

Meinen Eltern  
Johanna und Gerhard Michel  
in Liebe gewidmet

AUS DER ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE DES  
INSTITUTS FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND  
MOLEKULARBIOLOGIE DER  
UNIVERSITÄTSKLINIKEN HAMBURG-EPPENDORF

DIREKTORIN: PROF. DR. RER. PHYSIOL. DR. H.C. ULRIKE BEISIEGEL

Assoziation der Variante Pro115Gln im *PPAR* $\gamma$ 2-Gen  
mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ II

**D i s s e r t a t i o n**

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

von

Ursula Michel  
aus Königstein im Taunus

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 17. März 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. U. Beisiegel

Datum des Rigorosums: 22. Mai 2003

**INHALTSVERZEICHNIS**

Seite

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
	Überblick	1
1.1	Adipositas - Zusammenhänge und Hintergründe	2
1.2	Physiologische Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs	5
1.3	Genetische Faktoren und Umwelteinflüsse als Adipositasursache	10
1.4	Einfluss von Mutationen auf die Adipositasentstehung	12
1.5	Zusammenhänge zwischen Diabetes und Adipositas	15
1.6	Lipid-induzierte Genexpression	20
1.7	Funktion und Bedeutung von <i>PPAR<math>\gamma</math></i>	25
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>34</b>
3.1	Patientengut	34
3.2	Chemikalien	35
3.3	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	36
3.3.1	Stammlösungen für DNA-Extraktion	36
3.3.2	Arbeitslösungen für DNA-Extraktion	37
3.3.3	Zusammensetzung des 10xTBE-Puffers	38
3.3.4	Herstellung eines 10%igen Polyacrylamidgels 1xTBE	39
3.3.5	Zusammensetzung des Loading buffers	39
3.3.6	Zusammensetzung der Färbelösung	39
3.4	Weitere Materialien	40
3.5	Geräte	40
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
4.1	DNA-Extraktion	41
4.2	Amplifikation des erforderlichen DNA-Abschnittes durch PCR	42
4.3	Herstellung der Negativ-Kontrolle	43
4.4	Herstellung der Positiv-Kontrolle von <i>PPAR<math>\gamma</math></i>	43
4.5	Restriktionsverdau	45
4.6	Elektrophorese und Färbung	46
4.7	Kontrolle der Methoden durch Einsatz des Mutantenklons aus der Arbeit von <i>Ristow et al.</i> 1998	46
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
5.1	Ergebnis der Überprüfung der Methoden durch Einsatz des Klons der Pro115Gln-Mutation	49
5.2	Resultat des Mutationsnachweises bei adipösen Probanden	51
5.3	Resultat des Mutationsnachweises bei Probanden mit Diabetes mellitus Typ II	52
5.4	Resultat des Mutationsnachweises bei der Kontrollgruppe aus gesunden Probanden	53
5.5	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	54

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
6.1	Mögliche Ursachen für das Zustandekommen differierender Ergebnisse	56
6.2	Folgerungen, die sich aus den Ergebnissen ableiten lassen	58
6.3	Bedeutung der Ergebnisse im Rahmen nachfolgender Studien	59
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>77</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<i>a</i> P2	Adipocyte fatty acid binding protein P2
AMPS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
BMI	Body Mass Index
C/EBP	CAAT/Enhancer-bindendes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Gln	Glutamin
HRE	Hormone-Response-Element
KHK	Koronare Herzkrankheit
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NPY	Neuropeptid Y
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pro	Prolin
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VMH	Ventromedialer Hypothalamus
VLH	Ventrolateraler Hypothalamus
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

## Überblick

Die häufig mit einem Typ II-Diabetes mellitus vergesellschaftete Adipositas wird beim Menschen durch eine Kombination aus Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren verursacht, wobei letztere Störungen der Regulation bei der Nahrungsaufnahme, Energiespeicherung und des Energieverbrauches bewirken können. Stark adipöse Personen weisen eine Hyperplasie sowie eine Hypertrophie der Fettzellen auf, weshalb sich die Analyse der Vorgänge bei der Adipozyten-Differenzierung anbietet, um Ursachen der Veränderungen bei Adipösen zu ermitteln.

Der zu der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren gehörende Transkriptionsfaktor *PPAR $\gamma$ 2* scheint eine Schlüsselrolle in der Regulation der Adipozyten-Differenzierung zu spielen. Da die Phosphorylierung der Aminosäure Serin an Position 114 des Gens für *PPAR $\gamma$ 2* zu einer verminderten Aktivität dieses Transkriptionsfaktors führt und somit die Adipozyten-Differenzierung beeinflussen kann, ist dieser Genort für die Ermittlung von möglicherweise Adipositas auslösenden Mutationen interessant, was *Ristow et al.* zu einer Studie veranlasste, die im Oktober 1998 unter dem Titel *Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation* im *New England Journal of Medicine* veröffentlicht wurde.

Diese Studie bot den Hintergrund der vorliegenden Arbeit.

## 1.1 Adipositas - Zusammenhänge und Hintergründe

Der menschliche Organismus ist in der Lage, Nahrungsenergie in Form von Fett zu speichern. Die Triglyzeride benötigen im Gegensatz zu Proteinen oder Glykogen kein Wasser oder Elektrolyte zur Speicherung und können daher als reines Fett in den Depots abgelegt werden, was in Phasen eingeschränkter oder unregelmäßiger Nahrungszufuhr vitale Bedeutung erlangt. Der Körper kann aus 1 g Fettgewebe annähernd die dem theoretisch berechenbaren Energieäquivalent entsprechenden 38 kJ (9 kcal) gewinnen, so dass eine normalgewichtige Person aufgrund der hohen Effizienz dieser Energiespeicherung zwei Monate totalen Nahrungsentzuges überleben könnte. Normalerweise besteht jedoch zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch ein Gleichgewicht, das so genau reguliert wird, dass sich selbst bei variierender Energieaufnahme und wechselnder körperlicher Aktivität keine Veränderungen der Fettmenge ergeben.

In der westlichen Gesellschaft sind aber nicht die sporadische und unzureichende Nahrungsaufnahme ein Charakteristikum, sondern die übermäßige Energiezufuhr durch ein konstantes Überangebot an Nahrung. Als Konsequenz hieraus ergibt sich ein negativer Effekt der Fähigkeit Fett zu speichern, denn die sich infolge der Überernährung entwickelnde Fettsucht stellt einen häufig das Leben verkürzenden Faktor dar, so dass sich in den westlichen Industriestaaten die Adipositas durch eine ständig zunehmende Inzidenz als Gesundheitsrisiko zu einem großen sozialökonomischen Problem entwickelt hat und zunehmend jüngere Menschen betrifft; selbst im Kindesalter unterliegt die Prävalenz der Fettsucht einem ständigen Wachstum. So nimmt man eine durchschnittliche Prävalenz der Adipositas von 15-20% mit steigender Tendenz in den Industriestaaten (Europa, USA, Kanada, Australien) an [63].

Man versteht unter Adipositas das Bestehen einer zu großen Menge an Fettgewebe, das durch eine positive Energiebilanz entstanden ist. Um das Übergewicht besser definieren zu können, gibt es verschiedene Bezugsgrößen, unter anderem das Normalgewicht nach Broca (Körperlänge [cm] – 100) und den Body Mass Index (=Quetelet-Index), den man wie folgt errechnet:



$$\frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{\text{Körpergröße [m]}^2}$$

Eine normalgewichtige Frau hat einen Body Mass Index (BMI) von etwa 23 kg/m<sup>2</sup>, ein normalgewichtiger Mann von 24 kg/m<sup>2</sup>.

Bei einem Body Mass Index von über 30 kg/m<sup>2</sup> spricht man von Adipositas, die international folgendermaßen klassifiziert wird:

Internationale Klassifikation zur Einteilung des Schweregrads der Adipositas nach dem BMI

		BMI (kg/m <sup>2</sup> )
Normalgewicht		18,5-24,9
Übergewicht		25-29,9
Adipositas	Grad I	30-34,9
	Grad II	35-39,9
extreme Adipositas	Grad III	≥ 40

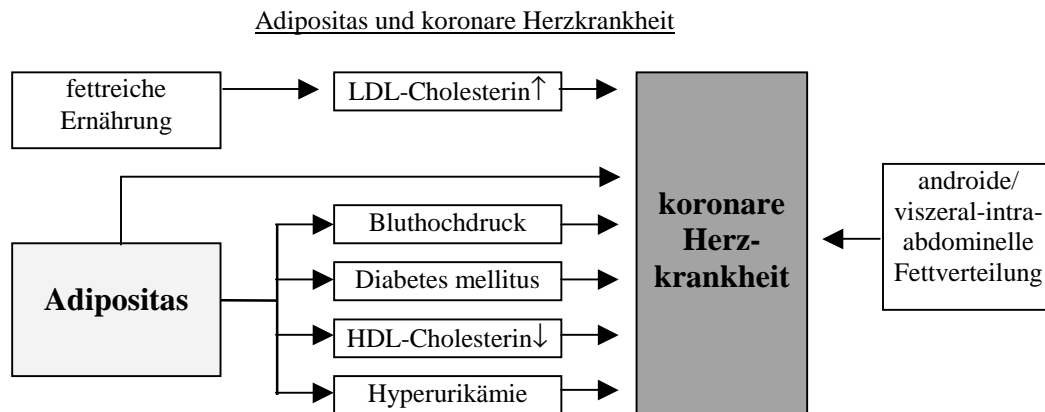
**Tabelle 1**

aus: *Hauer*, Thiemes Innere Medizin: TIM, Georg Thieme Verlag, 1999

Allerdings kann die Grenze zwischen normal und adipös nur näherungsweise festgelegt werden, weshalb man Adipositas am besten als Einlagerung überschüssigen Fettes mit der Folge gesundheitlicher Risiken definiert, wobei das vorhandene Gesundheitsrisiko wahrscheinlich mit dem Ausmaß der Fettsucht gekoppelt ist. Der BMI korreliert zwar mit dem Grad der Adipositas, jedoch kann das überhöhte Gewicht sowohl durch Fett als auch durch fettfreie Gewebe zustande kommen, so dass muskelstarke Personen infolge dieser Messungen ebenfalls als adipös gelten müssten. Dennoch korrelieren die Messungen des BMI recht gut mit dem Risiko negativer Auswirkungen auf Gesundheit und Lebenserwartung. Die Bestimmung der Körperdichte mittels der Isotopen-Verdünnungs-Methode ergibt zwar präzisere Ergebnisse bezüglich des Ausmaßes der Fettsucht, jedoch ist dies für die Anwendung in der täglichen Routine eine wenig praktikable Messung. Häufiger Verwendung finden andere Meßmethoden, so zum Beispiel Sonographie, Computertomographie oder Hautfaltendicke-Messung, mittels derer sich der Anteil an Fettgewebe gut erfassen lässt.

Adipositas ist der wichtigste Promotor vieler kardiovaskulärer Risikofaktoren (Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Typ-II-Diabetes mellitus, Störungen der Hämostase und Fibrinolyse), wobei diese wiederum die Entstehung der koronaren Herzkrankheit begünstigen [39].

Abgesehen davon gilt Übergewicht ohnehin als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Krankheiten.



**Abbildung 1**

aus: *Classen/Diehl/Kochsiek*, Innere Medizin, Urban & Schwarzenberg, 1994

Vom gesundheitlichen Aspekt her weisen einige Adipositas-Muster größere Bedeutung auf als andere, da das Gesundheitsrisiko maßgeblich mit dem Fettverteilungsmuster korreliert [50].

So ist beim **gynoiden** Fettsuchttyp, der durch die Anhäufung von Fett im gluteofemorale Bereich gekennzeichnet ist, das Risiko für eine KHK eher niedrig, es treten bei diesem Typ eine mäßige Triglyzeriderhöhung und Insulinresistenz an metabolischen Veränderungen auf. Die Fettansammlung im Gluteal- und Femoralbereich reagiert hinsichtlich der Lipolyse weniger sensitiv auf adrenerge Stimuli, Störungen des Lipidstoffwechsels kommen bei diesem Fettverteilungsmuster seltener vor [62].

Ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen besteht beim **androiden** Fettverteilungstyp mit ausgeprägter Fettansammlung im abdominalen Bereich, wobei hier verstärkt Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Hypertriglyzeridämie sowie eine HDL-Erniedrigung auftreten [62].

Ein **viszeral-intraabdominelles** Verteilungsmuster geht mit einer ausgeprägten Insulinresistenz (Diabetes mellitus vom Typ II) einher sowie mit einer starken Hypertriglyzeridämie infolge einer erhöhten omentalen Lipolyse, gesteigerter VLDL-Synthese und Hyperlipazidämie, es besteht hier sogar ein sehr hohes Risiko an einer KHK zu erkranken [62].

Weitere Gesundheitsrisiken eines adipösen Patienten sind Atemwegserkrankungen (Einschränkung der Lungenfunktion, Schlaf-Apnoe-Syndrom), gastrointestinale Erkrankungen (dyspeptische Beschwerden, Cholezystolithiasis), Erkrankungen des Bewegungsapparates und ein um das 1,5-2fach erhöhtes Karzinomrisiko (Männer: v.a. kolorektale und Prostatakarzinome, Frauen: v.a. kolorektale Karzinome und östrogenabhängige Tumore) [52]. Die zahlreichen Folgeerkrankungen sowie die bei ausgeprägter Adipositas deutlich erhöhte Mortalität machen es bei der in den westlichen Industrieländern ausgesprochen hohen Prävalenz des Übergewichtes erstrebenswert, weitere prädisponierende Faktoren dieses multifaktoriellen und kausal noch relativ unerforschten Gesundheitsrisikos zu ermitteln.

Bis heute gibt es noch kein einheitliches Konzept für die Entstehung der Adipositas.

## **1.2 Physiologische Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs**

Die physiologische Regulation der Nahrungsaufnahme erfolgt durch das Hunger- und das Sättigungsgefühl, die im wesentlichen durch das Hungerzentrum und das Sättigungszentrum im **Hypothalamus** vermittelt werden, der als oberstes Integrationsorgan für alle humoralen und neuronalen Signale zur Regulierung des Körpergewichts fungiert [73]. Das Gehirn erhält von der Peripherie eine Vielzahl von afferenten Signalen aus dem Regelkreis der Körpergewichtsregulierung, hierunter nennenswert sind:

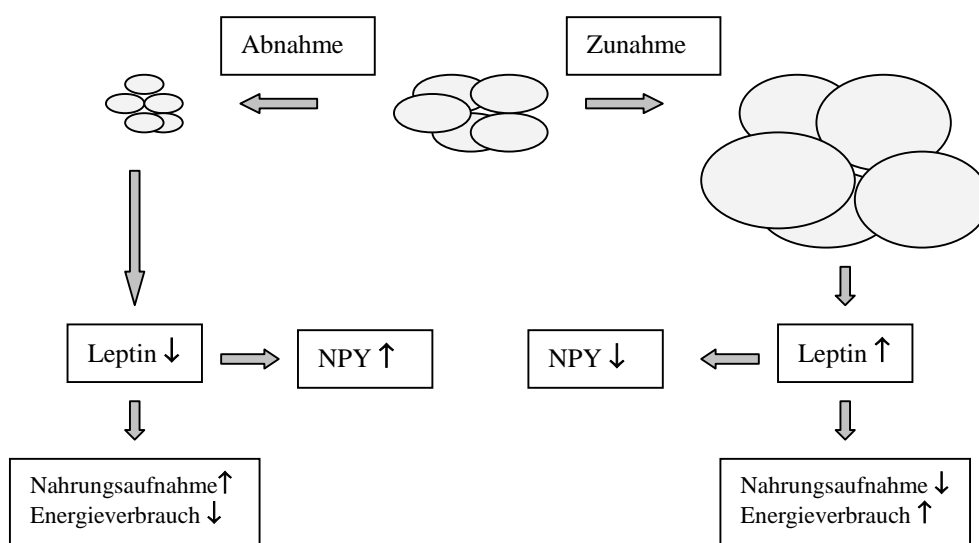
- sensorische Reize durch Geruchs- und Geschmacksempfindung
- visuelle Eindrücke
- mechanische Reize durch gastrisch-intestinale Distension [30]
- adrenerge Stimuli
- chemische-metabolische Signale, insbesondere Leptin, das Hormon des Fettgewebes, sowie der Anstieg des Glucose- und Insulinspiegels im Anschluss an eine Mahlzeit [30]
- soziale, kulturelle, psychologische und genetische Einflüsse

Im Hypothalamus laufen die verschiedenen Informationen über den Ernährungszustand zusammen, werden in einem neuronalen Netzwerk verarbeitet und von hier wird über ein efferentes neuronales Netzwerk die Nahrungsaufnahme und der Energieverbrauch gesteuert. Empfangsstationen für die afferenten Signale aus der Peripherie sind im Hypothalamus verschiedene Neuropeptid-produzierende Neuronen in Kerngebieten wie dem N. arcuatus bei der Ratte bzw. dem N. infundibularis beim Menschen, dem N. ventromedialis (VMH), in dem sich das Sättigungszentrum befindet, dem ventrolateralen Hypothalamus (VLH), dem das Hungerzentrum zugeordnet wird, dem N. dorsomedialis, dem N. paraventricularis und dem N. suprachiasmaticus [19,70]. Die Appetit-Regulierung erfolgt über eine gesonderte Verschaltung zwischen diesen hypothalamischen Zentren, in denen regulatorische Neuropeptide produziert werden, deren Bildungsrate von den Signalen aus der Peripherie beeinflusst wird. Durch die gebildeten Neurotransmitter erhält der Kortex **orexigene**, die Nahrungsaufnahme stimulierende Signale aus dem Hungerzentrum, das Sättigungszentrum moduliert diesen Prozess durch Aussenden inhibitorischer, **anorexigener** Impulse an das Hungerzentrum [30]. Zu den **orexigenen** Substanzen gehören Neuropeptid Y (NPY),  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Galanin, Orexin und das Agouti verwandte Protein (AgrP) [33]. **Anorexigen** wirken Neuropeptide wie das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), das  $\alpha$ -Melanocortin-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH), das Glukagon-artige Peptid (GLP-1) und das Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART) [33].

