

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

III. Medizinische Klinik und Poliklinik (Nephrologie, Rheumatologie - Nierentransplantation
- Sektion Endokrinologie/Diabetologie)

Direktor: Prof. Dr. med. R. A. K. Stahl

Untersuchung des CART Gens auf Varianten im Promoterbereich bei Patienten mit Adipositas

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hannah Friederike Beil
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.03.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. M. Merkel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. de Weerth

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. E. Windler

Für meine lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Adipositas	7
1.1.1 Aufkommen und Bedeutung weltweit und bundesweit	7
1.1.2 Definition und Messverfahren der Adipositas	8
1.1.3 Gesundheitliche Folgen	11
1.2 Ursachen der Adipositas	13
1.2.1 Einfluss der Genetik	14
1.2.2 Einfluss der Umwelt	14
1.2.3 Monogenetische Varianten	15
1.2.4 Syndromale Adipositas	16
1.2.5 Polygenetische Adipositas	17
1.3 Die Regulation der Nahrungsaufnahme	17
1.3.1 Affarente und efferente Signale	17
1.3.2 Schaltzentrale Hypothalamus	19
1.3.3 Anorectic and Orexigenic Peptides	19
1.4 Die Rolle von CART in der Nahrungsaufnahme	20
1.4.1 CART als anorektisches Peptid	20
1.4.2 Genetik von CART	21
1.5 Bedeutung von SNPs als genetische Variation	22
1.5.1 Common disease-common variant model	22
1.5.2 Common-disease-multiple-rare variant Hypothese	23
1.6 Fragestellung	25

2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	PCR	26
2.1.2	Restriktionsverdau	26
2.1.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.1.4	Ethidiumbromidfärbung	27
2.1.5	PCR Aufreinigung	27
2.1.6	Sequenz-Reaktion	27
2.1.7	Ethanol-fällung	27
2.1.8	Silberfärbung	27
2.1.9	SSCP Gelelektrophorese	28
2.1.10	Geltrocknung	28
2.1.11	Technische Geräte	28
2.2	Methoden	28
2.2.1	Polymerasenkettenreaktion	28
2.2.2	Polyacrylamidgel	30
2.2.3	Anfärbung von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid	31
2.2.4	Restriktionsverdau des PCR-Produktes	32
2.2.5	SSCP	33
2.2.6	Silberfärbung	34
2.2.7	Sequenzanalyse	35
2.2.7.1	PCR-Produktreinigung	35
2.2.7.2	Sequenz-Reaktion	36
2.2.7.3	Ethanol-fällung	37
2.2.8	Analyse	38
3	Ergebnisse	38
3.1	Patientenkollektiv	38
3.2	Darstellung der SSCP-Ergebnisse	39
3.2.1	Häufige SSCP- Muster Varianten	39

3.2.2 Seltene SSCP- Muster Varianten	41
3.2.2.1 SSCP- Muster 9	41
3.2.2.2 SSCP- Muster 10	42
3.2.2.3 SSCP- Muster 11	43
3.2.2.4 SSCP- Muster 12	44
3.2.3 Überprüfung häufiger SSCP- Muster Varianten	45
3.3 Darstellung der Sequenzanalyse-Ergebnisse	46
3.3.1 Häufige Muster Varianten	47
3.3.1.1 Allel- und Genotypverteilung	48
3.3.1.2 Genotypverteilung nach Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	48
3.3.2 Seltene Muster Varianten	49
3.4 Haplotypen und Stoffwechselfparameter	50
4 Diskussion	50
5 Zusammenfassung	56
6 Literaturverzeichnis	58
7 Anhang 1	63
8 Anhang 2	71
9 Danksagung	77
10 Lebenslauf	78
11 Erklärung	79

1 Einleitung

1.1 Adipositas

1.1.1 Aufkommen und Bedeutung weltweit und bundesweit

Adipositas ist eines der wichtigsten Gesundheitsprobleme in den westlichen Industrienationen und in zunehmendem Maße auch in den Entwicklungsländern. Dies beruht darauf, dass übermäßiges Körpergewicht mit einer Reihe von Komorbiditäten wie z.B. Diabetes Mellitus II einhergeht. Adipositas ist inzwischen der sechstwichtigste Faktor für die globale Gesamtsterblichkeit und Morbidität geworden [1].

