supp. 6: 64 – 67.
- Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjöström L (1984) Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br. Med. J.* **289**: 1257 – 1261.
- Larsson B, Swärsund K, Welin L, Wilhelmsen L, Björntop P, Tibblin G (1984) Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: a 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br. Med. J.* **288**: 1401 – 1404.
- Lean ME, Han TS, Morrison CE: (1995) Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *Br. Med. J.* **311**: 158 – 161.

- Lee GH, Li C, Montez J, Halaas J, Darvishzadeh J, Friedman JM (1997) Leptin receptor mutations in 129 db (3j) /db (3j) mice and fa (cp)/ fa (cp) rats. *Mammalian Genome* **8**: 445 – 447.
- Lin CS, Klingenberg M (1980) Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* **113** (2): 299 – 303.
- Löffler G, Petrides PE (1990) Physiologische Chemie. Lehrbuch der medizinischen Biochemie und Pathobiochemie für Studierende und Ärzte. 4. Auflage, 1. korrigierter Nachdruck, Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Lönnqvist F, Nordfors L, Schalling M (1999) Leptin and its potential role in human obesity. *J. Intern. Med.* **245**: 643 – 652.
- Lowell BB, S Susulic V, 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.
- Lowell BB, Flier JS (1997) Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu. Rev. Med.* **48**: 307 – 316.
- Maffei M, Stoffel M, Barone M, Moon B, Dammerman M, Ravussin E, Bogardus C, Ludwig DS, Flier JS, Talley M (1996) Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes.* **45** (5): 679 – 682.
- Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH (1990) A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *New. Engl. J. Med.* **322**: 882 – 889.
- Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Speizer FE (1995) Body weight and mortality among women. *New. Engl. J. Med.* **333**: 677 – 685.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16** (3): 1215.
- Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D (1997) Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J. Clin. Invest.* **100**: 2665 – 2670.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst 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 – 907.
- Müller MJ, Körtzinger I, Mast M, König E (1998) Prävention der Adipositas. *Dt Ärztebl.* **95**: A2027 – 2030.

- Nagase I, Yoshida T, Kumamoto K, Umekawa T, Sakane N, Nikami H, Kawada T, Saito M (1996) Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3 adrenergic agonists. *J. Clin. Invest.* **97** (12): 2898 – 2904.
- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH (1995) Hyperproinsulinemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase-e mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.* **10** (2): 130 – 131.
- Nicholls DG, Locke RM (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological Reviews* **64** (1): 1 – 64.
- Nnodim JO, Lever JD (1988) Neural and vascular provisions of rat interscapular brown adipose tissue. *Am. J. nat.* **182** (3): 283 – 293.
- Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishina PM (1996) A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* **380**: 534-538.
- Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Breban D, Hell E, Krempler F, Patsch W (1997) Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissue of obese and non-obese humans *J. Lipid. Res.* **38**: 2125 – 2133.
- Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Pérusse L, Bouchard C (1994) DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **18**: 526 – 531.
- Pérusse L, Chagnon YC (1997) Summary of human linkage and association studies. *Behav. Genet.* **27** (4): 359 – 372.
- Pérusse L, Deprés JP, Lemieux S, Rice T, Rao DC, Bouchard C (1996) Familial aggregation of abdominal visceral fat level: results from the Quebec family study. *Metabolism* **45**: 378 – 382.
- Pérusse L, Chagnon YC, Bouchard C (1998) Etiology of massive obesity: Role of genetic factors. *World J. Surg.* **22**: 907 – 912.
- Porte D Jr, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW (1998) Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia.* **41** (8): 863 – 881.
- Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, Boyce V, Howard BV, Bogardus C (1988) Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body weight gain. *New. Engl. J. Med.* **318** (8): 467 – 472.
- Reaven GM (1993) Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X): an expanded definition. *Annu. Rev. Med.* **44**: 121 – 131.

- Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE (1998) Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *J. Am. Med. Assoc.* **280**: 1843 – 1848.
- Ricquier D, Nechad M, Mory G (1982) Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54** (4): 803 – 807.
- Ricquier D, Casteilla L, Bouillaud F (1991) Molecular studies of the uncoupling protein. *FASEB J.* **5** (9): 2237 – 2242.
- Ricquier D, Fleury C, Larose M, Sanchis D, Pecqueur C, Raimbault S, Gelly C, Vacher D, Cassard Doulier AM, Levi Meyrueis C, Champigny O, Miroux B, Bouillaud F (1999) Contributions of studies on uncoupling proteins to research on metabolic diseases. *J. Intern. Med.* **245** (6): 637 – 642.
- Roche C, Boutin P, Dina C, Gyapay G, Basdevant A, Hager J, Guy Grand B, Clement K, Froguel P (1997) Genetic studies of neuropeptide Y and neuropeptide Y receptors Y1 and Y5 regions in morbid obesity. *Diabetologia.* **40** (6): 671 – 675.
- Rothwell NJ, Stock MJ (1979) A role for brown adipose tissue in diet induced thermogenesis. *Nature.* **281**: 31 – 35.
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**: 1350 – 1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 487 – 491.
- Schäffler A, Palitzsch K-D, Watzlawek E, Drobnik W, Schwer H, Schölmerich J, Schmitz G (1999) Frequency and significance of the A \rightarrow G (-3826) polymorphism in the promotor of the gene for the uncoupling protein-I with regard to the metabolic parameters and adipocyte transcription factor binding in a large population-based Caucasian cohort. *Eur. J. Clin. Invest.* **29** (9): 770 – 779.
- Seidell JC (1999) Obesity: A growing problem. *Int. J. Paed.* **428 Supp.**: 46 – 50.
- Silva JE, Rabelo R (1997) Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur. J. Endocrinol.* **136**: 251 – 264.
- Society of Actuaries (1959) Build and blood pressure study. Volume 1. Society of Actuaries, Chicago.

- Society of Actuaries and Association of Life Insurance Medical Directors of America (1979) Build Study. Society of Actuaries and Association of Life Insurance Medical Directors of America, Chicago.
- Solanes G, Vidal-Puig A, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) The human uncoupling protein-3 gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 25433 – 25436.
- Strachnan T (1994) Das menschliche Genom. Spektrum, Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Strachnan T, Read AP (1996) Molekulare Humangenetik. Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Su HY, Sheu WH, Chin HML, Yeng CY, Chen YDI, Reaven GM (1995) Effect of weightloss and blood pressure and insulin resistance in normotensive and hypertensive obese individuals. *Am. J. Hypertension* **8**: 1067 – 1071.
- Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, Himms Hagen J, Flier JS, Lowell BB (1995) Targeted disruption of the beta 3 adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* **270** (49): 29483 – 29492.
- Takaya K, Ogawa Y, Hiraoka J, Hosoda K, Yamori Y, Nakao K, Koletsky RJ (1996) Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat [letter]. *Nat. Genet.* **14** (2): 130 – 131.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor. *Cell.* **83**: 1263 – 1271.
- Tonello C, Dioni L, Briscini L, Nisoli E, Carruba MO (1998) SR59230A blocks beta3 adrenoceptor linked modulation of uncoupling protein 1 and leptin in rat brown adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **352** (1): 125 – 129.
- Umekawa T, Yoshida T, Sakane N, Saito M, Kumamoto K, Kondo M (1997) Anti obesity and anti diabetic effects of CL316,243, a highly specific beta 3 adrenoceptor agonists, in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats: induction of uncoupling protein and activation of glucose transporter 4 in white fat. *Eur. J. Endocrinol.* **136** (4): 429 – 437.
- Urhammer SA, Fridberg M, Sorensen TI, Echwald SM, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O (1997) Studies of genetic variability of the uncoupling protein 1 gene in Caucasian subjects with juvenile-onset obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 4069 – 4074.
- Valve R, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa M (1998) Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* **41**: 357 – 361.

- Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) UCP 3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 79 – 82.
- Wechsler JG (1997) Adipositas und Fettstoffwechselstörungen. *Der Internist* **38**: 231 – 236.
- Wechsler JG, Hutt V, Wenzel H, Kloer HU, Ditschneit H (1981) Lipids and lipoproteins during a very low calorie diet. *Int. J. Obes.* **6**: 325.
- Wechsler JG, Schusdziarra V, Hauner H, Gries FA (1996) Therapie der Adipositas. *Dt. Arztebl.* **93**: A2214 – 2218.
- Weck M, Fischer S (1997) Ätiologie der Adipositas. *Der Internist* **38**: 204 – 213.
- Wirth A. (1997) Adipositas: Erhöhte Mortalität durch arteriosklerotische Folgekrankheiten und Karzinome. *Der Internist* **38**: 214 – 223.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425 – 432.

Anhänge

Anhang A

Materialien

Lösungen und Puffer

Acrylamidlösung (40 %)	29 Teile Acrylamid 1 Teil N,N'Metylen Bisacrylamid
Loading Puffer	1 x TBE, Glycerin 40 %, Bromphenol Blau
Lyse - Puffer	10 mM Tris - HCl (pH 8,2), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA
Proteinase K	100 mg Proteinase K, 10 ml SDS 10 %, 20 ml EDTA 0,5 M, 70 ml H ₂ O
STE - Waschpuffer	20 mM Tris - HCl (pH 7,4), 5 mM NaCl, 0,1 mM EDTA
1 x TBE	84 mM Tris, 90 mM Borsäure, 0,02 mM EDTA
1 x TE	10 mM Tris - HCl (pH 7,4), 0,2 mM EDTA

Chemikalien

Acrylamid	Appligene Onkor
Ammoniumpersulfat (AMP, 10 %)	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenol Blau	Merck

EDTA	Merck
Essigsäure (10 %)	Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma
Formaldehyd (HCOH, 37 %)	Merck
Glyzerin	Merck
Methanol 30 %	Merck
N,N`Metylen Bisacrylamid	Appligene Onkor
Natriumcarbonat (NaCO ₃ , 10 %)	J. T. Baker
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃ , 20 mg/ml)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃ , 10 %)	Roth
SDS (10 %)	Serva
TEMED	Serva
Tris - HCL	Gibco

EDTA - Blut

S - Monovette KE	Sarstedt
------------------	----------

PCR - Reagenzien

dNTP Set, PCR Grade	Boehringer Mannheim
H ₂ O, HPLC Grade	Boehringer Mannheim
MgCl ₂ (25 mM)	Qiagen
Mineralöl	Sigma

UCP1 Primer vorwärts (10 pmol/ μ l)	Perkon Elmer
UCP1 Primer rückwärts(10 pmol/ μ l)	Perkon Elmer
Taq DNA - Polymerase (5 Unit/ml)	Qiagen
PCR - Puffer 10x (15 mM MgCl ₂)	Qiagen

Restriktionsendonuclease

Bcl 1	Boehringer Mannheim
-------	---------------------

Größenmarker

1 kb DNA - Leiter	25 μ l 1 kb Ladder (1 μ l/ μ g, Gibco), 50 μ l Loading Puffer, 175 μ l H ₂ O,
-------------------	---

Geräte

Elektrophoresekammer	Minigel - System, Biometra
PCR - Amplifier	Biometra Trio - Thermoblock
Kamera und Filme	Polaroid
Netzgeräte	Biorad, Biometra
UV - Lampe	Biometra
Wärmeschrank	GFL
Zentrifugen	Hettrich, Heraeus Biofuge fresco

Anhang B

Abkürzungen

Apo	Apoprotein
ATP	Adenosin - Triphosphat
β3A	β3 - Adrenorezeptor
β2AR	β3 - Adrenorezeptor
bp	Basenpaare
BMI	Body mass index; Körpermassenindex, errechnet sich aus Körpergewicht pro Körpergröße ² (kg/m ²)
cAMP	Cyclo - Adenosin - Monophosphat
Chol.	Cholesterin
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
dNTP	Desoxy Nucleosidtriphosphat
dom.	Dominant
DTA	Diphtheria Toxin A
EDTA	Ethylenediamine - tetraacetic acid
HDL	High density lipoprotein; Lipoproteine hoher Dichte
HLP	Gemischte Hyperlipidämie, gemeinsames Vorkommen von Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie, Bezeichnung für das Kollektiv der Patienten mit gemischter Hyperlipidämie
HTG	Hypertriglyzeridämie, Triglyzeride > 200 mg/dl
Hypercholesterin	Hypercholesterinämie, Cholesterin > 200 mg/dl, Bezeichnung für das Kollektiv der Patienten mit Hypercholesterinämie