Die Motivation Nahrung aufzunehmen ergibt sich aus der Intensität des Gesamtsignals, das aus der Vielzahl den Appetit anregenden und hemmenden

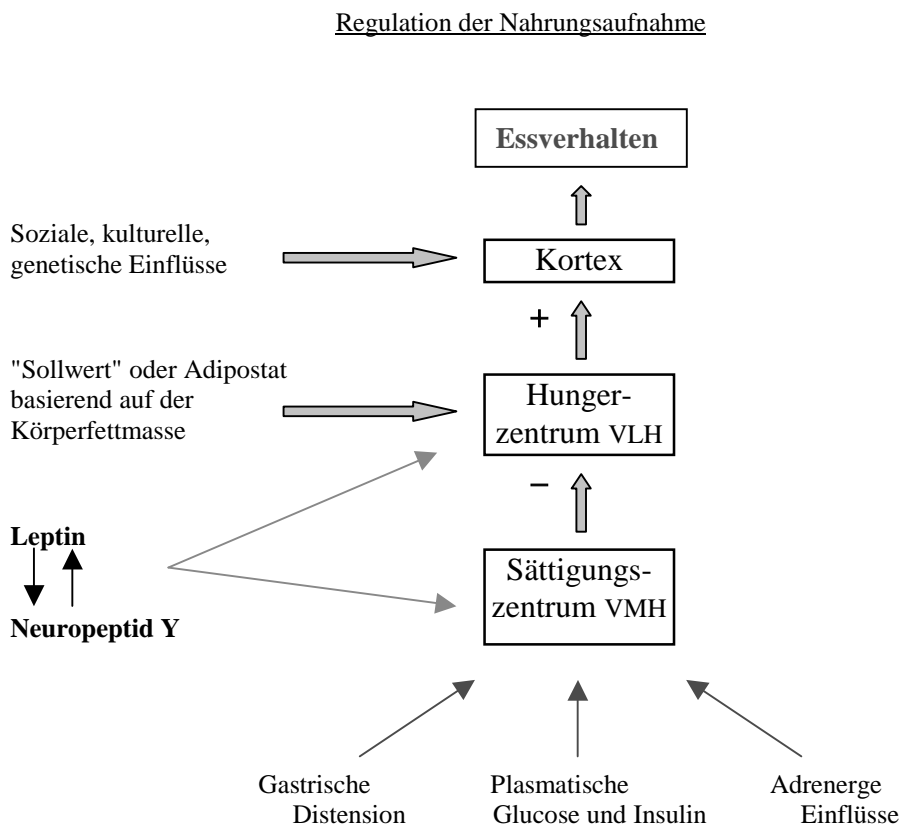
Stimuli resultiert. Die Verbindung von den Appetit-regulierenden Zentren im Hypothalamus zu den Fettspeichern des Organismus wird durch das Hormon **Leptin** hergestellt. Leptin ist das Produkt des *ob*-Gens, das beim Menschen auf dem Chromosom 7 (7q31) lokalisiert ist, es handelt sich um ein aus 167 Aminosäuren bestehendes Proteohormon, das im Fettgewebe gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben wird [74]. Nehmen die Adipozyten an Größe zu, so produzieren sie in der Regel auch mehr Leptin, so dass sich mit zunehmender Menge an Körperfett der Leptin-Spiegel im Blut erhöht. Leptin überwindet durch aktiven Transport die Blut-Hirn-Schranke, trifft auf insbesondere im Hypothalamus vorkommende Leptin-Rezeptoren und informiert so das Gehirn über die Größe der Fettspeicher [2]. Ein hoher Leptin-Spiegel signalisiert somit, die Nahrungsaufnahme zu verringern und den Energieverbrauch zu steigern, d.h. Fett zu verbrennen und Sättigkeit zu melden, bei einem niedrigen Leptin-Spiegel verhält sich dies umgekehrt, es wird Hunger signalisiert [46]. Zudem bedingt Leptin bei Nagetieren einen Abfall der Neuropeptid Y-Synthese, umgekehrt führt ein Abfall des Leptin-Spiegels zu einem Anstieg der NPY-Synthese [24,46,55,69]. Bei NPY handelt es sich um ein in großer Menge im Gehirn vorkommendes Neuropeptid, das besonders stark die Nahrungsaufnahme stimuliert [22].

Wirkung einer Ab- bzw. Zunahme an Körperfett auf den Leptin- und Neuropeptid Y-Spiegel



**Abbildung 2**

Es wird vermutet, dass ein fixierter "Sollwert" oder Adipostat für die Körperfettmasse existiert, so dass sich auch diesbezüglich die gesamte Fettgewebsmenge auf die Regulationsvorgänge in den hypothalamischen Zentren auswirkt [37]. Wie genau die Festlegung dieses Adipostaten erfolgt ist unbekannt, doch werden ausser dem Einfluss von Leptin noch Insulin, die Freisetzung von Glycerol aus Fettzellen, aufsteigende neurale Impulse und/oder zirkulierende, aus Adipozyten stammende Peptide wie Adipsin als weitere mögliche, die Größe der Körperfettpeicher anzeigende Mediatoren diskutiert, so dass der Körper durch diese Informationen dann adaptive Regulationsmechanismen einleiten kann.



**Abbildung 3**

nach: *Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, Fauci, Kasper, Harrisons Innere Medizin, Blackwell-Wissenschaftsverlag, 1995.*

Auch der Energieverbrauch ist keine konstante Größe und wird daher ebenfalls vom Organismus reguliert, die mit der Nahrung aufgenommene Energie findet in unterschiedlichsten Arbeitsleistungen Verwendung. So wird sie zur Aufrechterhaltung der zellulären Grundfunktionen, zur körperlichen Arbeit, zur

Synthese von Körpersubstanzen und zur Wärmeproduktion genutzt [18]. Der Körper ist in der Lage, eine energetisch überwertige Kost statt durch eine entsprechende Gewichtszunahme, mit erhöhter Wärmeproduktion auszugleichen [18]. Diesen Mechanismus, bei dem der Wirkungsgrad der oxidativen Phosphorylierung sowie Veränderungen des Schilddrüsenhormon-Metabolismus eine wesentliche Rolle spielen, nennt man "Luxuskonsumtion". Genau ist dieser Mechanismus der **adaptiven Thermogenese** noch nicht geklärt.

Komponenten des Energieverbrauchs beim Menschen (nach Ravussin, 1992)

<b>Komponenten</b>	<b>Einflussfaktoren</b>
körperliche Bewegung (20-40%)	Gewicht Dauer Intensität
nahrungsabhängige Thermogenese (ca. 10%)	Nahrungsmenge und Nahrungszusammensetzung
Grundumsatz (50-70%)	fettfreie Körpermasse (Muskulatur) Alter Geschlecht Genetik Hormone Sympathikusaktivität

**Tabelle 2**

aus *Hauner*, Thiemes Innere Medizin: TIM, Georg Thieme Verlag, 1999.

So komplex die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs im Organismus erfolgt, so viele Möglichkeiten bestehen, an denen schon durch kleine Abweichungen Regelkreise gestört und dadurch eine physiologische Nahrungsaufnahme und ein ausgeglichener Energieverbrauch unmöglich gemacht werden.

### 1.3 Genetische Faktoren und Umwelteinflüsse als Adipositasursache

Verschiedene Gene können Mutationen aufweisen, aufgrund derer allein bereits eine schwere Adipositas verursacht wird, doch sind diese Mutationen selten und treffen nur für einen sehr geringen Anteil der unter Fettsucht leidenden Patienten zu, wobei bislang für über 50 Gene in Studien die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme, des Energieverbrauchs und des Alters zu Beginn des Auftretens der Adipositas gezeigt werden konnte [6]. Diese Mutationen können sich in der Weise auswirken, dass sie eine Dysregulation der hypothalamischen Zentren verursachen und dadurch das Übergewicht auslösen. In Fällen, in denen Gen-Defekte Ursache von Adipositas sind, handelt es sich zumeist um Mutationen, die sich negativ auf die Generierung anorexigener Signale auswirken. Das trifft nicht nur auf die verschiedenen Tiermodelle wie die Leptin-defiziente Fettmaus (*s. folgendes Kapitel*) zu, sondern hat auch für die wenigen bekannten Fälle mit genetisch bedingter Adipositas beim Menschen Gültigkeit. Auch beim Mechanismus der **adaptiven Thermogenese** können die Adaptationsvorgänge aufgrund von genetischen Faktoren gestört sein, indem Genmutationen vermutlich in der Weise auf Enzyme wirken, dass eine verminderte Thermogenese mit verbessertem Wirkungsgrad des Energieumsatzes erfolgt. Eine gesteigerte Nahrungszufuhr oder selbst eine energetisch normale Kost führt in diesem Fall nicht zu einer Erhöhung der Wärmeproduktion, sondern zu einer Zunahme der Fettgewebssmasse.

Abgesehen von diesen seltenen Mutationen ist die Adipositas eine Erkrankung multifaktorieller Genese, resultierend aus der Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen [12,23]. Die Adipositas tritt familiär gehäuft auf, Studien mit Zwillingen und Adoptivkindern in fettsüchtigen Familien ergaben, dass neben familiären Eßgewohnheiten zweifelsohne genetische Faktoren an der Entstehung der Adipositas beteiligt sein müssen. So ergab sich bei Beobachtungen an Zwillingen die höchste Vererbbarkeit der Fettsucht mit einem Prozentrang von 50-80 %, in Kernfamilien von 30-50 % und bei Familien mit Adoptivkindern von 10-30 % [10]. Hierbei war es eine der überzeugendsten Beobachtungen, dass das Gewicht von Adoptivkindern



wesentlich stärker mit dem Gewicht ihrer biologischen Eltern als mit dem ihrer Adoptiveltern korrelierte, trotz des gemeinsamen häuslichen Umfelds mit letzteren [65]. Wenn man die Ergebnisse von Studien mit Zwillingen, Kernfamilien und Adoptivkindern zusammen betrachtet, spielen Alters- und Geschlechtsunterschiede bei der Vererbbarkeit der Adipositas eine eher untergeordnete Rolle [10].

Massiv adipösen Personen ist häufig gemeinsam, dass sie eine vermehrte Anzahl (Hyperplasie der Adipozyten) sowie eine erhöhte Größe (Hypertrophie der Adipozyten) der Fettzellen aufweisen, die verstärkt Leptin bilden. Der erhöhte Leptin-Spiegel sollte dem Hypothalamus eigentlich signalisieren, dass keine weitere Nahrungsaufnahme erforderlich wäre und Fett verbrannt werden könnte, doch liegt bei Adipösen eine gewisse Leptin-Resistenz vor, so dass selbst der erhöhte Leptin-Spiegel keine adäquate regulierende Wirkung auslöst [56]. Zudem könnte der hypothalamische "Sollwert" oder "Adipostat" ("*body set point*") bei Adipösen für den Fall, dass er nach oben verschoben wäre, die häufig auftretenden Rezidive nach erfolgreicher Gewichtsreduktion erklären.

Bei vielen adipösen Patienten lässt sich eine Dominanz der externen Faktoren feststellen; so zeigt sich, dass adipöse Patienten auf Signale aus der Umwelt wie Tageszeit, soziale Gegebenheiten, Geruch oder Geschmack von Nahrung in einem höheren Maße ansprechen als normalgewichtige Personen [30]. Störungen der im Normalfall erstaunlich präzisen Regulation der Nahrungsaufnahme durch unvernünftige Gewohnheiten, die diese Regulation überspielen, oder durch psychische Faktoren können zur Fettsucht führen.

Der Mangel an körperlicher Bewegung zählt ebenfalls zu den Ursachen der Fettsucht und wird durch die fortschreitende Technisierung des Berufs- und Alltagslebens verstärkt, was für die steigende Prävalenz der Adipositas in den westlichen Industriestaaten mitverantwortlich sein dürfte.

Außer diesen Faktoren kann die Fettsucht auch hormonell bedingt sein, so beispielsweise bei Morbus Cushing, Hypothyreose oder Hypophysärer Fettsucht.

## 1.4 Einfluss von Mutationen auf die Adipositasentstehung

Da genetische Faktoren zweifellos an der Entstehung der Fettsucht beteiligt sind, sucht man nach spezifischen Genen und prädisponierenden Mutationen, die darin involviert sein können. So ist ein Kandidaten-Gen ein Gen, das aufgrund seiner möglichen Beteiligung an der Physiopathologie eine Rolle bei der Determinierung des Phänotyps spielen kann [10], es wird bezüglich der Fettsucht bevorzugt untersucht wegen seiner Position in einer bestimmten Chromosomenregion, die aufgrund von Forschungsergebnissen Zusammenhänge mit der Adipositas erwarten lässt. Es wurden hierdurch neue Gene und Moleküle identifiziert, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme (z.B. Leptin, Neuropeptid Y), am Energieverbrauch (z.B. uncoupling protein-2, Leptin) und am Adipozyten-Stoffwechsel (z.B. PPAR $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) beteiligt sind [5,10].

Anhand von Versuchen mit Mäusen konnten beachtliche Fortschritte erzielt werden, die neue Einsichten in die Ätiologie der Fettsucht schafften, so konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die eine Adipositas auslösen oder zu ihrer Entstehung beitragen können [72]. Gut untersucht sind fünf Maus-Modelle für die menschliche Adipositas:

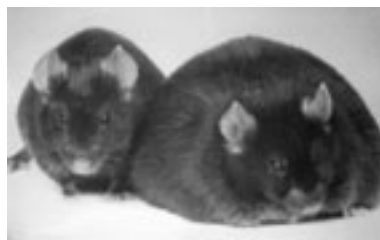
*obese, diabetes, yellow, tubby* und *fat*.

Die mutierten Gene konnten für alle fünf Modelle isoliert werden und bieten einige der überzeugendsten und definiertesten Beweise dafür, dass das Körpergewicht direkt durch spezifische Stoffwechselwege reguliert wird [46].

Das Produkt des *obese*-Gens ist das Hormon **Leptin**, das vor allem von weißem Fettgewebe gebildet wird. Bei Mäusen, die homozygot (*ob/ob*) die *obese*-Mutation tragen, kann durch die Bildung defekter Leptins kein Leptin-Spiegel aufgebaut werden [74], die Mäuse verhalten sich so, als wären sie ständig vom Hungertod bedroht. So kommt es durch Hyperphagie zu starkem Übergewicht und Diabetes [13], ebenso kennzeichnen verringerter Energieverbrauch, mangelnde Reproduktion und verkümmertes Wachstum diese Mutation [64].

Verschiedene Forschungsgruppen konnten zeigen, dass der zu fehlerhaftem oder vorzeitig abgespaltenem Leptin führende genetische Defekt, durch hohe Dosen synthetischen Leptins direkt wieder ausgeglichen werden konnte [9,26,51]. Es kam zur Gewichtsabnahme, geringerer Nahrungsaufnahme, verstärkter körperlicher Aktivität und erhöhter adaptiver Thermogenese [46]. Auch die Möglichkeit des Einsatzes von synthetischem Leptin zur Adipositasbehandlung ist von Interesse [46].

Gesunde Maus (links) und gleichaltrige Maus mit defektem *ob*-Gen (rechts)



**Abbildung 4**

Foto von *RL Leibel*, New York

Der erste Beweis beim Menschen für die Rolle von Leptin als wichtigen Signalstoff im Rahmen des Energiehaushalts konnte anhand eines Geschwisterpaars demonstriert werden, das eine früh aufgetretene Adipositas sowie einen Phänotyp aufwies, der dem der *ob/ob*-Mäusen ähnelt [42]. Die Genanalyse ergab eine homozygote Deletion an Position 133 des Gens für Leptin [42].

Mäuse mit dem *diabetes*-Gen weisen durch die Mutation einen Phänotyp auf, der dem der *obese*-Mutation sehr ähnlich ist [46]. Das Produkt des *diabetes*-Gens ist der **Leptinrezeptor**, der aufgrund der Mutation die Signalwirkung von Leptin nicht weitervermitteln kann [3,11], doch sind auch hier noch keine Beweise erbracht worden, die für einen Zusammenhang mit erhöhtem BMI sprechen [47].

Dominante Allele (*yellow*) am *agouti*-Genort führen bei Mäusen zu Fettsucht ab dem Erwachsenenalter, zu Fehlern in der Pigmentierung, Insulinresistenz

und verstärktem Auftreten von Tumoren [71]. Im Gegensatz zu den *obese*-Mäusen treten weder Hyperphagie noch verkümmertes Wachstum auf [46]. Das *agouti*-Protein wirkt antagonistisch zu dem Effekt des Melanocytenstimulierenden Hormons (MSH) auf zwei Typen seiner Rezeptoren, die Melanocortin-1(MC-1)- und Melanocortin-4(MC-4)-Rezeptoren [41]. Eine durch die Mutation hervorgerufene chronische Gegenwirkung auf die im Hypothalamus exprimierten MC-4-Rezeptoren führt bei Mäusen zu Adipositas [43], das dem *agouti*-Gen entsprechende menschliche Gen wird interessanterweise im Fettgewebe exprimiert [36].

Maus mit defektem *agouti*-Gen



**Abbildung 5**

Foto von Frau Prof. Dr. Dr. L. Herberg, Düsseldorf

Fettsucht im fortgeschrittenen Erwachsenenalter, Hyperinsulinismus und Unfruchtbarkeit sind die Charakteristika des Phänotyps mit der *fat*-Mutation auf dem Gen für die Carboxypeptidase E (CPE) [14,45]. Der Zusammenhang mit der Adipositasentstehung beruht in diesem Fall vermutlich auf fehlerhafter Prozessierung hypothalamischer Neuropeptide [16].

**Tubby**-Mäuse sind durch Adipositas ab dem Erwachsenenalter, Blindheit und Taubheit gekennzeichnet [14]. Das *tubby*-Protein tritt vornehmlich in Retina und Hypothalamus auf [14].

Bei allen oben kurz beschriebenen Mutationen besteht ein Zusammenhang mit dem hypothalamischen Hunger- und Sättigungszentrum, was die Vermutung bestätigt, dass durch Dysfunktion der Signalvermittlung in den Hypothalamus

eine Fettsucht ausgelöst werden kann. Diese monogenischen Mutationen können zwar bei Mäusen eine Adipositas verursachen, doch beim Menschen treten diese Mutationen extrem selten auf.

Bei dem Großteil der Adipositasfälle ist die Fettsucht allerdings durch das Zusammenkommen mehrerer Faktoren genetischer und umweltbedingter Art zustande gekommen, aufgrund dessen der Forschung nach polygenen Ursachen Priorität eingeräumt wird [23].