Die letzten Untersuchungen der WHO im Jahr 2005 ergaben weltweit ca. 1.6 Billionen Erwachsene mit Übergewicht und ca. 400 Millionen adipöse Erwachsene. Die prognostizierte Zunahme der von Übergewicht und Adipositas Betroffenen liegt bei gut

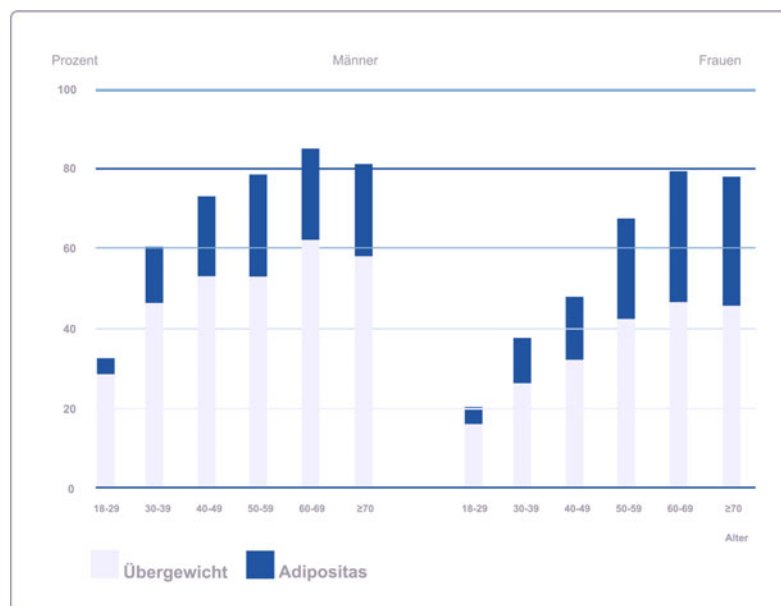


Abb.1 Anteil der Männer und Frauen mit Übergewicht bzw. Adipositas in der jeweiligen Altersgruppe (Quelle: Robert Koch-Institut, BGS 98) [64]

der Hälfte der 2005 ermittelten Personen bis zum Jahr 2015 [2]. In Deutschland sind nach dem zuletzt vom Statistischen Bundesamt durchgeführten Mikrozensus aus dem

Jahr 2009 die Hälfte der Erwachsenen als übergewichtig und etwa jeder sechste Erwachsene als adipös einzustufen. Die größte Gewichtszunahme findet zwischen dem 30. und 60 Lebensjahr statt und findet seinen Höhepunkt mit 67,9% (Männer: 74%, Frauen: 63%) zwischen dem 70-75 Lebensjahr. Frauen waren durchschnittlich zu 43% übergewichtig und zu 14% adipös, Männer zu 60% übergewichtig und zu 16% adipös.

Insgesamt wurden für diese Statistik 340 Haushalte mit rund 700 000 der ländlichen und städtischen Bevölkerung nach ihrem körperlichen Status befragt [3]. Es wurden somit keine objektiven Messungen durchgeführt, so dass von einer zu niedrigen Angabe des Körpergewichtes auszugehen ist. Objektive, aufgrund von Messdaten erhobene repräsentative Daten sind 1998 durch den Bundes-Gesundheitssurvey an 7124 Personen im Alter von 18 bis 79 Jahren ermittelt worden. Die Untersuchungen zeigten eine hohe Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik; im Vergleich zwischen den westlichen und östlichen Bundesländern zeigte sich in den östlichen Bundesländern eine noch höhere Prävalenz von Adipositas bei Männern und Frauen. Des Weiteren wurde ein erheblicher Anstieg der Adipositas von 7,5% über das zurückliegende Jahrzehnt vermerkt, wobei der Anteil der Übergewichtigen in etwa gleich geblieben ist.

Der größte Anstieg der Adipositas ist für die USA belegt: dort nahm der Anteil von adipösen Personen von um 8% innerhalb der letzten 6 Jahre zu [4, 5].

Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Morbidität bzw. Mortalität ist bewiesen. Die steigenden Zahlen sind eine zunehmende Belastung für die Gesellschaft, angesichts der Tatsache, dass Adipositas mit ihren Folgekrankheiten bereits im Jahr 2008 direkte Gesundheitskosten von 13 Milliarden Euro pro Jahr verursacht hat [6].

1.1.2 Definition und Messverfahren der Adipositas

Zur besseren Vergleichbarkeit und Verständnis von Studien bezüglich Morbidität und Mortalität, soll zunächst auf den Begriff der Adipositas, seine Einteilung und Messbarkeit eingegangen werden.

Adipositas ist definiert als vermehrte Ansammlung von Körperfett in Bezug auf die Gesamtkörpermasse.

Zur Beurteilung des Körpergewichtes bzw. der Körperfettmasse können direkte und indirekte Verfahren unterschieden werden.