Kb	Kilobasen
LDL	Low density lipoprotein; Lipoproteine niedriger Dichte
mRNA	messenger - RNA
NPY	Neuropeptid Y
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase - Ketten - Reaktion
PPAR - γ	Peroxisome proliferator activated receptor - γ
Rez.	Rezessiv
RFLP	Restriktionsfragment - Längenpolymorphismus
UCP1	Uncoupling protein - 1; Entkopplungsprotein; Thermogenin
UCP2	Uncoupling protein - 2
UCP3	Uncoupling protein - 3
UKE	Universitätskrankenhaus Hamburg - Eppendorf
UCP - DTA Maus	Transgene Maus, deren Menge an UCP und braunem Fettgewebe durch Expression von Diphtherie Toxin A (DTA) reduziert ist
VLDL	Very low density lipoprotein; Lipoproteine sehr niedriger Dichte
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein Dank gilt Professor Ulrike Beisiegel für die gute fachliche und persönliche Beratung und für die Überlassung des interessanten Themas. Ein Teil der Arbeit wurde durch Beschäftigung als studentische Hilfskraft finanziell unterstützt.

Herrn Dr. Dave Evans danke ich für die Betreuung und kritische Auseinandersetzung während des experimentellen Arbeitsteils. Dorte möchte ich herzlich für die jederzeit gewährte unkomplizierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danken. Allen Mitarbeitern des biochemischen Stoffwechsellabor danke ich für die mir entgegengebrachte Kooperation und den tatkräftigen Beistand.

Marcus danke ich von Herzen für die stetige moralische Unterstützung und Geduld während der Verwirklichung dieser Arbeit. Meinen Eltern danke ich, daß sie mir mit jederzeit großzügiger Unterstützung den Weg zu dieser Arbeit ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten Gesa Hagemann
geboren am 9. März 1972 in Kiel

Schulbildung
1978 – 1982 Grundschule in Molfsee
1982 – 88, 1989 – 91 Kieler Gelehrtenschule, Abschluß mit dem Abitur 6/1991

Auslandsaufenthalt
09/1991 – 03/1992 Sprachstudium in Paris, Frankreich

Akademischer Werdegang
04/1992 – 10/1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
11/1998 Aufnahme des Promotionsstudiums an der Universität Hamburg
Betreuung durch Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. U. Beisiegel,
Direktorin der Abteilung für Molekulare Zellbiologie,
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Thema: Assoziationen des A→G Polymorphismus im Gen des
Uncoupling Protein 1 mit Adipositas in der deutschen Bevölkerung
11/1998 – 12/1999 Experimenteller Arbeitsteil
01/2000 – 10/2001 Statistische Auswertung, Anfertigung der Dissertation
10/2001 Antrag auf Zulassung zur Promotion

Publikation
Evans D, Minoucher S, Hagemann G, Mann WA, Went D, Wolf A, Beisiegel U (2000)
Frequency of and interaction between polymorphisms in the β 3-adrenergic receptor and in
uncoupling proteins 1 and 2 and obesity in Germans. Int. J. Obesity 24: 1239-45

Berufstätigkeit
03/2000 – 09/2000 AIP in der Abteilung für Nephrologie am Klinikum Nord, Hamburg
Ltd. Arzt: Prof. Dr. H. Liebau, seit 7/00 PD. Dr. K. Wagner
10/2000 – 09/2001 AIP in der 4. Medizin, AK Barmbek, Hamburg
Ltd. Arzt: PD. Dr. K. Wagner
09/01 Erteilung der Approbation

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe, andere als die von mir angegebenen 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 einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.