## **1.5 Zusammenhänge zwischen Diabetes und Adipositas**

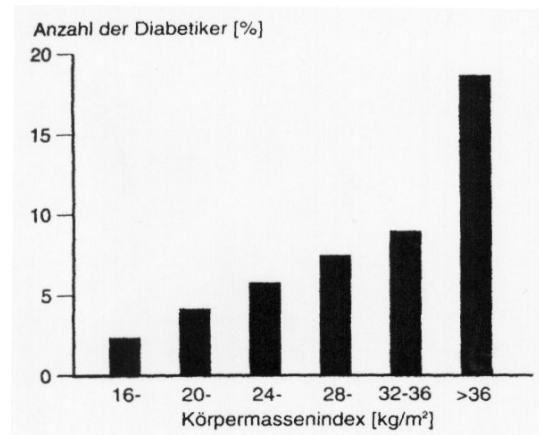
Bei der Entstehung des Diabetes mellitus sind genetische Faktoren von Bedeutung, wobei kein monogener, sondern ein multifaktorieller Vererbungsmodus vorliegt. Hierbei treten mehrere Veränderungen der genetischen Information auf, die nicht einzeln, sondern erst in Kombination (additive Polygenie) und in Verbindung mit exogenen Einflüssen zur Manifestation der Erkrankung führen.

Als wichtigster und häufigster Manifestationsfaktor gilt die Adipositas, die der Entstehung des Typ II-Diabetes vorausgeht und auch nach Manifestation des Diabetes bestehen bleibt [35]. Die Relevanz der Fettsucht als Manifestationsfaktor tritt deutlich hervor, wenn man bedenkt, dass es sich bei etwa 80 % aller Diabetes-Fälle um den Diabetes vom Typ II handelt, wiederum 80 % der Patienten mit einem Typ II Diabetes mellitus sind adipös oder zumindest übergewichtig [28].

Die Korrelation zwischen Diabetes und BMI wird in folgender Grafik dargestellt:

## Übergewicht und Diabetes mellitus vom Typ II:

Erhebung bei 11624 Männern und Frauen im Alter von 20-29 Jahren in Bayern



**Abbildung 6**

aus: *Classen/Diehl/Kochsiek*, Innere Medizin, Urban & Schwarzenberg, 1994

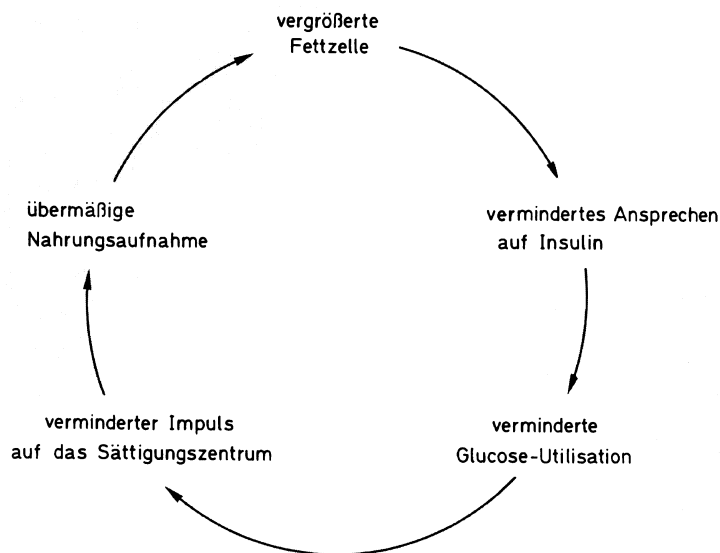
Im Gegensatz zu dem Typ I-Diabetes, bei dem ein absoluter Insulinmangel im Mittelpunkt der Pathogenese steht, besteht beim Typ II-Diabetiker ein relativer Insulinmangel.

Bei relativem Insulinmangel ist die Wirkung des Insulins herabgesetzt, es sind höhere Insulin-Konzentrationen erforderlich, um einen bestimmten Insulin-Effekt zu erreichen. Ursache dieser Resistenz gegen das endogen produzierte Insulin können abnorme Sekretionsprodukte der Beta-Zellen des Pankreas sein, zirkulierende Insulin-Antagonisten oder aber, die häufigste Ursache, ein Rezeptordefekt am Erfolgsorgan. Die Insulinresistenz bei Typ II-Diabetes ist durch eine Verminderung der Rezeptoren an der Zelloberfläche der Erfolgsorgane bedingt, doch auch eine zusätzliche Beteiligung eines Postrezeptordefektes könnte von Bedeutung sein.

Der Diabetes vom Typ II beginnt meist schleichend jenseits des 40. Lebensjahrs, infolge einer vorausgegangenen Fettsucht, da hohe Konzentrationen freier Fettsäuren die Insulinbindung an Hepatozyten hemmen können, was zu einer geringen hepatischen Extraktion von Insulin führt, wodurch zunächst eine geringe systemische Hyperinsulinämie entsteht. Außerdem liegt vor allem bei den vergrößerten Fettzellen (Hypertrophie der Adipozyten) des Adipösen eine Verminderung der Insulinrezeptoren vor, wodurch die Insulinempfindlichkeit herabgesetzt und eine verringerte Glucose-Verwertung bewirkt wird. Der

herabgesetzte Glucose-Verbrauch wirkt sich wiederum auf das hypothalamische Sättigungszentrum aus, es resultiert ein Circulus vitiosus (s. Abb. 7).

Circulus vitiosus der Hyperphagie



**Abbildung 7**

aus: *Karlsn, Gerok, Groß*, Pathobiochemie, Georg Thieme Verlag, 1982

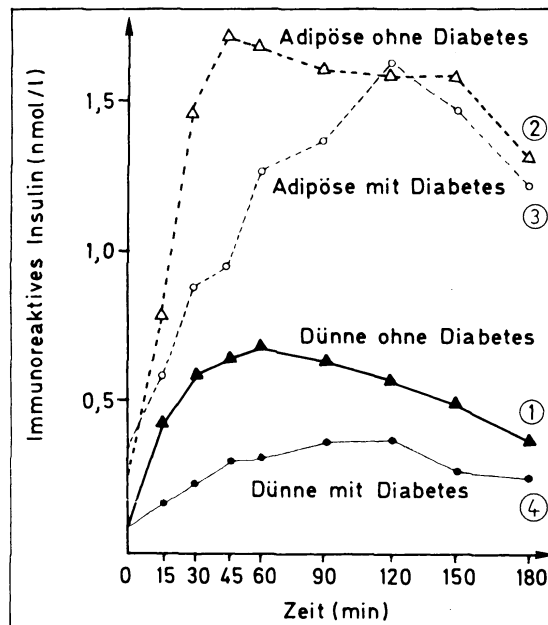
Aufgrund der verminderten Glucose-Utilisation resultiert trotz systemischer Hyperinsulinämie keine Hypoglykämie, so werden erst bei stark erhöhtem Insulin-Spiegel die normalen Insulin-Effekte auf den Glucose-Umsatz und eine normale Glucose-Toleranz erreicht.

Im Vergleich zu adipösen Nicht-Diabetikern ist bei Übergewichtigen mit Diabetes die Insulin-Sekretion verringert, doch im Gegensatz zum Gesunden noch normal oder sogar erhöht (s. Abb. 8, Kurve 3). Hierbei handelt es sich um einen relativen Insulinmangel, da zwar eine Normo- beziehungsweise eine Hyperinsulinämie besteht, aber dennoch, aufgrund der bestehenden Insulin-Resistenz, eine normale Glucose-Toleranz nicht gewährleistet ist.

### Plasmainsulinspiegel nach Belastung

mit 100g Glucose oral bei

- 1 normalgewichtigen Personen ohne Diabetes
- 2 adipösen Personen ohne Diabetes
- 3 adipösen Personen mit Diabetes
- 4 normalgewichtigen Personen mit Diabetes oder Adipösen mit "Erschöpfung" der B-Zellen



**Abbildung 8**

aus: *Karlson, Gerok, Groß*, Pathobiochemie, Georg Thieme Verlag, 1982

Die Insulin-Resistenz des Übergewichtigen bewirkt im weiteren Verlauf eine permanente Überstimulation der Beta-Zellen des Pankreas, was zu einer "Erschöpfung" der insulinproduzierenden Zellen führen kann, jedoch ist dieser Zustand der Insulin-Resistenz und der dadurch bedingten Überstimulation der Beta-Zellen durch Gewichtsreduktion vollkommen rückbildungsfähig. Daher ist die wichtigste therapeutische und prophylaktische Maßnahme beim adipösen Diabetiker eine frühzeitige Gewichtsreduktion [28]. Der allmähliche Rückgang der Insulin-Sekretion kann allerdings noch über lange Zeit medikamentös durch Sulfonylharnstoffe stimuliert werden, eine Maßnahme, die bei den adipösen Diabetikern angezeigt ist, deren Einstellung durch Gewichtsreduktion allein nicht gelingt, die aber noch über eine ausreichende Insulin-Produktion im Pankreas verfügen.



Letztendlich kann durch völlige Erschöpfung der Beta-Zellen sekundär ein absoluter Insulinmangel auftreten, wie er beim Typ I-Diabetiker bereits primär besteht (s. *Abb. 8, Kurve 4*). Hier ist dann eine Insulin-Behandlung als Substitutionstherapie indiziert.

Beim Typ I-Diabetiker kommt es aufgrund der fehlenden antilipolytischen Wirkung des Insulins zu einem sehr ausgeprägten Schwund des Fettgewebes, der Fettabbau mit Abgabe von Fettsäuren an das Blut ist gegenüber der Norm verstärkt. Das Übergewicht der adipösen Diabetiker bleibt hingegen auch nach der Diabetesmanifestation selbst im Stadium des absoluten Insulinmangels bestehen. Es wird vermutet, dass nicht alle Insulineffekte gleichmäßig von der Insulinresistenz betroffen sind und dass insbesondere die antilipolytische Wirkung am Fettgewebe länger erhalten bleibt als die Insulinwirkung auf die Glucose-Utilisation.

Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus weist zahlreiche Symptome auf. Als akutes diabetisches Syndrom werden diejenigen Symptome zusammengefasst, die sich von den Veränderungen des Kohlenhydrat-, Fett- und Protein-Stoffwechsels als Folge eines absoluten oder relativen Insulinmangels direkt ableiten lassen. Hierzu zählen Glucosurie, Polyurie, Polydipsie und Refraktionsanomalien mit Sehstörungen, außerdem eine verminderte muskuläre Leistungsfähigkeit und Adynamie. Vornehmlich beim Typ II-Diabetiker kann als schwere Form des akuten diabetischen Syndroms das hyperosmolare Koma auftreten, bei dem die durch eine ausgeprägte Hyperglykämie bedingte Hyperosmolarität des Blutes eine intrazelluläre Dehydratation und einen verstärkten renalen Flüssigkeitsverlust durch osmotische Diurese verursacht [1]. Die zerebrale Dehydratation und Minderdurchblutung kann dann zu Funktionsstörungen des ZNS bis hin zum Koma führen.

Als chronisches diabetisches Syndrom werden Begleiterkrankungen des Diabetes zusammengefasst, deren Entstehung oder Entwicklung durch den Diabetes mellitus begünstigt wird. Hierzu gehören Hautveränderungen wie Pruritus, Ekzemneigung, Xanthomatosen, Veränderungen an den Schleimhäuten wie beispielsweise eine Gingivitis oder aber Iritis und Xanthelasma am Auge, außerdem kann es durch die erhöhte Infektionsbereitschaft zu Pyelonephritis sowie zu bakteriellen Infektionen und Mykosen der Haut kommen. Die

wichtigsten Erscheinungsformen des chronischen diabetischen Syndroms beruhen auf einer Makro- und Mikroangiopathie [17,66]. Zum einen kommt es durch diese Störung der Makro- und der Mikrozirkulation zu peripheren Durchblutungsstörungen und zum anderen zu Folgeerkrankungen am kardiovaskulären System, hier sind Koronarinsuffizienz, Hypertonie und ein erhöhtes Infarktrisiko erwähnenswert [17,66]. Des Weiteren bedingen die Durchblutungsstörungen die diabetische Retinopathie am Auge und an der Niere die diabetische Nephrosklerose [1]. Auch Funktionsstörungen des Nervensystems haben beim Diabetiker eine wesentliche ursächliche Beteiligung einer Mikroangiopathie, so dass man hier von einer diabetischen Neuropathie spricht.

Wie oben aufgeführt, bringt allein der Diabetes mellitus als Folgeerkrankung der Fettsucht zahlreiche schwerwiegende Symptome mit sich, durch die ständig zunehmende Inzidenz der Adipositas besteht hier sicherlich Handlungsbedarf. Vor allem in Anbetracht der Tatsachen, dass Adipositas allein ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit ist, dass sie deren Entwicklung aber auch durch eine Reihe von sekundären Faktoren, insbesondere dem Diabetes mellitus, begünstigt, wird die Notwendigkeit der weiteren Forschung nach entscheidenden ursächlichen Faktoren unterstrichen.

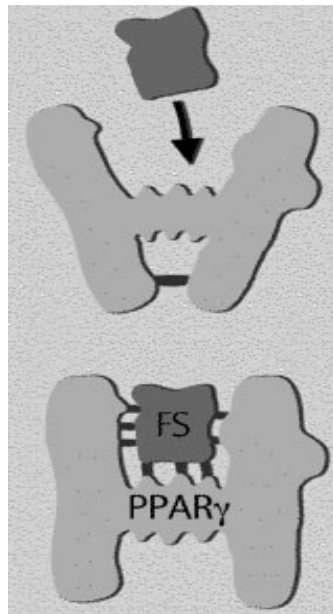
## 1.6 Lipid-induzierte Genexpression

Die Regulation der verschiedenen StoffwechsellLeistungen des Körpers erfolgt in großem Maße durch Hormonwirkung. Bei der hormonellen Signaltransduktion unterscheidet man zwei Primärreaktionen. Zum einen kennt man **hydrophile** Signalstoffe, die mit zellmembranständigen Rezeptoren wie ligandengesteuerte Enzyme, Ionenkanäle und G-Protein-Aktivatoren interagieren, um so über die Bildung von *second messenger* im Zellinneren ihre Wirkung zu entfalten. Zum anderen können **lipophile** Signalstoffe über nukleäre Rezeptoren eine Hormonwirkung durch Genaktivierung vermitteln.

Bei diesen **nukleären Rezeptoren lipophiler Hormone** handelt es sich um **Transkriptionsfaktoren**, die einer Protein-Superfamilie angehören, zu deren Mitgliedern noch weitere signalunabhängige Transkriptionsfaktoren zählen. Der lipophile Signalstoff wird, nachdem er in die Zelle eingedrungen ist, entweder bereits im Cytoplasma oder aber im Zellkern spezifisch von einem Rezeptor gebunden, was eine Konformationsänderung an diesem hervorruft. Der aktivierte nukleäre Hormonrezeptor ist nun in der Lage, ein Homo- oder auch ein Heterodimer mit anderen Transkriptionsfaktoren zu bilden, wodurch die Rezeptor-Dimere an sogenannte *Hormone-Response-Elements (HREs)* der DNA binden können, bei denen es sich um hochgradig konservierte, kurze Sequenzen aus etwa 15 Nucleotiden handelt. Die *HREs* stellen *Enhancer* dar, durch die über Stimulation der Promotoren die Transkriptionsaktivität gesteuert wird, was sich sowohl in einer Stimulation als auch in einer Hemmung äußern kann.

Schematische Darstellung der Liganden-Bindung am Beispiel von *PPAR $\gamma$*

Die Struktur des Moleküls wechselt durch Binden eines geeigneten Liganden (hier FS=Fettsäure) von einer inaktiven zu einer aktivierten Konformation. Die Kraft der zahlreichen Einzelbindungen zwischen Ligand und Rezeptor zwingt den Komplex, eine bestimmte räumliche Ausrichtung anzunehmen, in der er mit weiteren Molekülen (z.B. DNA) interagieren kann.

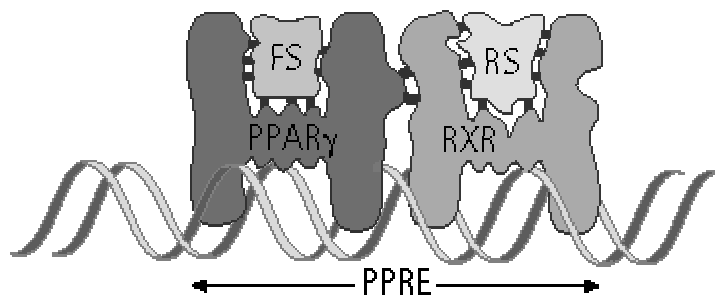


**Abbildung 9**

Zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren gehören die *peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)* [8], die wie oben beschrieben durch die Konformationsänderung nach Bindung eines lipophilen Signalstoffes aktiviert werden (*s Abb. 9*). Im aktivierten Zustand ist nun die Bildung von Heterodimeren mit Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) möglich und dadurch die Bindung des Dimers an spezifische *HREs*, den *peroxisome proliferator response elements (PPREs)*.

#### Bindung eines *PPAR $\gamma$ /RXR*- Heterodimers an DNA

Das Heterodimer, bestehend aus einem aktivierten *PPAR $\gamma$*  und einem aktivierten Retinoid-X-Rezeptor-Molekül, bindet an ein *PPRE* der DNA. Die Bindung kommt über sogenannte Zinkfinger an den Rezeptor-Molekülen zustande, die sich in Rillen der DNA-Helix einfügen können.



**Abbildung 10**

Die *PPREs* bestehen aus einer direkten Wiederholung (*direct repeat, DR*) des Erkennungsbereiches für den Rezeptor auf der DNA (PuGGTCA) getrennt durch ein Nucleotid (*DR-1*) [60].

Doch zählen die *PPARs* zu einer Untergruppe, die auch in Abwesenheit eines Liganden an die DNA binden kann [60], indem durch mehrere Zinkfinger-Motive, die als Tandem an der DNA-bindenden Domäne des Hormonrezeptors auftreten, eine spezifische Bindung an die DNA ermöglicht wird [21,25].