Zu den indirekten Verfahren gehört der Body-Mass-Index (BMI). Er errechnet sich aus Körpergewicht in kg geteilt durch die Körpergröße in m².

Aufgrund seiner leichten Anwendbarkeit eignet er sich gut zur Beurteilung großer Kollektive. Auch die WHO und der Bundes-Gesundheitssurvey verwendeten den BMI zur Stadieneinteilung. Wie aus der Formel zur Berechnung des BMI hervorgeht, berücksichtigt er jedoch weder Fettverteilung noch Muskelmasse. Bei einer Person mit erhöhter Muskelmasse (z.B. Bodybuilder) und damit erhöhtem Körpergewicht, würde

Tab.1 Klassifizierung des Body-Mass-Index (Quelle: Richtlinien der WHO 1998) [59]

Definition	BMI [kg/m ²]	Risiko von Komorbidität
Untergewicht	<18,5	Niedrig
Normalgewicht	18,5-24,9	Durchschnittlich
Übergewicht	25-29,9	Leicht erhöht
Adipositas	≥30	
Schweregrad 1	30-34,9	Mäßig erhöht
Schweregrad 2	35-39,9	Stark erhöht
Schweregrad 3	≥40	Extrem erhöht

ein erhöhter BMI errechnet werden, ohne dass ein Krankheitswert besteht. Ebenso werden vom BMI die Personen nicht berücksichtigt, die zwar kein erhöhtes Körpergewicht, jedoch einen erhöhten Anteil des Körperfetts aufweisen und damit ein erhöhtes Risiko haben. Dennoch, angesichts der Tatsache, dass der Anteil der zuletzt genannten Personengruppen gemessen an der Gesamtgruppe gering ist und aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung des BMI und der Körperfettmasse, ist der letzte Gesichtspunkt zu vernachlässigen [7].

Das Normalgewicht bei der Einteilung des Körpergewichtes anhand des BMI liegt bei 18,5-24,9 kg/m². Es wurde durch den Zusammenhang von Übergewicht und Morbidität bzw. Mortalität ermittelt. Eine Person unterhalb dieses BMI wird als untergewichtig, eine Person oberhalb dieses BMI bis 29,9 kg/m² als übergewichtig bezeichnet. Ab einem BMI >30 kg/m² spricht man von Adipositas. Hierbei sind nach der WHO drei Schweregrade der Adipositas zu unterscheiden, siehe Tab.1.

Diese Einteilung wurde anhand des Risikos für Komorbiditäten in weissen (kaukasischen) Bevölkerungsgruppen erstellt.

Tab.2 Einteilung des Körpergewichts anhand von Taillenumfang und „Waist-to-Hip Ratio“ (Quelle: Richtlinien der WHO 1998) [59]

Einteilung	Frauen [cm]	Männer [cm]
Taillenumfang		
• Normalgewicht	<80	<94
• Übergewicht	80-87,9	94-101,9
• Adipös	≥88	≥102
WHR		
• Normalgewicht	<0,8	<0,9
• Übergewicht	0,8-0,84	0,9-0,99
• Adipös	≥0,85	≥1,0

Es hat sich gezeigt, dass diese Einteilung in Risikogruppen für die asiatische Bevölkerung nicht zutreffend war. Daher ist im Jahr 2000 von der International Association for the Study of Obesity, der WHO und der International Obesity Task Force eine neue Einteilung für die asiatische Bevölkerung vorgenommen worden. Die Grenze zum Übergewicht liegt hier bei $>23 \text{ kg/m}^2$ und die für Adipositas bei $>25 \text{ kg/m}^2$ [8].

Ein weiteres einfach anzuwendendes indirektes Verfahren ist die Erhebung der Waist-to-Hip Ratio (WHR). Sie wird aus dem Quotient des Taillen- und Hüftumfanges errechnet. Dieses Verhältnis ist ein Maß für die Körperfettverteilung und ein besserer Prädiktor für die Entwicklung eines Diabetes Mellitus II und einer Koronaren Herzerkrankung bei Adipösen als der BMI [9]. Die Einteilung in normal-, übergewichtig und adipös ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Aus manchen Studien geht hervor, dass der Taillenumfang allein mehr Aussagekraft bezüglich des abdominalen Fettgewebes hat und damit noch aussagekräftiger für die zuvor genannten Erkrankungen ist [9]. Abdominelle Fettleibigkeit wurde bei einem Taillenumfang $>80 \text{ cm}$ für Frauen und $>94 \text{ cm}$ für Männer definiert.