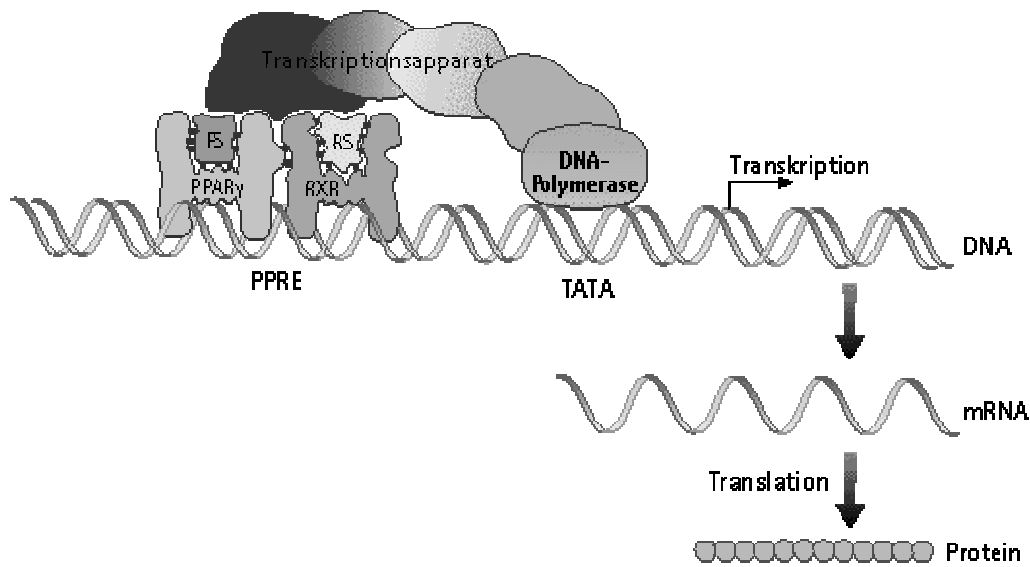
Über die Bindung des Heterodimers an die *PPREs* kann nun durch Stimulation von Promotoren die Transkription von Struktur-Genen inhibierend oder verstärkend geändert werden [34].

### PPAR $\gamma$ /RXR- Heterodimere als Bestandteile des Transkriptionsapparates

Die an *PPREs* gebundenen, aktivierten Rezeptor-Heterodimere interagieren mit einem Komplex verschiedener Proteine, der als Transkriptionsapparat fungiert und die Rate, mit der mRNA-Kopien des entsprechenden Gens hergestellt werden, maßgeblich beeinflusst.

FS=Fettsäure

RS=Retinsäure



**Abbildung 11**

Es sind drei verschiedene *PPAR*-Typen bekannt, *PPAR $\alpha$* ,  *$\beta$*  und  *$\gamma$* , die sich außer in ihrer Primärstruktur auch noch in der Häufigkeit ihres Vorkommens sowie in ihrer Gewebespezifität unterscheiden [60]. So tritt *PPAR $\alpha$*  vor allem in Leber, Herz, Niere, braunem Fettgewebe und in Geweben mit hohem Fettsäure-Katabolismus oder hohem peroxisomalen Metabolismus auf [4,7,31]. *PPAR $\beta$*  (identisch mit *PPAR $\delta$* ) ist gleichfalls ubiquitär reichlich vertreten, wohingegen *PPAR $\gamma$*  eine größere Gewebespezifität aufweist und vornehmlich in weißem Fettgewebe auftritt (*s.u.*) [7].

Bei den Peroxisomen handelt es sich um Organellen, in denen unter anderem Reaktionen stattfinden, an denen Wasserstoffperoxid beteiligt ist. Sie besitzen keine eigene DNA, so dass die peroxisomalen Proteine im Kern codiert und im Cytoplasma an freien Polysomen synthetisiert werden. In Peroxisomen findet eine  $\beta$ -Oxidation statt, die auf die Oxidation bestimmter Verbindungen, vor allem sehr langkettige Fettsäuren ( $C_{24}$ ,  $C_{26}$ ), spezialisiert ist und die im Gegensatz zur mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation nicht primär der Energieerzeugung

dient. Im Tiermodell mit Nagetieren stellt die Proliferation von Peroxisomen eine zelluläre Antwort auf verschiedene chemische Faktoren, unter anderen Fibrate, Derivate von Eicosanoiden und verschiedene Fettsäuren, dar [40,48], sie ist aber auch eine Reaktion auf bestimmte pathophysiologische Vorgänge, die sowohl die zelluläre Morphologie als auch die Enzymaktivität stark beeinflussen [60]. Über die Aktivierung durch *peroxisome proliferators*, wie Fibrate, Fettsäuren und Medikamente, die den Lipidstoffwechsel beeinflussen, kontrollieren *PPARs* die Expression von Genen, die in den intra- und extrazellulären Fettmetabolismus involviert sind, vor allem jene, die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt sind [60]. So vermitteln *PPARs* teilweise die induktiven Effekte von Fibraten und Fettsäuren auf den HDL-Cholesterin-Spiegel, indem sie die Transkription der wichtigsten HDL-Apolipoproteine, Apo-A-I und Apo-A-II, regulieren, außerdem sind sie an der Induktion der Synthese der Lipoproteinlipase, der Acyl-CoA-Oxidase, der HMG-CoA-Synthetase und der Acyl-CoA-Synthetase sowie weiterer Enzyme des Fettstoffwechsels beteiligt [54,59,60,61]. Auch die verstärkte Bildung von Proteinen, die dem Fettsäuretransport dienen, wie *aP2 (adipocyte fatty acid binding protein P2)* und *L-FABP (liver fatty acid binding protein)* ist ein Effekt der *PPAR*-Aktivität [32,60], zudem besteht die Vermutung, dass *PPARs* entscheidende Botenstoffe bei der Umsetzung von pharmakologischen und ernährungsbedingten Stimuli in Veränderungen der Gen-Expression und bei Differenzierungsvorgängen sind [60].

Insgesamt führt die über *PPARs* vermittelte Regulation verschiedener, in den Lipidstoffwechsel involvierter Gene zu [60]

- verstärkter Hydrolyse von Triglyzeriden
- Stimulation der zellulären Aufnahme von Fettsäuren und deren Umwandlung in Acyl-CoA-Derivate
- Stimulation der  $\beta$ -Oxidation
- Verminderung der Fettsäuren- und Triglyzerid-Synthese sowie der VLDL-Produktion

Diese Auswirkungen der *PPAR*-Aktivität erklären die lipidsenkenden Effekte von Fibraten und Fettsäuren, da diese als *peroxisome proliferators* die *PPARs* aktivieren.

## 1.7 Funktion und Bedeutung von *PPAR* $\gamma$

In höheren Eukaryonten ist das weiße Fettgewebe der wichtigste Speicher für überschüssige Energie, was durch die Expression von Genen ermöglicht wird, die für Enzyme codieren, die Triglyzeride synthetisieren und hydrolysieren. Des weiteren beeinflussen Adipozyten eine Vielzahl von Prozessen, die mit der Regulation der Energie-Aufnahme und -Abgabe zusammenhängen, indem sie bestimmte Proteine exprimieren und sezernieren, wie beispielsweise  $\text{TNF}\alpha$ , Leptin und Adipsin, doch auch andere, noch unerforschte Signalproteine sind möglich [15,29]. Dies bietet einen wichtigen Ansatzpunkt in der Erforschung von möglichen Ursachen für die Entwicklung einer Adipositas, wobei dasselbe für die genauen Abläufe in der Adipozyten-Differenzierung gilt, da bei massiv adipösen Menschen zum einen die Größe der Fettzellen erhöht ist (Hypertrophie der Adipozyten) und zum anderen eine vermehrte Anzahl der Fettzellen besteht (Hyperplasie der Adipozyten).

Bei der Untersuchung von Transkriptionsfaktor-bindenden Regionen auf für Adipozyten spezifischen Genen wurden drei Proteinfamilien identifiziert, die eine wichtige Rolle bei der Induktion der Adipozyten-Differenzierung spielen. Es handelt sich hierbei um die *PPARs*, um die Familie der CAAT/Enhancer-bindenden Proteine (*C/EBP*)  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  und um den *helix-loop-helix adipocyte differentiation and determination factor-1 (ADD-1)* [57].

Ein Mitglied der *PPAR*-Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren ist *PPAR* $\gamma$ , wobei zwei Isoformen dieses Transkriptionsfaktors bekannt sind, *PPAR* $\gamma$ 1 und *PPAR* $\gamma$ 2, die sich nur in den letzten 30 Aminosäuren ihres N-terminalen Endes unterscheiden [67,68,75]. Diese beiden Isoformen sind dadurch entstanden, dass das *PPAR* $\gamma$ -Gen zwei Promotoren enthält, welche die

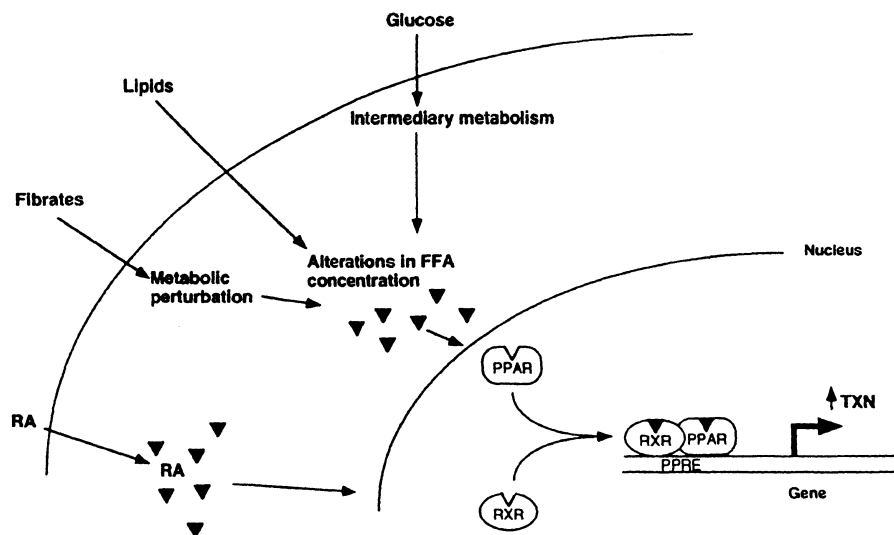
Entstehung zweier alternativ gesplicerter Produkte bewirken [44]. *PPAR $\gamma$*  ist in geringem Maße in verschiedenen Geweben vorhanden, *PPAR $\gamma$ 2* kommt reichlich und spezifisch in weißem Fettgewebe vor und in geringerer Quantität auch in Präadipozyten, wobei sich hier die Menge während der Adipozyten-Differenzierung erhöht. Wie bereits erwähnt bilden *PPARs*, und so auch *PPAR $\gamma$* , ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor $\alpha$  (*RXR $\alpha$* ), aus dem sich der *adipocyte differentiation-dependent regulatory factor (ARF)-6* zusammensetzt, der an den Adipozyten-spezifischen Enhancer des *aP2*-Gens bindet.

Darstellung der PPAR-Signalkaskade durch verschiedene physiologische Stimuli

Abkürzungen: TXN=Transkription

RA=Retinsäure

FFA=Freie Fettsäuren



**Abbildung 12**

aus: Schoonjans, Staels, Auwerx, Journal of Lipid Research 37:907-925, 1996

Durch die Bindung mit Liganden wird die Transkriptionsaktivität von nukleären Hormonrezeptoren stark erhöht, wobei man zwei Klassen von Liganden für *PPAR $\gamma$*  unterscheidet.

Zum einen gibt es **natürliche** Liganden für *PPAR $\gamma$* , dazu gehören Fettsäuren, insbesondere ungesättigte und Derivate der Prostaglandine D2 und J2, unter denen sich 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 (PGJ2) als am wirksamsten



erwies. Da jedoch selbst 15-d-PGJ2 nur mit relativ geringer Affinität bindet, werden weitere Liganden höherer Affinität vermutet.

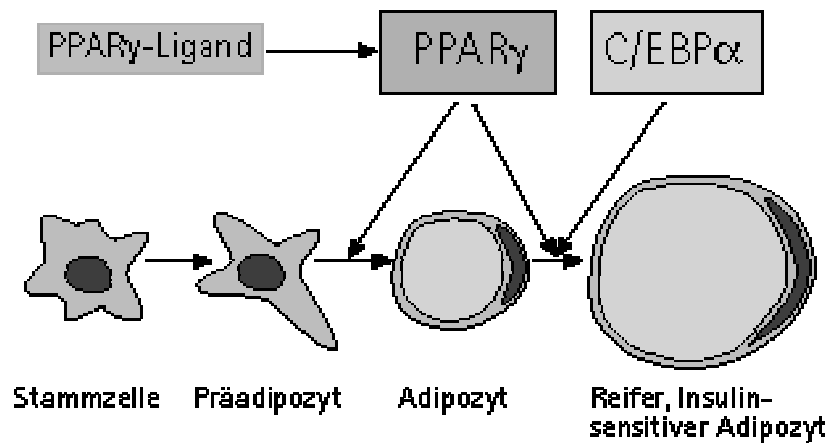
Zum anderen erwies sich eine relativ neue Klasse von Medikamenten als mit hoher Affinität bindende **synthetische** Liganden für *PPAR $\gamma$*  [8]; es handelt sich hierbei um die Thiazolidinedione (TZDs), die eine Erhöhung der Insulinsensitivität bewirken und daher zur Behandlung des nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) eingesetzt werden [49]. Die Thiazolidinedione induzieren die Expression des *aP2*-Gens in Adipozyten, wobei *ARF-6*-bindende DNA-Abschnitte als Bindungsorte für regulatorische Proteine maßgeblich beteiligt sind [8]. Da alle drei Mitglieder der *PPAR*-Superfamilie, *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\beta$*  und *PPAR $\gamma$*  an dieselbe *DR-1*-Typ Sequenz ihres *PPREs* binden, besteht die Möglichkeit, dass sie auch ähnliche Gene regulieren. Obwohl *PPAR $\alpha$*  und *PPAR $\beta$*  nicht ausschließlich von Fettgewebe exprimiert werden, sind sie doch beide indirekt an der Adipogenese beteiligt. *PPAR $\gamma$*  bewirkt jedoch am effektivsten eine Aktivierung des Differenzierungsprogramms von Adipozyten, und daher erklärt sich die adipogene Wirkung der Thiazolidinedione und des 15-d-PGJ2 als aktivierende spezifische Liganden für *PPAR $\gamma$* .

Die zweite Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Induktion der Adipozyten-Differenzierung spielen, die **C/EBPs**, vermitteln ihre adipogene Wirkung unter anderem über die Modulation der Expression von *PPAR $\gamma$* . Hormonelle Signale bewirken zu Beginn der Adipozyten-Differenzierung eine verstärkte Expression von *C/EBP $\beta$*  und *C/EBP $\delta$*  und diese beiden Faktoren stimulieren wiederum die Expression von *PPAR $\gamma$*  [8]. Ist ein Ligand für *PPAR $\gamma$*  vorhanden, setzt sich der Differenzierungsprozess fort und geht mit der Induktion weiterer adipogener Gene, unter anderem *C/EBP $\alpha$* , einher. Mit fortlaufender Differenzierung nimmt der Gehalt an *C/EBP $\beta$*  und *C/EBP $\delta$*  ab, und daher wird die Induktion von *PPAR $\gamma$*  von *C/EBP $\alpha$*  übernommen [8]. Somit ermöglicht das Vorhandensein von *C/EBP $\alpha$*  über die Fortsetzung der Expression von *PPAR $\gamma$*  die Fortführung des Differenzierungsprozesses. Zudem kooperieren *PPAR $\gamma$*  und *C/EBP $\alpha$*  derart, dass bei einer gleichzeitigen Expression beider Faktoren das Vorhandensein

eines exogenen Aktivators für  $PPAR\gamma$  nicht mehr für die Adipozyten-Differenzierung notwendig ist. Möglicherweise ist hierfür ein endogener  $PPAR\gamma$ -Ligand verantwortlich, dessen Bildung durch  $C/EBP\alpha$  vermittelt wird. Wird dagegen nur einer der beiden Transkriptionsfaktoren exprimiert, so erfolgt keine Differenzierung zu Adipozyten [8].

#### Vereinfachtes Schema der Adipogenese

$PPAR\gamma$  ist essentiell für die Initiierung des Differenzierungsprozesses von Adipozyten, die Ausprägung des reifen Insulin-sensitiven Phänotyps von Fettzellen wird gemeinsam durch die Transkriptionsfaktoren  $PPAR\gamma$  und  $C/EBP\alpha$  induziert.

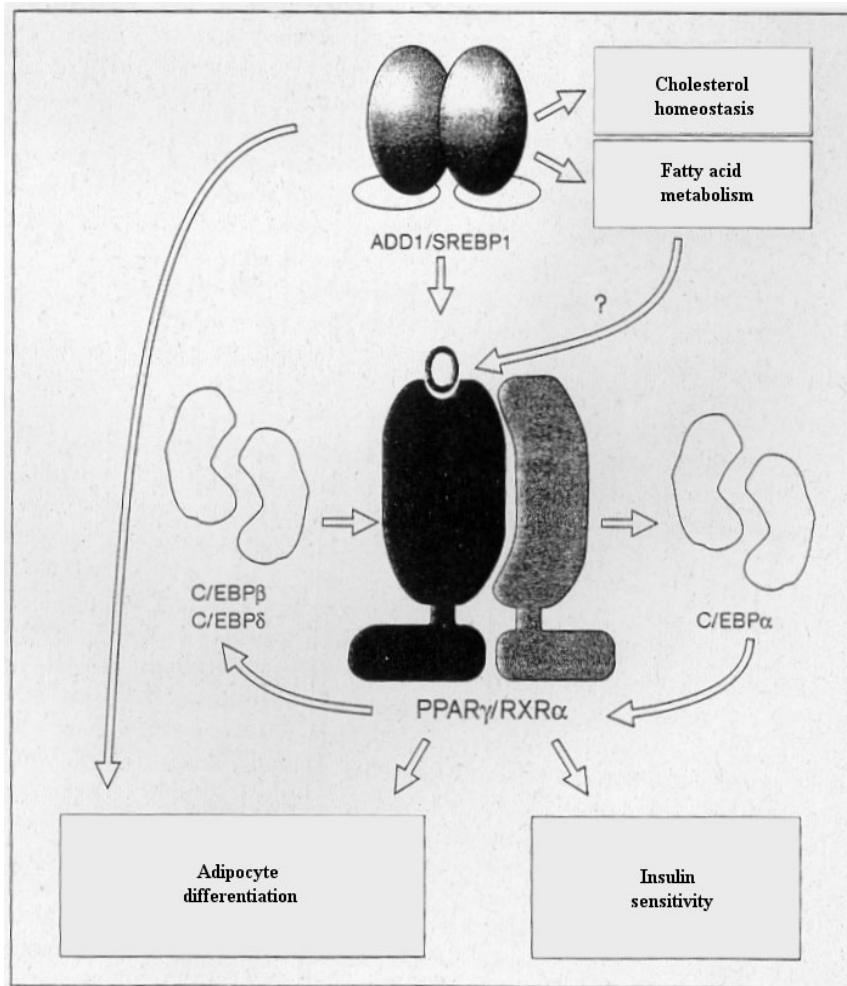


**Abbildung 13**

nach: *B Lowell, Cell 99:339-342, 1999*

Der dritte an der Adipogenese beteiligte Transkriptionsfaktor, der *adipocyte differentiation and determination factor-1 (ADD-1)*, ist in die Regulation der Cholesterin-Homöostase und des Fettsäure-Metabolismus involviert [8]. *ADD-1/SREBP (sterol regulatory element-binding protein)-1* bewirkt spezifisch die Induktion der Lipoproteinlipase sowie der Fettsäure-Synthetase, außerdem erhöht *ADD-1/SREBP* die Aktivität von  $PPAR\gamma$ , wobei auch dies möglicherweise über den Einfluss eines endogen produzierten Liganden vermittelt wird, ähnlich wie bei der Wirkungsweise von  $C/EBP\alpha$  [8].

Kaskade der an der Adipozyten-Differenzierung beteiligten Transkriptionsfaktoren

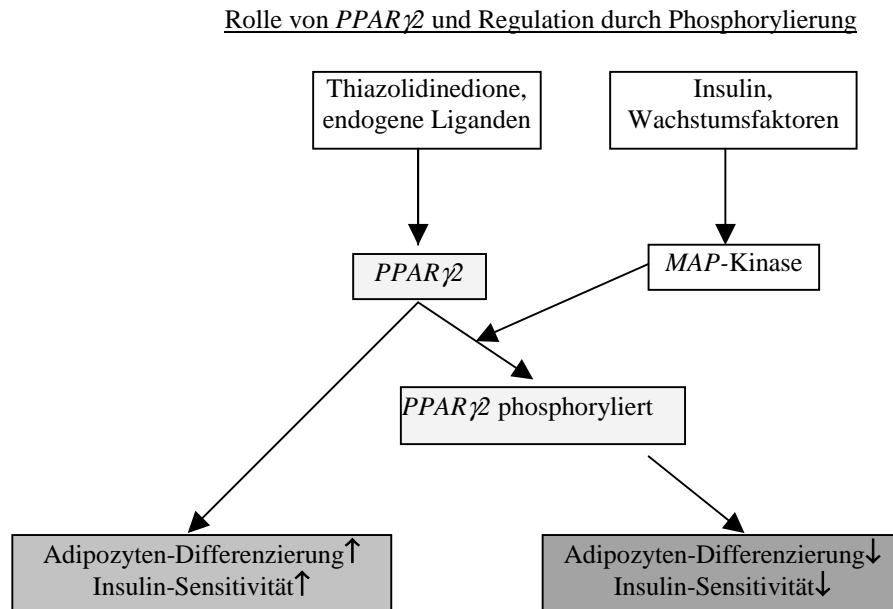


**Abbildung 14**

aus: Brun, Kim, Hu, Spiegelman, Current Opinion in Lipidology 8:212-218,1997

Wachstumsfaktoren wie der *epidermal growth factor (EGF)*, der *platelet-derived growth factor (PDGF)* und der *fibroblast growth factor (FGF)*, die ihr Signal über die Bindung an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren an die Zelle weitergeben, beeinflussen ebenfalls den Differenzierungsprozess von Adipozyten durch Modulation von *PPARγ*. Über die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren erfolgt die Aktivierung der *mitogen activated protein (MAP)*-Kinase, ein Enzym, das bei der Signaltransduktion zur Induktion der Zellteilung (mitogen) beteiligt ist. Über die durch die Wachstumsfaktoren vermittelte Signalübertragung erfolgt durch die *MAP*-Kinase eine Phosphorylierung von Serin an Position 114 des menschlichen *PPARγ2*-Gens [53], wodurch *PPARγ2* inaktiviert wird, so dass

durch den Einfluss der Wachstumsfaktoren die Adipozyten-Differenzierung limitiert und somit auch reguliert werden kann.



**Abbildung 15**

aus: Ristow, Müller-Wieland, Pfeiffer, Krone, Kahn,  
New England Journal of Medicine 339:953-9, 1998

Durch eine Mutation, die eine Phosphorylierung an dieser Stelle unmöglich macht, erfolgt über die Wirkung des nun hyperaktiven  $PPAR\gamma 2$  eine verstärkte Adipozyten-Differenzierung und somit eine starke Fettakkumulation.

Insulin, das die Adipogenese in Präadipozyten fördert, bewirkt ebenfalls eine Phosphorylierung des Serins an Position 114, allerdings nur bei Zellen, die den Insulin-Rezeptor exprimieren.

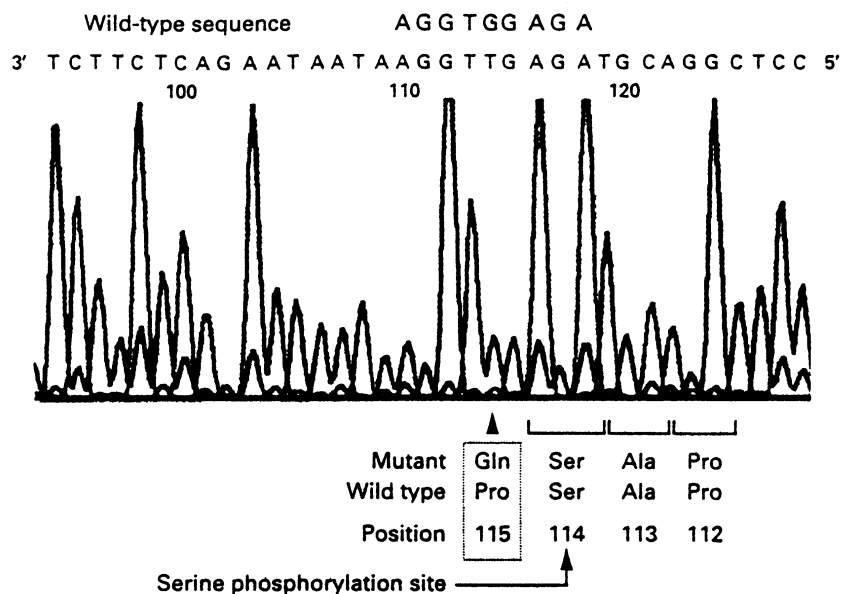
Anhand der Tatsache, dass  $PPAR\gamma$  als Rezeptor für Thiazolidinedione auch in die systemische Insulinsensitivität involviert ist, ergibt sich die Möglichkeit, dass die durch die  $MAP$ -Kinase hervorgerufene Inaktivierung von  $PPAR\gamma$  eine Rolle bei der Entwicklung einer Insulinresistenz spielt, wie sie bei Adipositas und anderen Krankheiten auftritt. Aufgrund der starken Involvierung von  $PPAR\gamma$  in den Fettstoffwechsel und in die Adipozyten-Differenzierung, bietet das  $PPAR\gamma$ -Gen viele Möglichkeiten für das Vorkommen von Adipositas verursachenden oder zumindest fördernden Mutationen.

Auf dem Gen für  $PPAR\gamma 2$  wurden bereits zwei Punktmutationen beschrieben, bei denen es sich um die Pro12Ala-Mutation und die Pro115Gln-Mutation handelt [58], wobei letztere den Hintergrund dieser Arbeit bietet.

So bot den Ansatz zu der vorliegenden Arbeit die Arbeit von *Ristow et al.*, die unter dem Titel *Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation* im Oktober 1998 im *New England Journal of Medicine* veröffentlicht wurde.

*Ristow et al.* untersuchten das Gen von  $PPAR\gamma 2$  in der Umgebung der phosphorylierbaren Aminosäure Serin an Position 114 im Zusammenhang mit sich dort möglicherweise befindlichen, für Adipositas prädisponierenden Mutationen und beschreiben eine Punktmutation am Basenpaar 344, die den Einbau von Glutamin anstelle von Prolin an Position 115 zur Folge hat.

Sequenzanalyse des geklonten DNA-Fragments eines adipösen Probanden mit einer Mutation auf dem  $PPAR\gamma 2$ -Gen (Punktmutation an Basenpaar 344)



**Abbildung 16**

aus: *Ristow, Müller-Wieland, Pfeiffer, Krone, Kahn*,  
*New England Journal of Medicine* 339:953-9, 1998

Diese Pro115Gln-Mutation führt über eine fehlerhafte Phosphorylierung des benachbarten Serins an Position 114 zu verstärkter Adipozyten-

Differenzierung sowie vermehrter Fettakkumulation, was anhand einer Transfektion des mutierten Gens in Fibroblasten beobachtet werden konnte.

Die Pro115Gln-Mutation wurde bei vier von 121 adipösen deutschen Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 33,6 (bei Einzelwerten zwischen 37,9 und 47,3) gefunden und war dagegen bei einer Kontrollgruppe von 237 normalgewichtigen Patienten nicht vorhanden.

79 der übergewichtigen Personen hatten Diabetes mellitus, und von diesen trugen drei die Pro115Gln-Mutation, während sich der vierte Träger der Mutation unter den 42 adipösen Patienten ohne Diabetes befand.

In der Kontrollgruppe waren 107 der normalgewichtigen Patienten Diabetiker. Das gehäufte Auftreten der Mutation erweckt die Vermutung, dass hiermit eine maßgebliche genetische Ursache für Adipositas und möglicherweise auch für Typ II-Diabetes zumindest bei Deutschen gefunden wurde.

## 2 ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Häufigkeit des Auftretens der von *Ristow et al.* beschriebenen Pro115Gln-Mutation, um zu ermitteln, ob deren Inzidenz tatsächlich so hoch ist wie es *Ristow et al.* in ihrer Studie ermittelten (veröffentlicht im Oktober 1998 im *New England Journal of Medicine*, Titel: *Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation*), so dass dadurch die erhobene Vermutung einer Schlüsselrolle bei der Entstehung einer extremen Adipositas bestätigt werden kann.

Dazu soll ein Kollektiv von insgesamt 515 Probanden den Methoden von *Ristow et al.* entsprechend auf das Vorhandensein der Pro115Gln-Mutation untersucht werden, wobei sich die Auswahl des Kollektivs nach den Ergebnissen der Studie von *Ristow et al.* richtet, in der die Pro115Gln-Mutation bei vier von 121 adipösen Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 33,6 nachgewiesen werden konnte, von denen drei zusätzlich an einem Typ II-Diabetes mellitus erkrankt waren, während sich unter einer Kontrollgruppe von 237 normalgewichtigen Patienten kein Träger der Mutation fand.

In dem Kollektiv, das für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde, finden sich 220 stark adipöse Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 51 unter denen 38 noch einen Typ II-Diabetes mellitus aufweisen. Weitere 96 Diabetes-Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 28 werden untersucht sowie eine Kontrollgruppe, bestehend aus 199 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Mit dieser Zusammenstellung der Probanden lässt sich, der Studie von *Ristow et al.* zufolge, ein Auffinden der Mutation erwarten.

## **3 MATERIALIEN**

### **3.1 Patientengut**

Insgesamt wurden 515 Patienten auf das Vorhandensein der Pro115Gln-Mutation untersucht, wobei sich dieses Patientenkollektiv aus drei Gruppen zusammensetzt.

Zunächst wurde die DNA von 220 extrem adipösen Probanden analysiert. Diese Patienten stammen aus ganz Deutschland, jedoch vor allem aus dem Bundesland Nordrhein-Westfalen und haben sich einer Magenband-Operation im Evangelischen und Johanniter Klinikum, Dinslaken, Deutschland unterzogen. Die 178 Frauen und 42 Männer wiesen einen durchschnittlichen BMI von 51 auf (bei Einzelwerten zwischen 35 und 82), 38 unter ihnen waren an Typ II-Diabetes erkrankt.

Des weiteren wurde eine Gruppe von 96 Diabetes-Patienten aus der Medizinischen Klinik der Universitätskliniken Hamburg Eppendorf, Deutschland untersucht. Der durchschnittliche BMI dieser 57 Männer und 39 Frauen betrug 28 (bei Einzelwerten zwischen 19 und 71).

Die Kontrollgruppe schließlich besteht aus 199 gesunden Blutspendern aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Hamburg Eppendorf, Deutschland.

Zur besseren Übersicht über das verwendete Patientenkollektiv dient die folgende Tabelle:



Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die Überprüfung der Variante Pro115Gln im  
*PPAR $\gamma$* -Gen

	Patienten mit Adipositas (178 w, 42 m) ØBMI:51	Typ II- Diabetiker (57 m, 39 w) ØBMI:28	Kontroll- gruppe	gesamt
Typ II- Diabetiker	38	96	0	134
Patienten ohne Diabetes	182	0	199	381
gesamt	220	96	199	515

**Tabelle 3**

### 3.2 Chemikalien

Acrylamid (40 %)	Appligene oncor
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniect.	Braun, Melsungen
Bromphenol Blau Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biolabs, New England
Borsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
DNA Ladder 1Kb	GIBCO BRL, Karlsruhe
Ethidium-Bromid (10mg/ml)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hind II Restriktionsendonuklease	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Qiagen, Hilden
PCR-Öl: Mineral Oil	Sigma, Steinheim
PCR-Puffer: 10x buffer	Boehringer, Mannheim

Primer: Vorwärts P115Q F	Applied Biosystems
Primer: Rückwärts P115Q R	Applied Biosystems
SDS: Dodecylsulfat Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	GIBCO BRL, Karlsruhe
Wasser für Chromatographie	Merck, Darmstadt

### 3.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

#### 3.3.1 Stammlösungen für DNA-Extraktion

##### Tris-HCl 1 M, pH 7,4

121 g Tris  
in 900 ml Aqua dest. gelöst.  
Mit HCl pH eingestellt.  
Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

##### Tris-HCl 1 M, pH 8,2

121 g Tris  
in 900 ml Aqua dest. gelöst.  
Mit HCl pH eingestellt.  
Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

##### Na<sub>2</sub>-EDTA 0,5 M

18,6 g EDTA  
in 90 ml Aqua dest.  
Auf Magnetrührer erhitzt, bis die Lösung klar wurde.  
Volumen auf 100 ml aufgefüllt.

NaCl 5 M

293 g NaCl  
in 900 ml Aqua dest. gelöst.  
Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

NaCl 6 M

349 g NaCl  
in 900 ml Aqua dest.  
Über Nacht auf Magnetrührer aufgelöst  
(Lösung ist gesättigt, nicht alles NaCl löst sich).  
Volumen auf 1000 ml aufgefüllt.

SDS 10%

10 g SDS  
in 100 ml Aqua dest.

Bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Alle Stammlösungen wurden autoklaviert.

**3.3.2 Arbeitslösungen für DNA-Extraktion**

STE Waschpuffer

20 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)  
1 ml 5 M NaCl  
200 µl 0,5 M EDTA  
ad 1000 ml Aqua dest.

Filtriert und autoklaviert.

#### Lyse-Puffer

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,2)

8 ml 5 M NaCl

400 µl 0,5 M EDTA

ad 1000 ml Aqua dest.

Filtriert und autoklaviert.

#### TE-Puffer

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)

40 µl 0.5 M EDTA

ad 100 ml Aqua dest.

Filtriert und autoklaviert.

#### Proteinase K

100 mg Proteinase K

10 ml 10 % SDS

20 ml 0,5 M EDTA

70 ml Aqua dest.

EDTA-Lösung erhitzen, bis sie klar ist, etwas abkühlen lassen.

Proteinase K-Pulver in Erlenmeyer-Kolben geben, 70 ml Aqua dest. und 10 ml SDS hinzufügen. Zuletzt EDTA beimischen.

Autoklaviert, jedoch nicht filtriert.

### **3.3.3 Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers**

#### 10x TBE-Puffer

208 g Tris

110 g Borsäure

80 ml 0,5 M EDTA

ad 2000 ml Aqua dest. Autoklaviert

### **3.3.4 Herstellung eines 10%igen Polyacrylamidgels 1x TBE**

#### 10%iges Polyacrylamidgel 1x TBE

6,5 ml	Aqua ad. iniect.
1 ml	10x TBE
150 µl	AMPS
2,5 ml	40 % Acrylamid
20 µl	TEMED

Ein nach diesem Ansatz gegossenes Minigel hatte ein Ausmaß von 8,6 cm (Breite) x 7,5 cm (Länge mit Taschen) bei einer Schichtdicke von 0,6 mm. Es enthielt 20 Taschen.

### **3.3.5 Zusammensetzung des Loading buffers**

#### Loading buffer

100 µl	1x TBE
400 µl	40 % Glycerol
500 µl	Aqua dest.
	Bromphenol Blau Natriumsalz

### **3.3.6 Zusammensetzung der Färbelösung**

#### Färbelösung

6 µl	Ethidium-Bromid
200 µl	1x TBE

### 3.4 Weitere Materialien

Bechergläser

Eppendorf-Tubes Safe-Lock 0,5ml

Eppendorf, Hamburg

Erlenmeyerkolben

Pipetten pipetman 20, 100, 200 und 1000µl

GILSON

Pipettenspitzen Eco-Tip Refill 200µl

TreffLab, Degersheim, CH

Pipettenspitzen Eco-Tip Refill 0,5-20µl

TreffLab, Degersheim, CH

Spitzröhrchen 15ml

NUNC, Naperville, USA

### 3.5 Geräte

Clean bench (autoklavierbarer Arbeitsplatz)

Herolab

Fotoapparat Polaroid CU-5

Polaroid

Inkubator 3032

GFL

Magnetrührer IKAMAG<sup>®</sup>-PET

Janke&Kunkel GmbH

Minigelkammern

Biometra

Netzgerät Power Pack P25

Biometra

PCR-Gerät Trio-Thermoblock

Biometra

Rollenmischgerät RM 5

Assistent

Tischzentrifuge Biofuge fresco

Heraeus, Hanau

Ultrazentrifuge Beckmann

L7Beckmann, München

UV-Tisch

Biometra

Zentrifuge Hettich

Rotanta/RP

## 4    **METHODEN**

### 4.1   **DNA-Extraktion**

Die DNA des Patientenkollektivs diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche. Die DNA-Extraktion wurde nach S.A. Miller *Nucl Acid Res* 16:1215, 1988 durchgeführt.