Als letzte indirekte Methode ist die Bioimpedanzmessung zu erwähnen, bei der über die Messung des elektrischen Körperwiderstands der Fettgehalt kalkuliert wird.

Diese technische Art zur Ermittlung der Fettmasse ist noch nicht ausreichend in großen Studien evaluiert worden [10].

Radiologische Verfahren wie die Dual X-ray Absorption (DEXA) und die Computertomographie ermöglichen die direkte und genaue Ermittlung der Körperfettmasse. Sie erlauben ebenfalls die Unterscheidung zwischen der Zunahme des subkutanen oder viszeralen Fettgewebes, dessen Unterscheidung im Risiko für Morbidität und Mortalität diskutiert wird. DEXA und CT sind aber gleichzeitig aufwendiger, kostenintensiver und mit einer Strahlenbelastung verbunden und damit nicht für eine breite Anwendung geeignet [11].

1.1.3 Gesundheitliche Folgen

Der Zusammenhang zwischen einem erhöhten Körpergewicht und der dadurch bedingten erhöhten Sterblichkeit ist bereits Anfang des 20. Jahrhunderts festgestellt worden und bis heute in zahlreichen Studien nachgewiesen worden (American Cancer Society Study [12], Norwegian Population Study [13], Nurses' Health Trail [14], Harvard Alumni Study [15]). Unklar und strittig bleibt jedoch z.B. die Frage, in welchem Bereich das ideale Gewicht liegt und ob dieses nicht vom Alter, Geschlecht und Rasse abhängig ist. Fraglich ist weiterhin, in wie weit Nikotin-Abusus und vorbestehende Krankheiten bisherige Studien beeinflusst haben. In einer repräsentativen prospektiven Studie aus dem Jahr 1999 wurden diese Punkte anhand von Daten von 1,2 Millionen Amerikanern untersucht [16]. Sie ergab die geringste Sterblichkeitsrate für die Personen, die nie geraucht und keine Vorerkrankungen hatten und einen BMI von 23,5 - 24,9 kg/m² bei Männern und 22,0 - 23,4 kg/m² bei Frauen aufwiesen. Im Vergleich stieg das relative Risiko für die Mortalität bei einem BMI von >40 kg/m² auf das 2.68 fache für Männer und das 1.89 fache für Frauen. Bei afroamerikanischen Männern und Frauen stieg das relative Risiko bei gleich hohem BMI allerdings nur um das 1.35 bzw. 1.21 fache.

Jedoch nicht nur der Body-Mass-Index allein spielt eine Rolle für die Mortalität, sondern auch die Fettverteilung. So steigt die Mortalität und das Herzinfarktrisiko mit steigender Waist-to-Hip Ratio. Männer mit einem Wert >1 und Frauen mit einem Wert >0.81 gehen mit einem deutlich erhöhten Herzinfarkt-Risiko einher [17].

Das größte Risiko bei Übergewicht und Adipositas besteht in der Entwicklung einer Koronaren Herzerkrankung. Hervorgerufen wird diese abhängig von der Dauer und

Intensität der Adipositas durch die kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes Mellitus II, art. Hypertonus und Dyslipidämie.

Tab.3 Erhöhung des Mortalitätsrisikos nach BMI-Klassen (Quelle: Canada Fitness Survey) [61]

BMI-Wert (kg/m ²)	Mortalitätsrisiko erhöht um
25,0 bis 29,9	16%
30,0 bis 34,9	25%
größer als 35	296%

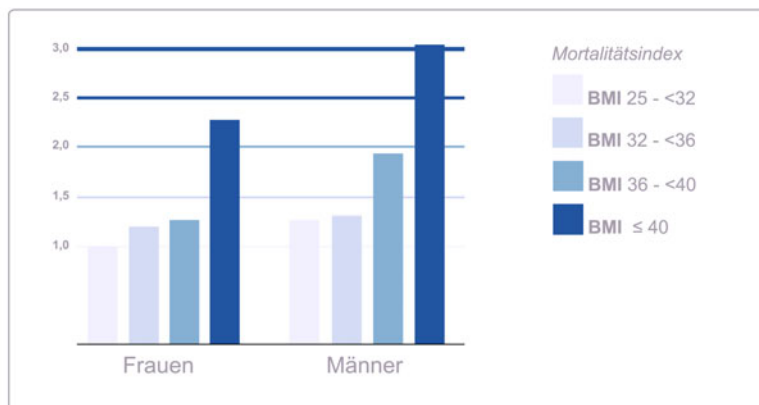


Abb.2 Standardisierter Mortalitätsindex in Abhängigkeit vom BMI (Quelle: Düsseldorf Obesity Mortality Study) [63]

Diese Risikofaktoren werden auch unter dem Begriff des Metabolischen Syndroms subsumiert. Dieses Syndrom bezeichnet eine Reihe von miteinander im Zusammenhang stehenden metabolischen Risikofaktoren, die für das Auftreten einer KHK oder eines Diabetes Mellitus II verantwortlich sein können [18]. Es besteht zur Zeit noch keine internationale einheitliche Definition des metabolischen Syndroms. Hierdurch ist ein Vergleich des Auftretens und der Behandlung deutlich erschwert. Für die klinische Praxis und die meisten epidemiologischen Studien wurden jedoch zumeist die Diagnosekriterien des National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment

Panell (ATPIII) angewendet. Drei der folgenden fünf Kriterien müssen über die Norm erhöht sein, um der Diagnose des Metabolischen Syndroms zu entsprechen: Taillenumfang, Triglyceride, HDL-C, Blutdruck und Nüchtern Blutzucker [19].

Das Risiko an einer durch das Metabolische Syndrom bedingten KHK zu erkranken, ist nach des Nurses' Health Study bei Frauen mit einem BMI $>29 \text{ kg/m}^2$ im Vergleich von Frauen mit einem BMI von 21 kg/m^2 um das 3.3 fache erhöht. Männer haben ebenfalls ein 3fach erhöhtes Risiko an einer KHK zu versterben, allerdings bereits ab einem BMI von $27,5 \text{ kg/m}^2$ [17].

Ein erhöhter BMI ist auch mit erhöhtem Krebsrisiko assoziiert: bei Männern sind erhöhte Raten von Kolorektalem Karzinom und Prostatakarzinom beobachtet worden, bei Frauen erhöhte Raten von Krebsarten des Reproduktiven Systems und der Gallenblase. Arthrose, Gallenblasenleiden, Fertilitätsstörungen und Störungen im psychosozialen Umfeld treten ebenfalls nachweislich bei steigenden BMI vermehrt auf [7].

Insgesamt ist die Lebenserwartung für adipöse Menschen deutlich herabgesetzt. So ist die durchschnittliche Lebenserwartung bei Vorliegen von Adipositas im 49. Lebensjahr um 7 Jahre reduziert [16].

1.2 Ursachen der Adipositas

Unter physiologischen Umständen besteht eine ziemlich genaue, größtenteils unbewusste Kontrolle über die aufgenommene Nahrungsmenge. Obwohl die Aufnahme pro Tag und Woche und auch die körperliche Aktivität stark variieren kann, bleiben unsere Energiespeicher, unser Körperfett, weitgehend konstant. Für die Gewichtsstabilität ist ein feiner Regelmechanismus verantwortlich, an dem unter anderem Hormone des Gastrointestinaltraktes und des Gehirns beteiligt sind. Es stellt sich die Frage, warum es trotz dieser Mechanismen zu so einem starken Fortschreiten von Adipositas in den letzten Jahrzehnten gekommen ist und inwieweit genetische und Umweltfaktoren hierbei eine Rolle spielen.

Die Tatsache, dass Adipositas familiär gehäuft auftritt, lässt vermuten, dass ihre Entstehung eine genetische Komponente hat. Für den Einfluss der Umwelt spricht hierbei, dass Familien meist in einem gemeinsamen sozialen Umfeld leben und es eine Häufung der Adipositas in den unteren sozialen Schichten gibt.

1.2.1 Einfluss der Genetik

Der genetische Einfluss auf die menschliche Fettmasse ist in den letzten Jahrzehnten vornehmlich in Zwillings-, und Adoptionsstudien untersucht worden.

Zwillingsstudien eignen sich für die Untersuchung der genetischen Komponente auf den BMI durch die 100% Übereinstimmung der Gene bei monozygoten bzw. 50% Übereinstimmung bei dizygoten Zwillingen. Hierdurch können die spezifischen Einflüsse genetischer und umweltbedingter Faktoren auf das Körpergewicht gut untersucht werden.

Diese Studien ergaben eine starke Vererbbarkeit von 40-70% mit einer Konkordanz von 0,7-0,9 für mono- und 0,35-0,45 für dizygoten Zwillinge [20].