Für die DNA-Extraktion wurden die gefrorenen Buffy-Coats (=DNA-haltige Blutzellen) bei Raumtemperatur aufgetaut und in 15 ml Spitzröhrchen gefüllt.

Die Spitzröhrchen wurden anschließend mit STE-Waschpuffer aufgefüllt und durch Umschwenken gemischt.

Die Lösung wurde nun für 15 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Der entstandene Überstand wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgenommen und das Röhrchen erneut mit STE-Puffer gefüllt.

Das durch die Zentrifugation entstandene Pellet wurde durch Aneinanderschlagen zweier Röhrchen losgelöst, die Lösung wurde nochmals durch Umschwenken gemischt und erneut für 15 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend wieder mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, und auf das Pellet wurden 3 ml Lyse-Puffer, 1 ml Proteinase K-Lösung sowie 200 µl 10 % SDS gegeben.

Die fest verschlossenen Röhrchen wurden über Nacht auf einem Rollenmischgerät bei 37 °C im Inkubator gelagert.

Am nächsten Tag wurden zur Protein-Ausfällung in jedes Röhrchen 3,4 ml Lyse-Puffer und 2,3 ml 6 M NaCl gegeben, durch Umschwenken wurde gemischt.

Die Lösung wurde für 20 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Der entstandene Überstand wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette in jeweils ein 50 ml Tube mit 100 %igem Ethanol pipettiert.

Durch Mischen kommt es zum Ausfällen der DNA, die mit Hilfe einer sterilen Pasteur-Pipette herausgenommen und in jeweils ein 15 ml Tube mit 70 %igem Ethanol gegeben wurde.

Durch Umschwenken wurde die DNA gewaschen und anschließend in jeweils ein autoklaviertes Eppendorf-Tube mit 500 µl TE gegeben.

Die Eppendorf-Tubes wurden zum Auflösen der DNA für 48 Stunden auf einem Rollenmischgerät bei 37 °C im Inkubator gelagert und danach bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt.

## **4.2 Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes durch PCR**

### Stammlösung für die PCR der Patienten-DNA

7,25	µl	Wasser für Chromatographie	
1	µl	10x buffer	
0,2	µl	dNTP	
0,25	µl	Vorwärtsprimer	P115Q F
0,25	µl	Rückwärtsprimer	P115Q R
0,05	µl	Taq DNA Polymerase	

an Clean Bench in Tube pipettiert, nach Zugabe des Enzyms gut gemischt.

Der Ansatz gilt für eine Probe; die angegebenen Mengen wurden je nach Bedarf für beispielsweise 10 Proben mit dem Faktor 10, für 20 Proben mit dem Faktor 20 multipliziert.

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird die DNA-Region vervielfältigt, auf der die Mutation Pro115Gln liegt, sofern sie vorhanden ist.

Die zur Vermeidung einer Kontamination unter der Clean Bench pipettierte Stammlösung für die PCR enthielt Desoxytrinukleotidphosphate, die den Position 115 enthaltenden DNA-Bereich flankierenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer, eine hitzebeständige DNA-Polymerase sowie Wasser und einen Puffer, um das optimale pH-Milieu für das Enzym zu schaffen.



Zu den 9 µl Stammlösung pro 0,5 ml-Tube wurde anschließend außerhalb der Clean Bench zügig jeweils 1 µl DNA hinzupipettiert. Um ein Verdunsten der Flüssigkeit zu vermeiden, wurde die Lösung jeweils mit einer geringen Menge PCR-Öl überschichtet. Die PCR erfolgte über 162 Minuten bei 60 °C (entspricht PCR-Programm 3). Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt. Eine Optimierung der Zusammensetzung der Stammlösung oder der Temperatur bei der PCR war nicht erforderlich.

### **4.3 Herstellung der Negativ-Kontrolle**

Zur Kontrolle einer Kontamination der Stammlösung durch Fremd-DNA, wurde eine Negativ-Kontrolle hergestellt, indem bei einer Probe pro Ansatz einer Stammlösung zu den 9 µl Stammlösung statt 1 µl Patienten-DNA 1 µl Wasser für Chromatographie hinzupipettiert wurde. Die Lösung wurde ebenfalls mit PCR-Öl überschichtet und die PCR erfolgte dann ebenso wie mit den anderen Proben, nur daß sich in der Negativ-Kontrolle später keine DNA nachweisen lassen sollte.

### **4.4 Herstellung der Positiv-Kontrolle von PPAR $\gamma$**

#### Stammlösung zur Herstellung der Positiv-Kontrolle von PPAR $\gamma$

42,42	µl	Wasser für Chromatographie
6	µl	10x buffer
2,4	µl	MgCl <sub>2</sub>
1,2	µl	dNTP
2,4	µl	γ 7 Primer
2,4	µl	γ 8 Primer
0,18	µl	Taq DNA Polymerase

an Clean Bench in Tube pipettiert, nach Zugabe des Enzyms gut gemischt. Der Ansatz gilt für die Herstellung von 60 µl der Positiv-Kontrolle für PPAR $\gamma$ , die dann für die Kontrolle mehrerer PCR-Versuche genutzt werden konnte.

Die Positiv-Kontrolle von PPAR $\gamma$  diente dem Nachweis der Anwesenheit und der Funktionsfähigkeit der beim Restriktionsverdau verwendeten Restriktionsendonuklease.

Die an der Clean Bench pipettierten 57 µl Stammlösung für die Positiv-Kontrolle wurden dort zur Vermeidung einer Kontamination auf drei Tubes aufgeteilt. Zu den nun 19 µl Stammlösung pro Tube wurde außerhalb der Clean Bench jeweils 1 µl einer Test-DNA hinzupipettiert.

Um ein Verdunsten der Lösung zu vermeiden, wurden die Proben mit PCR-Öl überschichtet.

Die Test-DNA enthält eine Schnittstelle für die im Verdau verwendete Restriktionsendonuklease, so dass hiermit eine Kontrolle des Enzyms ermöglicht wurde.

Die Amplifikation der die Schnittstelle enthaltenden DNA-Region erfolgte über 157 Minuten bei 65 °C (entspricht PCR-Programm 5).

Zur Überprüfung, ob die PCR erfolgreich verlief, damit die Positiv-Kontrolle eingesetzt werden kann, wurde probeweise ein Verdau durchgeführt:

Es wurden hierzu drei Tubes mit jeweils 8 µl Stammlösung für den Restriktionsverdau vorbereitet.

In drei weitere Tubes wurde der Ansatz der Stammlösung für den Verdau allerdings ohne das Enzym pipettiert.

Anstelle der Restriktionsendonuklease wurde die entsprechende Menge an Aqua dest. hinzugegeben, so dass auch diese Tubes 8 µl Lösung enthielten.

In alle sechs Tubes wurden nun jeweils 2 µl der Positiv-Kontrolle pipettiert, die Proben inkubierten dann für 12 Stunden bei 37 °C.

Ergab die anschließende Elektrophorese auf einem 10 % Polyacrylamid 1x TBE-Minigel dann für die Proben mit Enzym ein positives, für die Proben ohne Enzym ein negatives Ergebnis, konnte von einer erfolgreichen PCR ausgegangen werden, die Positiv-Kontrolle konnte somit eingesetzt werden.

Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt.

## 4.5 Restriktionsverdau

### Stammlösung für den Restriktionsverdau

1	µl	10x buffer
0,1	µl	BSA
0,5	µl	Restriktionsendonuklease Hind II
6,4	µl	Aqua dest.

wurden zusammenpipettiert. Dieser Ansatz gilt für eine Probe; die angegebenen Mengen wurden je nach Bedarf für beispielsweise 10 Proben mit dem Faktor 10, für 20 Proben mit dem Faktor 20 multipliziert.

Eine Optimierung der Zusammensetzung der Stammlösung war nicht erforderlich.

Durch den Restriktionsverdau mit Hind II kann eine Pro115Gln-Mutation nachgewiesen werden, da durch die veränderte Sequenz der mutierten DNA-Region eine Schnittstelle für diese Restriktionsendonuklease entsteht.

Erkennungssequenz und Schnittstelle  
der Hind II Restriktionsendonuklease

$$\begin{array}{l} 5' \text{ GTT } \boxed{\text{GAC}} \text{ 3'} \\ 3' \text{ CAA } \boxed{\text{CTG}} \text{ 5'} \end{array}$$

5'...ctgaaactctgtgagattgctgtgttctctaggacttaacttcacagctagtctattttcctttcag/AAATG  
*Vorwärtsprimer* *Exon 1*  
ACCATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCCACCAACTTTGGGA  
*Hind II*  
TCAGCTCCGTGGATCTCTCCGTAATGGAAGACCACTCCCCTCCTTT  
GATATCAAGCCCTTCACTACTGTTGACTTCT...3'  
*Rückwärtsprimer*

Nach dem Pipettieren der Stammlösung wurden zu den 8 µl Stammlösung pro Tube jeweils 2 µl des PCR-Produktes der DNA aus dem Patientenkollektiv hinzupipettiert.

Zur Kontrolle der Anwesenheit und der Funktionsfähigkeit des Enzyms wurden bei einer Probe zu den 8 µl Stammlösung 2 µl der Positiv-Kontrolle für *PPARγ* pipettiert.

Die Proben inkubierten 12 Stunden lang bei 37 °C.

## **4.6 Elektrophorese und Färbung**

Die Elektrophorese diente dem Nachweis der Pro115Gln-Mutation, sofern sie vorhanden ist; außerdem lieferte sie das Ergebnis der Positiv- und Negativ-Kontrollen.

Zur Elektrophorese wurden jeweils 4 µl der Proben aus dem Restriktionsverdau mit 2 µl Loading buffer vermischt, so daß insgesamt 6 µl pro Gel-Tasche aufgetragen wurden.

17 Taschen eines 10 % Polyacrylamid 1x TBE-Minigels enthielten Proben aus dem Verdau, außerdem wurden 5 µl eines 1 Kb DNA-Markers in eine weitere Tasche aufgetragen.

Von den beiden übrigen Taschen enthielt eine 4 µl der Positiv-Kontrolle mit 2 µl Loading buffer, die andere entsprechend 4 µl der Negativ-Kontrolle mit ebenfalls 2 µl Loading buffer.

Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA in einem Elektrophoresepuffer aus 1x TBE über 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Gele wurden während 2 Minuten in Ethidium-Bromidlösung gefärbt und anschließend unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

## **4.7 Kontrolle der Methoden durch Einsatz des Klons der Pro115Gln-Mutation**

Zur Kontrolle der angewandten Methoden wurde die PCR und der Restriktionsverdau mit einem Klon der Pro115Gln-Mutation durchgeführt.

Der Klon der Mutation wurde von *Ristow et al.* hergestellt und Dr. Ristow stellte ihn uns freundlicherweise zur Verfügung.

Die PCR und der Restriktionsverdau erfolgten nach den gleichen Methoden wie mit den Proben der Patientenkollektive.

Zur Elektrophorese wurden die Proben auf ein 10 % Polyacrylamid 1x TBE-Minigel folgendermaßen aufgetragen:

<b>Spur 3:</b>	DNA B73
<b>Spur 4:</b>	DNA B74
<b>Spur 6:</b>	1 Kb DNA Marker
<b>Spur 7:</b>	2µl Loading buffer 4µl PCR-Produkt der Mutation
<b>Spur 8:</b>	2µl Loading buffer 4µl Verdau-Produkt der Mutation
<b>Spur 9:</b>	2µl Loading buffer 2µl PCR-Produkt der Mutation 2µl Verdau-Produkt der Mutation
<b>Spur 10:</b>	2µl Loading buffer 4µl PCR-Produkt des Wildtyps
<b>Spur 11:</b>	2µl Loading buffer 4µl Verdau-Produkt des Wildtyps
<b>Spur 12:</b>	2µl Loading buffer 2µl PCR-Produkt der Mutation 2µl Verdau-Produkt des Wildtyps
<b>Spur 14:</b>	Positiv-Kontrolle

Die Mischung von PCR-Produkt und Verdau-Produkt dient der deutlicheren Unterscheidung zwischen der Bande des Restriktionsfragments der Mutation und der Bande der ungeschnittenen DNA.

Die Anordnung der Banden dieser Mischung aus PCR-Produkt und Verdau-Produkt auf dem Gel entspricht dadurch dem Bild der Bandenverteilung wie es bei einem heterozygoten Träger der Mutation zu erwarten ist.

Außerdem wurden zum Vergleich noch zwei Verdau-Produkte des Patientenkollektivs aufgetragen.

Die Elektrophorese lief ebenso wie bei den Proben des Patientenkollektivs bei 30 mA über 20 Minuten in einem Elektrophoresepuffer aus 1xTBE, das Gel wurde ebenfalls 2 Minuten lang mit Ethidium-Bromid gefärbt.

Die Fotografie erfolgte unter UV-Licht.

## 5 ERGEBNISSE

Das nach der Häufigkeit der Pro115Gln-Mutation untersuchte Patientenkollektiv war aufgrund der Arbeit von *Ristow et al.* ausgewählt worden. Nach seinen Beobachtungen wiesen die vier Träger der Mutation einen BMI zwischen 37,9 und 47,3 auf und drei von ihnen waren an Typ II-Diabetes erkrankt.

Für die vorliegende Arbeit wurde daher ein Patientenkollektiv aus 220 extrem adipösen Probanden mit einem BMI zwischen 35 und 82 ausgewählt, von denen 38 einen Typ II-Diabetes aufwiesen. Des Weiteren wurde eine Gruppe von 96 Diabetikern untersucht, da bei der Arbeit von *Ristow et al.* drei der vier Probanden mit der Pro115Gln-Mutation an Typ II-Diabetes erkrankt waren. Als Kontrolle wurden schließlich 199 gesunde Probanden auf das Vorhandensein der Mutation untersucht.

Die Untersuchungen wurden den von *Ristow et al.* beschriebenen Methoden entsprechend durchgeführt und sind in Abschnitt 3 der vorliegenden Arbeit näher ausgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Pro115Gln-Mutation weder bei den 220 Probanden mit extremer Adipositas, bei den 96 Probanden mit Typ II-Diabetes mellitus noch bei dem Kontrollkollektiv von 199 gesunden Probanden nachgewiesen werden. Entscheidend war das Ergebnis der Überprüfung der Methoden durch Einsatz des Klons der Pro115Gln-Mutation, den Dr. Ristow freundlicherweise zur Verfügung stellte, da mit dessen Hilfe sich Materialfehler sowie eine nachlässige oder fehlerhafte Durchführung der Methoden ausschließen ließen. Somit steht das Ergebnis dieser Arbeit dem der Studie von *Ristow et al.* entgegen.

Die folgenden Abbildungen entstanden durch Fotografie der mit Ethidium-Bromid gefärbten Polyacrylamid-Gele unter UV-Licht zur Darstellung der Banden. Die auf den Laufspuren der Probanden-DNA sichtbaren einfachen Banden bestehen aus den mittels PCR vervielfältigten DNA-Sequenzen, die aufgrund ihrer Größenübereinstimmung während der Elektrophorese die gleiche Strecke zurücklegen. Das DNA-Fragment wird, sofern die Mutation vorliegt, während des Verdauens von der Restriktionsendonuklease in zwei Teile

geschnitten, die während der Elektrophorese wegen ihrer nun geringeren Größe weiter auf dem Gel wandern und sich so von den Banden der ungeschnittenen DNA abgrenzen lassen. Bei einem heterozygoten Träger der Pro115Gln-Mutation wäre eine Doppelbande sichtbar, ganz so wie sich das Bandenmuster der Positiv-Kontrolle darstellt, da sich die geschnittenen und die ungeschnittenen Fragmente durch die Elektrophorese auftrennen.

Die zur Kontrolle einer Kontamination der Stammlösung durch Fremd-DNA eingesetzte Negativ-Kontrolle ist bei den folgenden Bildbeispielen nur in Abbildung 11 vorhanden, weil die Stammlösung meist für mehr Proben angesetzt wurde als Taschen in einem Gel vorhanden sind. Da die Negativ-Kontrolle für den gesamten Ansatz einer Stammlösung aussagekräftig ist, ist die jeweils einmalige Auftragung auf das Elektrophorese-Gel für die gesamten, mit diesem Ansatz hergestellten PCR-Produkte ausreichend und ist daher nicht auf allen Abbildungen vorhanden.

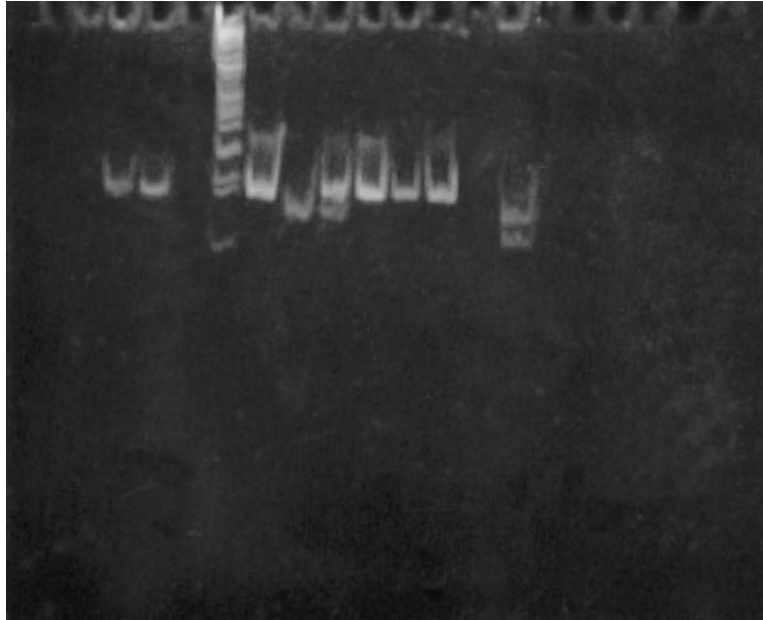
## **5.1 Ergebnis der Überprüfung der Methoden durch Einsatz des Klons der Pro115Gln-Mutation**

Zur Kontrolle der Methoden wurden die PCR und der anschließende Restriktionsverdau mit der Wildtyp-DNA und dem Klon der Pro115Gln-Mutation aus der Arbeit von *Ristow et al.* durchgeführt (s. 4.6). Anhand des Ergebnisses ließen sich Materialfehler und eine nachlässige oder fehlerhafte Durchführung der Methoden ausschließen. Das Verdau-Produkt der Mutation war auf dem Polyacrylamidgel deutlich vom Verdau-Produkt des Wildtyps abzugrenzen.