Abhängig vom Alter der Untersuchung zeigten sich differente Übereinstimmungen der genetischen Komponente. So ergaben die bei kaukasischen Zwillingspaaren im Alter zwischen 11 und 17 Jahren eine hohe Übereinstimmung, welche mit zunehmendem Alter abnahm [21, 22]. Diese Beobachtungen indizieren die Möglichkeit, dass unterschiedliche genetische Faktoren zu bestimmten Zeitpunkten im Leben ihre Auswirkungen zeigen.

In weitergehenden Zwillingsstudien wurden Kinder untersucht, die durch Adoption in verschiedenen Elternhäusern aufwuchsen und gaben damit Hinweise für die hereditäre Komponente. Diese Arbeit belegt, dass der BMI der adoptierten Kinder sehr eng mit dem ihrer biologischen Eltern, jedoch nicht mit dem der Adoptiveltern korreliert. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte, dass auch Geschwister, die nach Adoption in verschiedenen Elternhäusern aufwuchsen eine sehr enge Korrelation des BMI aufwiesen [23].

Zwillingsstudien zeigen somit, dass genetische Faktoren eine Rolle bei der Ausprägung des Körpergewichtes spielen. Es ist jedoch fraglich, inwieweit sie auf andere Populationen übertragbar ist, da Adoptions- und Familienstudien eine weniger starke Übereinkunft zeigen [24].

1.2.2 Einfluss der Umwelt

Trotz der wichtigen Erkenntnis des Zusammenhangs von genetischen Einflüssen und Adipositas stellt sich die Frage, warum es ausgerechnet in den letzten drei Jahrzehnten zu solch einem starken Anstieg der Fettleibigkeit gekommen ist, obwohl sich die Genzusammensetzung des Menschen doch nicht verändert hat. Diese Beobachtung wird mit der Annahme erklärt, dass bei der ursprünglichen Lebensweise Nahrungsknappheit bestand. Gleichzeitig war die Nahrungsbeschaffung mit einem

hohen körperlichen Aufwand verbunden. Hierdurch ist eine genetische Adaptation zu einem „Thrifty genotype“ (sparsamer Genotyp) erfolgt, der eine niedrige Stoffwechselrate insbesondere in Hungerphasen fördert [25]. Ein Protein, das zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme, einem verminderten Energieumsatz bzw. zur Energiespeicherung führte, war damit von Vorteil. Ein Protein, das rasch ein starkes Sättigungsgefühl hervorruft, war von keiner Relevanz. Was sich somit ursprünglich als Selektionsvorteil darstellte, erweist sich heute bei einem Überangebot von Nahrung und einer insgesamt verminderten körperlichen Aktivität des täglichen Lebens als Nachteil für die Gesundheit und Lebensdauer. Durch die adiposinogene oder auch „westliche“ Lebensweise kommt es somit bei Personen, die durch den ursprünglichen Selektionsvorteil genetisch prädisponiert für Adipositas sind, zu einer starken Gewichtszunahme. Individuen, die genetisch bedingt resistent gegen Adipositas sind, werden allerdings auch bei adiposigener Lebensweise nur leicht übergewichtig werden [26]. Diese Hypothese ist ebenfalls in Zwillingsstudien untersucht worden. Bei einer zusätzlichen Kalorienzufuhr von 1000 kcal/Tag zeigten sich starke Unterschiede in der Gewichtszunahme zwischen den unterschiedlichen Zwillingspaaren, jedoch nicht zwischen den Geschwistern [27]. Gleichzeitig führt die Annahme der genetischen Prädisposition zu der Erkenntnis, dass für viele Menschen Adipositas eine unumgängliche Folge und weniger eine Konsequenz des mangelnden Willens ist.

1.2.3 Monogenetische Varianten

In den letzten Jahren sind zunächst in Tieren eine Reihe von einzelnen genetischen Mutationen aufgefunden gemacht worden, die jede für sich zu Adipositas führen. Diese Mutationen wurden später dann auch beim Menschen verifiziert. Das Fehlen oder die Überexpression eines dieser Genprodukte führt bei unveränderten Umweltbedingungen schon frühzeitig zu Adipositas. Zu diesen monogenetischen Veränderungen gehören die in der Tabelle 4 aufgeführten Gene.

Diese Mutationen folgen dem Mendelschen Erbgang und sind schnell in homologen Genen oder Signalwegen des Menschen aufgefunden gemacht worden. Bei diesen Mutationen steht die Entwicklung von Adipositas im Vordergrund, auch wenn sie mit charakteristischen klinischen, neuroendokrinen und biochemischen Merkmalen verbunden sind. Die Fettleibigkeit entwickelt sich zumeist im frühen Kindesalter. Auch wenn diese monogenetischen Veränderungen nicht das allgemeine Phänomen erklären können, so ist ihr Anteil bei adipösen Personen doch größer als zunächst angenommen.