### Ergebnis der Überprüfung der Methoden

Darstellung der zur Kontrolle verwendeten Proben auf einem 10% Polyacrylamid-Gel 1xTBE nach Elektrophorese und Färbung mit Ethidium-Bromid.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



**Abbildung 17**

- Spur 3:** DNA B73
- Spur 4:** DNA B74
- Spur 6:** 1 Kb DNA Marker
- Spur 7:** PCR-Produkt der Mutation
- Spur 8:** Verdau-Produkt der Mutation
- Spur 9:** PCR-Produkt der Mutation + Verdau-Produkt der Mutation
- Spur 10:** PCR-Produkt des Wildtyps
- Spur 11:** Verdau-Produkt des Wildtyps
- Spur 12:** PCR-Produkt der Mutation + Verdau-Produkt des Wildtyps
- Spur 14:** Positiv-Kontrolle

Die Mischung von PCR-Produkt und Verdau-Produkt diente einer Verdeutlichung der Abgrenzung zwischen den beiden Banden, die bei Vorhandensein der Mutation sichtbar sind (Spur 9). Auf Spur 3 und Spur 4 wurden zum Vergleich und zur Kontrolle Proben aus der Gruppe der gesunden Blutspender erneut aufgetragen, um sicher zu gehen, dass PCR und Restriktionsverdau regelrecht verlaufen waren.



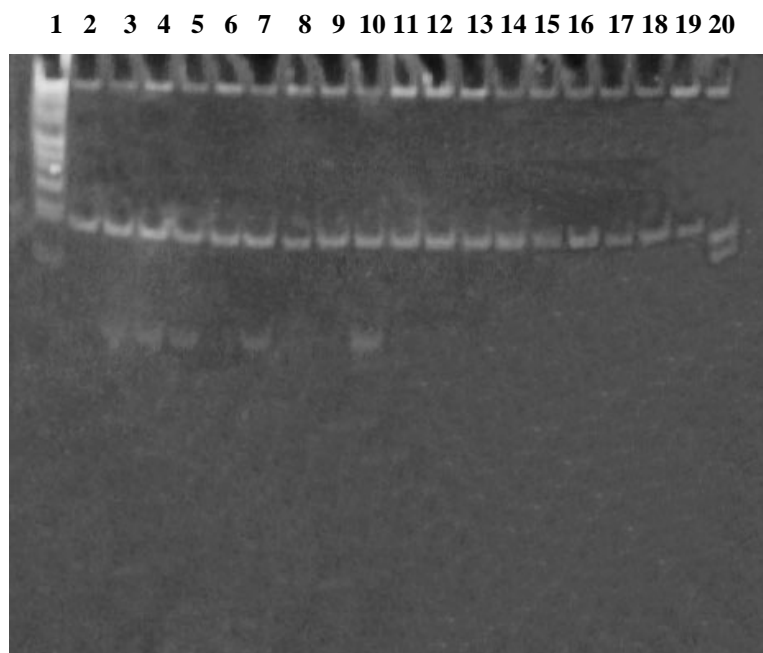
## 5.2 Resultat des Mutationsnachweises bei adipösen Probanden

Für die vorliegende Arbeit wurde die Untersuchung an 220 extrem adipösen Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 51 (bei Einzelwerten zwischen 35 und 82) durchgeführt. Unter diesen 178 Frauen und 42 Männern befanden sich 38 Diabetiker.

**Die Pro115Gln-Mutation konnte bei keinem dieser 220 Probanden nachgewiesen werden.**

Bildbeispiel für das Resultat beim Nachweis der Pro115Gln-Mutation bei Probanden mit extremer Adipositas

Darstellung der mittels PCR vervielfältigten DNA-Sequenzen (F1-F18) nach Restriktionsverdau mit der Hind II Restriktionsendonuklease auf einem 10% Polyacrylamid-Gel 1xTBE nach Elektrophorese und Färbung mit Ethidium-Bromid.



**Abbildung 18**

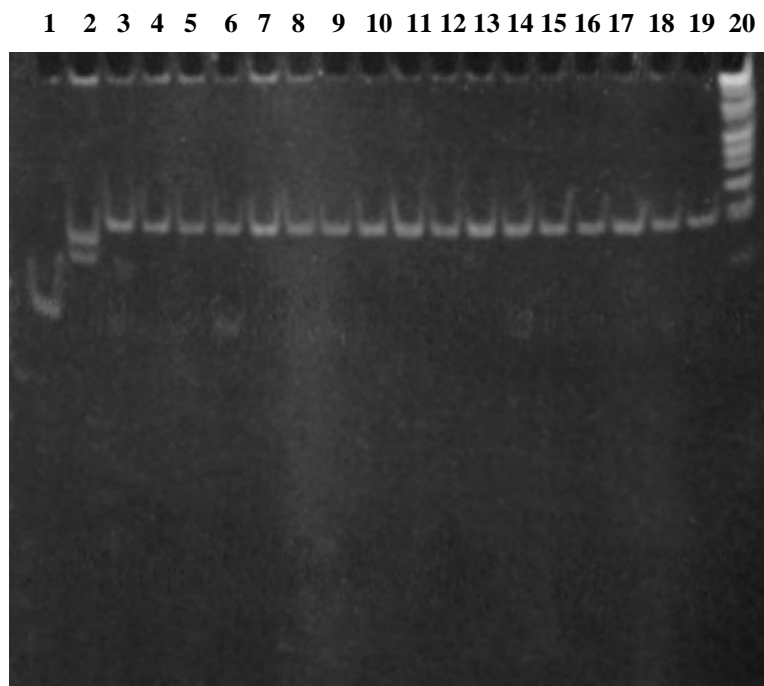
**Spur 1:** 1 Kb DNA Marker  
**Spur 2-19:** DNA F1-F18  
**Spur 20:** Positiv-Kontrolle

### 5.3 Resultat des Mutationsnachweises bei Probanden mit Diabetes mellitus Typ II

Da bei den Untersuchungen von *Ristow et al.* drei der vier Träger der Mutation an Diabetes erkrankt waren, wurde für die vorliegende Arbeit ein weiteres Patientenkollektiv von 96 Diabetikern nach der Pro115Gln-Mutation überprüft. Es handelte sich um 57 Männer und 39 Frauen mit einem durchschnittlichen BMI von 28 (bei Einzelwerten zwischen 19 und 71). **Unter diesen 96 Personen befand sich kein Träger der Pro115Gln Mutation.**

Bildbeispiel für das Resultat beim Nachweis der Pro115Gln-Mutation bei Probanden mit Diabetes mellitus

Darstellung der mittels PCR vervielfältigten DNA-Sequenzen (D810-821, D823, D828-829, D841-842) nach Restriktionsverdau mit der Hind II Restriktionsendonuklease auf einem 10% Polyacrylamid-Gel 1xTBE nach Elektrophorese und Färbung mit Ethidium-Bromid.



**Abbildung 19**

- Spur 1:** Negativ-Kontrolle  
**Spur 2:** Positiv-Kontrolle  
**Spur 3-19:** DNA D810-821, D823, D828-829, D841-842  
**Spur 20:** 1 Kb DNA Marker

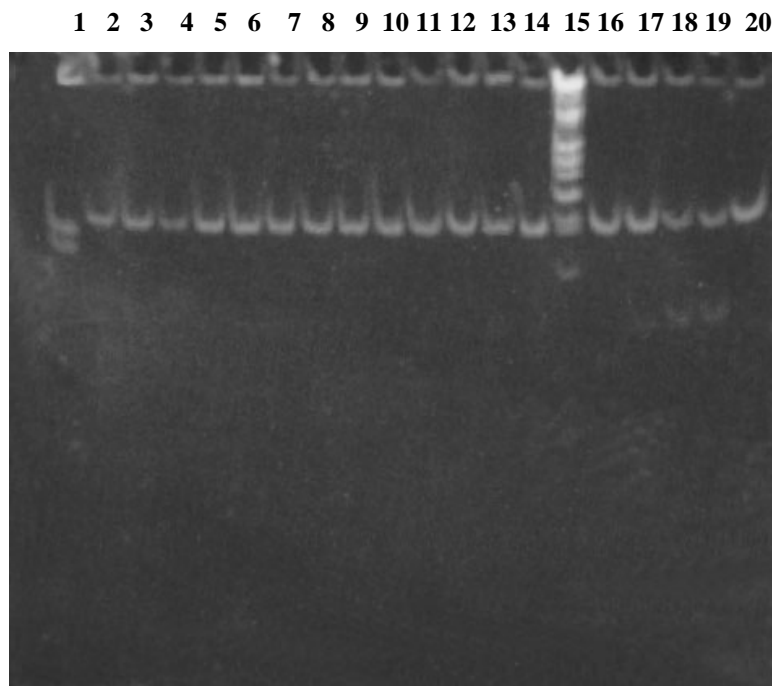
## 5.4 Resultat des Mutationsnachweises bei der Kontrollgruppe aus gesunden Probanden

Schließlich wurden die Untersuchungen nach der Mutation bei einer Kontrollgruppe von 199 gesunden Personen durchgeführt.

**Die Pro115Gln-Mutation konnte bei keiner dieser Personen nachgewiesen werden.**

Bildbeispiel für das Resultat beim Nachweis der Pro115Gln-Mutation bei gesunden Probanden (Kontrollgruppe)

Darstellung der mittels PCR vervielfältigten DNA-Sequenzen (B146-163) nach Restriktionsverdau mit der Hind II Restriktionsendonuklease auf einem 10% Polyacrylamid-Gel 1xTBE nach Elektrophorese und Färbung mit Ethidium-Bromid.



**Abbildung 20**

- Spur 1:** Positiv-Kontrolle
- Spur 2-14:** DNA B151-163
- Spur 15:** 1 Kb DNA Marker
- Spur 16-20:** DNA B146-150

## 5.5 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Vorkommen der Pro115Gln-Mutation auf dem *PPAR $\gamma$ 2*-Gen bei stark adipösen Patienten, Diabetikern und einer gesunden Kontrollgruppe:

**Anzahl der Patienten mit Mutation/Anzahl der Patienten ohne Mutation**

	Patienten mit Adipositas (178 w, 42 m) ØBMI: 51	Typ II-Diabetiker (57 m, 39 w) ØBMI: 28	Kontrollgruppe	gesamt
Typ II-Diabetiker	0/38	0/96	0/0	0/134
Patienten ohne Diabetes	0/182	0/0	0/199	0/381
gesamt	0/220	0/96	0/199	<b>0/515</b>

**Tabelle 4**

**Alle 515 Probanden sind demnach Pro115Pro Wildtypen.**

## 6 DISKUSSION

Die Untersuchung der Inzidenz der Pro115Gln-Mutation zur Einschätzung ihrer Relevanz bei der Entstehung einer extremen Adipositas und möglicherweise auch eines Typ II-Diabetes bei Deutschen ergab bei allen 515 Probanden kein Auftreten der Mutation, alle waren Pro115Pro Wildtypen.

Dieses Resultat der vorliegenden Arbeit steht nun dem Ergebnis der Studie von *Ristow et al.* entgegen, die eine hohe Inzidenz der Pro115Gln-Mutation nachwies.

Übersicht der Ergebnisse von *Ristow et al.* aus der 1998 im New England Journal of Medicine veröffentlichten Studie (N Engl J Med 1998; 339:953-9)

**Anzahl der Patienten mit Mutation/Anzahl der Patienten ohne Mutation**

	Patienten mit Adipositas (61 w, 60 m) ØBMI: 33,9	normalgewichtige Personen (121 m, 120 w) ØBMI: 25	gesamt
Typ II-Diabetiker	3/97	0/107	3/186
Patienten ohne Diabetes	1/42	0/130	1/172
gesamt	4/121	0/237	<b>4/358</b>

**Tabelle 5**

## Übersicht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

### **Anzahl der Patienten mit Mutation/Anzahl der Patienten ohne Mutation**

	Patienten mit Adipositas (178 w, 42 m) ØBMI: 51	Typ II- Diabetiker (57 m,39 w) ØBMI: 28	Kontroll- gruppe	gesamt
Typ II- Diabetiker	0/38	0/96	0/0	0/134
Patienten ohne Diabetes	0/182	0/0	0/199	0/381
gesamt	0/220	0/96	0/199	<b>0/515</b>

**Tabelle 6**

### **6.1 Mögliche Ursachen für das Zustandekommen differierender Ergebnisse**

In Anbetracht der Tatsache, dass die Mutation in der Arbeit von *Ristow et al.* bei 1,1 % der 358 untersuchten Patienten auftrat, in dieser Arbeit hingegen kein Träger der Pro115Gln-Mutation nachgewiesen werden konnte, müssen verschiedene Ursachen dieser Diskrepanz diskutiert werden. Zunächst kommt die Möglichkeit eines Fehlers in der Methodik in Betracht, was jedoch durch verschiedene Kontrollen ausgeschlossen werden konnte. So wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit dem Vorgehen *Ristow et al.* entsprechend durchgeführt, die mögliche Ursache, dass aufgrund einer durch Fremd-DNA verunreinigten PCR-Stammlösung vornehmlich die Fremd-DNA die Versuchsreihen durchlief, wurde durch die Negativ-Kontrollen, die bei jeder erneuten Anfertigung einer Stammlösung hergestellt wurden überprüft. Ein Ausbleiben des Nachweises der Mutation, durch eine fehlende oder

funktionsuntüchtige Restriktionsendonuclease konnte durch den Einsatz der Positiv-Kontrollen verhindert werden. Schließlich wurde der Versuchsablauf mit dem von *Ristow et al.* hergestellten Klon der Pro115Gln-Mutation durchgeführt, den uns Dr. Ristow freundlicherweise zur Verfügung stellte. Eine weitere Möglichkeit, das Ausbleiben der Mutation zu erklären, wäre die Verwendung falscher Primer zur PCR in der vorliegenden Arbeit, so dass eine DNA-Region amplifiziert würde, die das Basenpaar 344 nicht enthielt, doch auch dies konnte durch den Einsatz des Klons der Mutation aus der Arbeit von *Ristow et al.* ausgeschlossen werden, da die unter Verwendung der Primer amplifizierte DNA-Region die Mutation an Position 115 enthielt und somit deutlich von den Banden der Wildtyp-DNA abzugrenzen war. Ebenfalls durch diese Kontrolle konnte ausgeschlossen werden, dass die Pro115Gln-Mutation aufgrund der gleichen Größe beider Restriktionsfragmente übersehen wurde, da in diesem Fall ist eine Auftrennung durch die Gelelektrophorese nicht möglich ist. Es kann daher von einem regelrechten Versuchsablauf bei dieser Studie ausgegangen werden.

Bei einem Vergleich der Zahlenverhältnisse in den Probandenkollektiven beider Studien könnte man die Annahme äußern, dass die Pro115Gln-Mutation den Nachforschungen der vorliegenden Arbeit entgangen ist, da zwar eine größere Anzahl von Probanden getestet wurde (515 Probanden) als in der Studie von *Ristow et al.* (358 Probanden), jedoch das Patientenkollektiv mit dem größten Vorkommen der Mutation bei *Ristow et al.* in dieser Studie kleiner ist. *Ristow et al.* untersuchten 97 Patienten, die sowohl extreme Adipositas als auch einen Typ II-Diabetes mellitus aufwiesen, wobei 3 der Probanden nachweislich Träger der Pro115Gln-Mutation waren.

In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden 38 Probanden eines entsprechenden Patientenkollektivs untersucht und es wäre somit den Gesetzen der Stochastik entsprechend möglich, dass sich rein zufällig kein Träger der Mutation unter der geringeren Anzahl an Probanden befand. Doch bei einem weiteren Vergleich der Kollektivgrößen bei beiden Studien verliert die obige Überlegung an Bedeutung. So konnten *Ristow et al.* auch in einer Gruppe von 42 extrem adipösen Probanden ohne Typ II-Diabetes mellitus einen Träger der Mutation auffinden. Ein entsprechendes Kollektiv aus 182 Probanden wurde

nun auch für die vorliegende Studie untersucht, ohne dass die Mutation nachweisbar war.

Insgesamt ist somit das Patientenkollektiv bei dem die Mutation zu erwarten ist (extrem adipöse Probanden mit bzw. ohne Typ II-Diabetes) bei dieser Arbeit mit 220 Probanden wesentlich größer als in der Studie von *Ristow et al.*, die 121 entsprechende Probanden untersuchten von denen 4 Träger der Pro115Gln-Mutation sind. Zudem konnte die Mutation auch bei den für die vorliegende Studie rekrutierten 96 Diabetes-Patienten nicht festgestellt werden. Bei diesen Zahlenverhältnissen ist die Möglichkeit, dass die Mutation in dieser Arbeit aus Zufall nicht nachzuweisen war, angesichts der hohen Prävalenz der Mutation in der Studie von *Ristow et al.* als sehr gering einzustufen.

Am wahrscheinlichsten ist die Möglichkeit, dass die Patienten der Studie von *Ristow et al.* zum Teil miteinander verwandt sind und dies der Grund für die erhöhte Inzidenz der Mutation ist, denn da sich die Patientenrekrutierung für die Arbeit von *Ristow et al.* auf die Städte Köln und Bochum beschränkte, ist eine nicht bekannte verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Patienten nicht auszuschließen.

Für die vorliegende Arbeit waren zwei Einzugsgebiete (Dinslaken/Nordrhein-Westfalen und Hamburg) zur Patientenrekrutierung verfügbar und somit ist ein lokalspezifisches Fehlen der Mutation unwahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, bietet sich eine Untersuchung der Inzidenz der Pro115Gln-Mutation bei Patienten aus weiteren Regionen an.

## **6.2 Folgerungen, die sich aus den Ergebnissen ableiten lassen**

In der vorliegenden Arbeit konnte die Pro115Gln-Mutation weder bei 220 extrem adipösen Probanden, die zum Teil zusätzlich einen Typ II-Diabetes mellitus aufwiesen, noch bei 96 Diabetes-Patienten nachgewiesen werden. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Pro115Gln-Mutation im *PPAR $\gamma$* -Gen einen mit Adipositas oder Typ II-Diabetes mellitus assoziierten genetischen Polymorphismus bei Deutschen darstellt.



Die Mutation spielt zwar sicherlich als ein genetischer Faktor in der Adipositas-Entstehung eine Rolle, ihr ist aber angesichts des Ergebnisses dieser Arbeit keine so große Relevanz einzuräumen, wie es bei einer, den Resultaten der Studie *Ristow et al.* entsprechenden Prävalenz der Fall wäre.

Das Vorkommen der Pro115Gln-Mutation ist somit zu gering, um damit eine bei einem Großteil der Adipositasfälle vorherrschenden Ursache der Entwicklung einer Fettsucht zu erfassen. Es bietet sich daher an, der Forschung nach Faktoren mit einem höheren Vorkommen Priorität einzuräumen, so dass mit ihrer Beeinflussung eine Therapiemöglichkeit geschaffen werden könnte, die dann bei einem größeren Patientenkollektiv einsetzbar wäre (s. auch *Evans et al., Variation in the gene for human peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) does not play a major role in the development of morbid obesity; Int J Obes Relat Metab Disord 24:647-651, 2000*).

### **6.3 Bedeutung der Ergebnisse im Rahmen nachfolgender Studien**

Im Juli 2002 veröffentlichten *Hamer et al.* das Ergebnis einer Studie, bei der auch Herr Dr. Ristow mitarbeitete und in der im Rahmen einer bundesweiten epidemiologischen Feldstudie in Deutschland die DNA von Probanden mit einem BMI über 35 kg/m<sup>2</sup> auf das Vorkommen der Pro115Gln-Mutation untersucht wurde. Es konnte weder ein homozygoter noch ein heterozygoter Träger der Mutation nachgewiesen werden, so dass auch hieraus geschlossen wurde, dass der Pro115Gln-Polymorphismus auf dem Gen von *PPARγ2* keine epidemiologische Relevanz bezüglich des Auftretens einer extremen Adipositas in Deutschland hat [27]. Somit konnte mit dieser Studie das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Auch in einer 2001 veröffentlichten Studie fand sich unter 359 Männern und Frauen, die eine Adipositas unterschiedlichen Schweregrades und teilweise auch einen Typ II Diabetes mellitus aufwiesen, kein Träger der Pro115Gln-Mutation, so schloss man ebenfalls eine maßgebliche Beteiligung dieser

Mutation an der Pathogenese der Fettsucht und des Typ II Diabetes mellitus aus [58].

Im Jahr 2000 wurde das Vorhandensein der Pro115Gln-Mutation in einer Population von 280 adipösen Taiwanesen mit einem Typ II Diabetes mellitus und 310 adipösen taiwanesischen Probanden ohne einen Diabetes mellitus ausgeschlossen [38].

Der Zusammenhang der Pro115Gln-Mutation mit juveniler Adipositas sollte 1999 anhand einer Studie mit 1621 männlichen dänischen Probanden dargestellt werden, von denen 752 einen BMI von mindestens  $31 \text{ kg/m}^2$  aufwiesen und 896 als normalgewichtige Kontrollgruppe fungierten. Doch die Pro115Gln-Mutation konnte bei keinem dieser Probanden nachgewiesen werden, so dass keine Assoziation dieser Variante mit juveniler Adipositas postuliert werden konnte [20].

Diese Beispiele stützen das Resultat der vorliegenden Arbeit ebenfalls, Studien, die durch den Nachweis der Pro115Gln-Mutation neue Aspekte aufbringen würden, stehen bislang noch aus.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Inzidenz der Pro115Gln-Mutation auf dem Gen des in Fettstoffwechsel und Adipozyten-Differenzierung involvierten Transkriptionsfaktors *PPAR $\gamma$ 2* untersucht.

*Ristow et al.* beschrieben diese Mutation in ihrer Arbeit, die im Oktober 1998 im *New England Journal of Medicine* veröffentlicht wurde. Sie fanden die Pro115Gln-Mutation bei vier von 121 stark adipösen Patienten, drei der Träger der Mutation waren Diabetiker. Das hohe Vorkommen der Mutation führte zu der Vermutung, dass sie eine wichtige genetische Ursache für Adipositas und vielleicht auch für Typ II-Diabetes, zumindest bei Deutschen, sein könnte, was den Hintergrund der vorliegenden Arbeit bot. Somit bestand das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv aus extrem adipösen Personen, die zum Teil an Diabetes mellitus erkrankt waren. Die Untersuchung der Patienten-DNA erfolgte mit Hilfe der PCR und des Restriktionsverdau durch eine spezifische Restriktionsendonuklease, wobei die Methoden den von *Ristow et al.* angewendeten Verfahren entsprachen. Kontamination, Aktivität des Enzyms, richtige Restriktionsschnittstelle und Pipettierfehler wurden durch den Einsatz verschiedener Kontrollen überprüft. Trotz des für das Auffinden der Pro115Gln-Mutation geeigneten Patientenkollektivs, konnte die Mutation im Rahmen dieser Arbeit bei keinem Patienten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden noch eine Gruppe von Diabetikern und ein Kontrollkollektiv aus gesunden Personen untersucht, doch auch unter diesen befand sich kein Träger der Mutation.

Diesen Ergebnissen zufolge ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei der Pro115Gln-Mutation auf dem Gen für *PPAR $\gamma$ 2* um einen mit Adipositas und Diabetes assoziierten Polymorphismus bei Deutschen handelt.

Das hohe Vorkommen dieser Mutation in der Arbeit von *Ristow et al.* ist möglicherweise die Folge des auf die Städte Köln und Bochum beschränkten Bereichs, aus dem die Patienten rekrutiert wurden.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Bailes BK**  
Diabetes mellitus and its chronic complications  
*AORN J* 76:266-276, 2002
2. **Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW**  
Leptin sensitive neurons in the hypothalamus  
*Horm Metab Res* 31:345-50, 1999
3. **Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA**  
The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors  
*Proc Natl Acad Sci USA* 93:8374-8378, 1996
4. **Beck F, Plummer S, Senior PV, Byrne S, Green S, Brammar WJ**  
The ontogeny of peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in the mouse and rat  
*Proc R Soc Lond [Biol]* 247:83-87, 1992
5. **Bouchard C**  
The causes of obesity: advances in molecular biology but stagnation on the genetic front  
*Diabetologia* 39:1532-1533, 1996
6. **Bouchard C**  
The genetics of human obesity: recent progress  
*Bull Mem Acad R Med Belg* 156:455-62, 2001

7. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W**  
Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors:  
tissue distribution of PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  in the adult rat  
*Endocrinology* 137:354-366, 1996
8. **Brun RP, Kim JB, Hu E and Spiegelman BM**  
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of  
adipogenesis  
*Curr Opin Lipidol* 8:212-218, 1997
9. **Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devoz R, Burn P**  
Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal  
linking adiposity and central neural networks  
*Science* 269:546-549, 1995
10. **Chagnon YC, Pérusse L and Bouchard C**  
Familial aggregation of obesity, candidate genes and quantitative trait  
loci  
*Curr Opin Lipidol* 8:205-211, 1997
11. **Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Wenig X, Ellis SJ,  
Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE et al.**  
Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor:  
identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice  
*Cell* 84:491-495, 1996
12. **Clement K, Boutin P, Froguel P**  
Genetics of obesity  
*Am J Pharmacogenomics* 2:177-187, 2002
13. **Coleman DL**  
Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity  
syndromes in mice  
*Diabetologia* 14:141-148, 1978

14. **Coleman DL, Eicher EM**  
*Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse*  
*J Hered 88:424-427, 1990*
  
15. **Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier FS, Hunt CR, Spiegelman BM**  
Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve  
*Science 237:402-405, 1987*
  
16. **Cool DR, Normant E, Shen F, Chen H, Pannel L, Zhang Y, Loh YP**  
Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe/fat mice  
*Cell 88:73-83, 1997*
  
17. **Deedwania PC**  
Clinical significance of cardiovascular dysmetabolic syndrome  
*Curr Control Trials Cardiovasc Med 3:2, 2002*
  
18. **Dulloo AG, Jaquet J**  
An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation  
*Int J Obes Relat Metab Disord 25 Suppl 5:22-29, 2001*
  
19. **Elmquist JK**  
Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic and behavioural effects of leptin  
*Physiol Behav 74:703-708, 2001*

20. **Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O**  
Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men  
*Diabetologia* 42:892-895, 1999
21. **Evans RM**  
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily  
*Science* 240:889-895, 1988
22. **Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD**  
Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y  
*Nature* 381:415, 1996
23. **Froguel P, Guy-Grand B, Clement K**  
Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome  
*Presse Med* 29:564-571, 2000
24. **Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL et al.**  
A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake  
*Nature* 382:168-171, 1996
25. **Green S and P Chambon**  
Nuclear receptors enhance our understanding of transcriptional regulation  
*Trends Genet* 4:309-314, 1988

26. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM**  
Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene  
*Science* 269:543-546, 1995
27. **Hamer OE, Forstner D, Ottinger I, Ristow M, Bollheimer LC, Scholmerich J, Palitzsch KD**  
The Pro115Gln polymorphism within the PPAR gamma2 gene has no epidemiological impact on morbid obesity  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110:230-234, 2002
28. **Hensrud DD**  
Dietary treatment and long-term weight loss and maintenance in type 2 diabetes  
*Obes Res* 9 Suppl 4:348-353, 2001
29. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM**  
Adipose expression of tumor necrosis factor alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance  
*Science* 259:87-91, 1993
30. **Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS Kasper DL**  
Harrisons Innere MEDIZIN  
*Blackwell Wissenschaftsverlag, 13. Auflage 1995*
31. **Isseman I and S Green**  
Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators  
*Nature* 347:645-650, 1990



32. **Isseman I, Prince R, Tugwood JD, Green S**  
A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation  
*Biochem Soc Trans* 20:842-827, 1992
33. **Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS**  
Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight  
*Endocr Rev* 20:68-100, 1999
34. **Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM**  
Convergence of 9-*cis* retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors  
*Nature* 358:771-774, 1992
35. **Kyulo N, Knutsen S, Singh P**  
Effect of history of overweight/obesity on health outcomes observed in those in the recommended range of body weight (19-25 kg/m<sup>2</sup>)  
*Ann Epidemiol* 12:500, 2002
36. **Kwon HY, Bultman SJ, Loffler C, Chen WJ, Furdon PJ, Powell JG, Usala AL, Wilkison W, Hansmann I, Woychik RP**  
Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the *agouti* gene  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9760-9764, 1994
37. **Larsen PJ, Vrang N, Tang-Christensen M; Jensen PB, Hay-Schmidt A, Romer J, Bjerre-Knudsen L, Kristensen P**  
Ups and downs for neuropeptides in body weight homeostasis: pharmacological potential of cocaine amphetamine regulated transcript and pre-proglucagon-derived peptides  
*Eur J Pharmacol* 440:159-172, 2002

38. **Lei HH, Chen MH, Yang WS, Chiu MC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM**  
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala gene variant is strongly associated with larger body mass in the Taiwanese  
*Metabolism 49:1267-1270, 2000*
39. **Leonetti F, Lacobellis G, Zappaterreno A, Di Mario U**  
Clinical, physiopathological and dietic aspects of metabolic syndrome  
*Dig liver Dis 34 Suppl 2:134-139, 2002*
40. **Lock EA, Mitchell AM, Elcombe CR**  
Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation  
*Annu Rev Pharmacol Toxicol 29:145-163, 1989*
41. **Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik R, Wilkison WO**  
*Agouti* protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor  
*Nature 371:799-802, 1994*
42. **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**  
Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans  
*Nature 387:903-908, 1997*
43. **Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD**  
Localisation of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain  
*Mol Endocrinol 8:1298-1308, 1994*

44. **Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM**  
Genetic analysis of adipogenesis through PPARgamma isoforms  
*J Biol Chem* 277:41925-41930, 2002
45. **Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH**  
Hyperproinsulinaemia in obese *fat/fat* mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity  
*Nat Genet* 10:135-142, 1995
46. **Naggert J, Harris T and North M**  
The genetics of obesity  
*Curr Opin of Genetics & Development* 7:398-404, 1997
47. **Norman RA, Leibel RL, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua SC Jr., Knowler WL, Thompson DB, Bogardus C, Ravussin E**  
Absence of linkage of obesity and energy metabolism to markers flanking homologues of rodent obesity genes in Pima Indians  
*Diabetes* 45:1229-1232, 1996
48. **Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JI**  
Metabolic aspects of peroxisomal  $\beta$ -oxidation  
*Biochim Biophys Acta* 1085:141-158, 1991
49. **Pathak R, Afaq A, Blonde L**  
Thiazolidinediones in the treatment of managed care patients with type 2 diabetes  
*Am J Manag Care* 8:483-484, 2002

50. **Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, Hennes MI, Wilson CR, Gustafson AB, Kissebah AH**  
Adiposity, fat distribution and cardiovascular risk  
*Ann Intern Med* 110:867-872, 1989
51. **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F**  
Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice  
*Science* 269:540-543, 1995
52. **Pi-Sunyer FX**  
The medical risks of obesity  
*Obes Surg* 12 Suppl 1:6-11, 2002
53. **Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W and Kahn C R**  
Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation  
*N Engl J Med* 339:953-9, 1998
54. **Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D**  
Peroxisome proliferator activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthetase gene by fatty acids  
*J Biol Chem* 269:18767-18772, 1994
55. **Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, von Prittwitz S, Barth N, Roth H, Mayer H, Siegfried W, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt M, Schafer H, Remschmidt H, Hebebrand J**  
Screening for mutations in the neuropeptide Y Y5 receptor gene in cohorts belonging to different weight extremes  
*Int J Obes Relat Metab Disord* 22:157-63, 1998

56. **Sahu A**  
Resistance to the satiety action of leptin following chronic central leptin infusion is associated with the development of leptin in neuropeptide Y neurones  
*J Neuroendocrinol* 14:796-804, 2002
57. **Saladin R, Fajas L, Dana S, Halvorsen YD, Auwerx J and Briggs M**  
Differential regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis  
*Cell Growth Differ* 10(1):43-8, 1999
58. **Schaffler A, Barth N, Schmitz G, Zietz B, Palitzsch KD, Scholmerich J**  
Frequency and significance of Pro12Ala and Pro115Gln polymorphism in gene for peroxisome proliferation-activated receptor-gamma regarding metabolic parameters in a Caucasian cohort  
*Endocrine* 24:369-373, 2001
59. **Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J**  
Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter  
*J Biol Chem* 270:19269-19276, 1995
60. **Schoonjans K, Staels B and Auwerx J**  
Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression  
*J. Lipid Res.* 37:907-925, 1996

61. **Schoonjans K, Staels B, Deeb S, Auwerx J**  
PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene  
*Submitted, 1996*
62. **Schwandt P, Richter WO**  
Handbuch der Fettstoffwechselstörungen  
*Schattauer, 2. Auflage 2000*
63. **Seidell JC**  
Obesity, insulin resistance and diabetes-a worldwide epidemic  
*Br J Nutr 83 Suppl 1:5-8, 2000*
64. **Smith CK, Romsos DR**  
Cold acclimation of obese (*ob/ob*) mice: effects on skeletal muscle and bone  
*Metabolism 33:858-863, 1984*
65. **Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen, NL., Mc Cleary GE**  
The body-mass index of twins who have been reared apart  
*N Engl J Med 322:1483-1487, 1990*
66. **Tennyson GE**  
Understanding type 2 diabetes mellitus and associated cardiovascular disease: linked by insulin resistance  
*Am J Manag Care 8:450-459, 2002*
67. **Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM**  
Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$   
*Nucleic Acids Res 22:5628-5634, 1994*

68. **Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM**  
mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer  
*Genes Dev* 8: 1224-1234, 1994
69. **Wilding JP**  
Neuropeptides and appetite control  
*Diabet Med* 19:619-627, 2002
70. **William G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH**  
The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different  
circuits, different purposes  
*Physiol Behav* 74:683-701, 2001
71. **Yen TY, Gill AM, Frigeri LG, Barsh GS, Wolff GL**  
Obesity, diabetes and neoplasia in yellow  $A^{vy}/-$ mice: ectopic expression  
of the *agouti*-gene  
*FASEB J* 8:479-488, 1994
72. **York C, Bouchard C**  
How obesity develops:insights from the new biology  
*Endocrine* 13:143-154, 2000
73. **York DA**  
Peripheral and central mechanisms regulating food intake and  
macronutrient selection  
*Obes Surg* 9:471-479, 1999
74. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L,  
Friedman JM**  
Positional cloning of the mouse obese gene and ist human homologue  
*Nature* 372:425-432, 1994

75. **Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen X-N, Noya D, Rao MS, Reddy JK**

Structural organisation of the mouse peroxisome proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (mPPAR $\gamma$ ) gene: alternative promotor use and different splicing yield two mPPAR $\gamma$  isoforms

*Proc Natl Acad Sci U S A 92:7921-7925, 1995*



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Bereitstellung aller technischen und finanziellen Mittel, für ihre fachlich und menschlich kompetente Unterstützung sowie für ihre ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Dave Evans danke ich für die gesamte Betreuung und insbesondere für die sorgfältige Anleitung im experimentellen Teil der Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Instituts für medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die überaus warmherzige Aufnahme, freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre permanente Hilfsbereitschaft. Hervorheben möchte ich besonders die gute Zusammenarbeit mit Frau Dorte Wendt und danke ihr für ihre geduldige Unterstützung.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Ursula Michel  
Geburtsdatum: 19.09.1976  
Geburtsort: Königstein im Taunus  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung:

1983-1987 Grundschule Kronberg  
1987-1996 Altkönigschule Kronberg  
1995 Medizinertest: 91,9% (Testbestenquote)  
1996 Abitur, Note: 1,5

### Hochschulbildung:

1996 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin am  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
1998 Ärztliche Vorprüfung, Note: 3,33  
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,00  
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,66  
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,00  
Gesamtnote: sehr gut (1,49)  
10/2000-03/2001 Auslandssemester (Humanmedizin) an der  
Universität de Nice Sophia-Antipolis, Frankreich

### Famulaturen:

2000 Notfallmedizin:  
Canberra Clinical School, University of Sydney,  
Australien  
2000 Gynäkologie, Dermatologie, Innere Medizin:  
Hôpital de l'Archet, C.H.U. de Nice, Frankreich

### Praktisches Jahr:

Innere Medizin: Nephrologie, Gastroenterologie:  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Chirurgie: Gefäßchirurgie, Abdominalchirurgie:  
City Hospital, University of Birmingham, England  
Unfall- und Wiederherstellungschirurgie:  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Wahlfach: Dermatologie:  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Für die Dauer des gesamten Studiums Stipendiatin des Nassauischen  
Zentralstudienfonds (NZF)

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst, andere als die mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 4. November 2002