Beispielsweise ist der MRC4-Rezeptor, der in seiner aktivierten Form zu einer zentralen Appetithemmung führt, bei 1-6% der schwer adipösen Menschen (BMI >40 kg/m²) inaktiviert [28].

Tab.4 Monogenetische Adipositasformen, Gene und Mutationen
(Quelle: nach Aberle J 2009) [62]

Chromosom	Gen	Genprodukt
1p35-31	LEPR	Leptin Rezeptor
4q21	CPE	Caboxypeptidase E
7q31.3	LEP	Lepin
20q11.2	ASIP	Agouti signaling Protein
18q21.3	MC4-R	Melanocortin4-Rezeptor

In der Gruppe der Adipösen mit Essstörungen in Form von Essanfällen („binge eating“) fanden sich genetische Veränderungen sogar in allen untersuchten Fällen [29].

1.2.4 Syndromale Adipositas

Monogenetische Veränderungen können auch als Teil von Syndromen auftreten. Bei diesen komplexen Syndromen ist Adipositas meist nur eines von mehreren körperlichen Symptomen und organspezifischen Entwicklungsstörungen. Meist handelt es sich bei dem defekten Genprodukt um ein intrazelluläres Protein, dessen Funktion aber nicht bekannt ist. In diesen Fällen bleiben die funktionellen Verbindungen des defekten Proteins mit der daraus resultierenden Störung der Energiebilanz unklar.

Von den 27 mit Adipositas einhergehenden Syndromen sind einige der zugrunde liegenden genetischen Veränderungen identifiziert worden und in der folgenden Tabelle (Tab. 5) aufgeführt.

Tab.5 Adipositas Syndrome (Quelle: O'Rahilly S et al 2003) [30]

Pleiotropic obesity syndromes				
Syndrome				
Autosomal dominant Prader-Willi syndrome (PWS)	Hypotonia, mental retardation, short stature, and hypogonadism	15q11.2-q12	Unknown	60-64
Albright hereditary osteodystrophy (AHO)	Short stature, skeletal defects, and impaired olfaction	20q13.2	GNAS1	65,66
Fragile X syndrome	Mental retardation, macro-orchidism, and high-pitched jocular speech	Xq27.3	FMR1	67
Ulnar-mammary syndrome	Ulnar defects, delayed puberty, and hypoplastic nipples	12q24.1	TBX3	68
Autosomal recessive Bardet-Biedl syndrome	Mental retardation, dysphormic extremities, retinal dystrophy or pigmentary retinopathy, hypogonadism, and structural abnormalities of the kidney or functional renal impairment	11q13 (BBS1)	BBS1	69
		16q21 (BBS2)	BBS2	70
		3p13 (BBS3)	Unknown	
		15q22 (BBS4)	BBS4	71
		2q31 (BBS5)	Unknown	
Alstrom syndrome	Retinal dystrophy, neurosensory deafness and diabetes	20p12 (BBS6)	BBS6 (MKKS)	72-74
Cohen syndrome	Prominent central incisors, ophthalmopathy, and microcephaly	2p13	ALMS1	75,76
X-linked		8q22	Unknown	77
Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome	Mental retardation, hypogonadism, large ears	Xq26	PHF6	75,76
Mehmo syndrome	Mental retardation, epilepsy, hypogonadism, and microcephaly	Xp22.13	Unknown no.	77, 79,80
Simpson-Golabi-Behmel, type 2	Craniofacial defects, and skeletal and visceral abnormalities	Xp22	Unknown	81
Wilson-Turner syndrome	Mental retardation, tapering fingers, and gynecomastia	Xp21.2	Unknown	82

1.2.5 Polygenetische Adipositas

Trotz der Identifikation einzelner in Adipositas resultierenden genetischer Mutationen ist die Ursache in der Mehrzahl der von Adipositas betroffenen Patienten in dem Zusammenspiel mehrerer einzelner miteinander interagierenden Mutationen/Varianten zu sehen. Diese polygene Fettleibigkeit ist daher insgesamt schwerer zu identifizieren und in der Ursache zu präzisieren, da eine Vielzahl von Mutationen/Varianten im einzelnen nachzuweisen wäre.

1.3 Die Regulation der Nahrungsaufnahme

1.3.1 Afferente und efferente Signale

Die Reihe der Faktoren, deren genetische Veränderung zu einer Veränderung des BMI führen können, ist aufgrund der Komplexität der Systeme für Nahrungsaufnahme und Sättigung groß. Die Komplexität des Systems ergibt sich aus dem Anspruch, trotz unterschiedlich großer Energieaufnahme und –abgabe an einem Tag möglichst langfristig eine Homöostase der Energiespeicher zu erreichen. Um diese Homöostase

zu erreichen gibt es afferente Signale, die über den Ernährungszustand Auskunft geben und efferente, die auf die entsprechende Situation Rückmeldung geben.

Bei den afferenten Signalen kann man kurzfristige und langfristige unterscheiden. Die kurzfristigen Signale aus Magen und Duodenum signalisieren den Beginn oder Beendigung einer Mahlzeit durch die Ausschüttung von Peptiden (PYY, GLP-1, CCK, Ghrelin) oder sind ausgelöst durch mechanische Reizung des Magens [31, 32]. Die langfristigen aus dem Fettgewebe (Leptin) und den β -Zellen des Pankreas (Insulin) geben Auskunft über den langfristigen Energiestatus des Körpers [33, 34]. Beide überschneiden sich in ihrer Funktion und haben als gemeinsames Ziel den Hypothalamus als regulatorisches Zentrum. Er sammelt die Informationen und bestimmt die Art und Größe der efferenten Antwort. Die kann sich in Hunger, Nahrungsaufnahme oder Energieausgabe äußern, außerdem in der Sekretion bestimmter Hormone wie Insulin und Glucocorticoiden.

Da Hunger immer eine akutere Bedrohung für das Überleben darstellt, ist das System evolutionär bedingt jedoch sehr viel robuster zur Sicherung der Energiereserven als auf Verhinderung der Adipositas ausgerichtet [35].

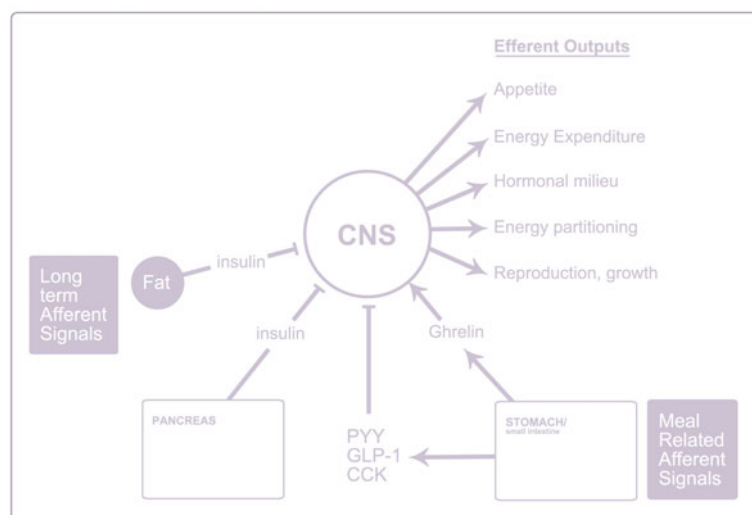


Abb. 3 Components of the energy balance system (Quelle: Flier JS 2004) [35]

1.3.2 Schaltzentrale Hypothalamus

Der Hypothalamus ist der Ort, an dem die peripheren Signale der Appetitregulierung integriert und mittels einer Vielzahl von Neuropeptiden und neuronaler Schaltkreise weitergeleitet bzw. verarbeitet werden. Der sogenannte Nukleus Arcuatus (ARC), ein Kerngebiet des Hypothalamus, ist hierbei das zentrale Zielorgan der peripheren Signale.

1.3.3 Anorectic and Orexigenic Peptides

Es können zwei Arten von Neuronen innerhalb des ARC unterschieden werden. Die einen inhibieren die weitere Nahrungsaufnahme durch die Ausschüttung der Neuropeptide Pro-opiomelanocortin (POMC) und Cocaine- and amphetamine- regulated transcript (CART). Diese Art von Neuronen wird als anorexigen bezeichnet und durch die Bindung von Leptin stimuliert. Die anderen regen die Nahrungsaufnahme durch Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related peptide (AgRP) an und werden durch Leptin inhibiert [36]. Sie werden als orexigene Neuronen bezeichnet. Bis auf NPY binden alle Neuropeptide zur weiteren Signaltransduktion an den MC4-Rezeptor im dorsomedialen hypothalamischen Kern. MSH, das durch proteolytischer Spaltung aus POMC entsteht, und CART wirken stimulierend auf den MC4-Rezeptor. Sie hemmen somit die Nahrungsaufnahme und fördern den Energieverbrauch. AgRP dagegen wirkt hemmend

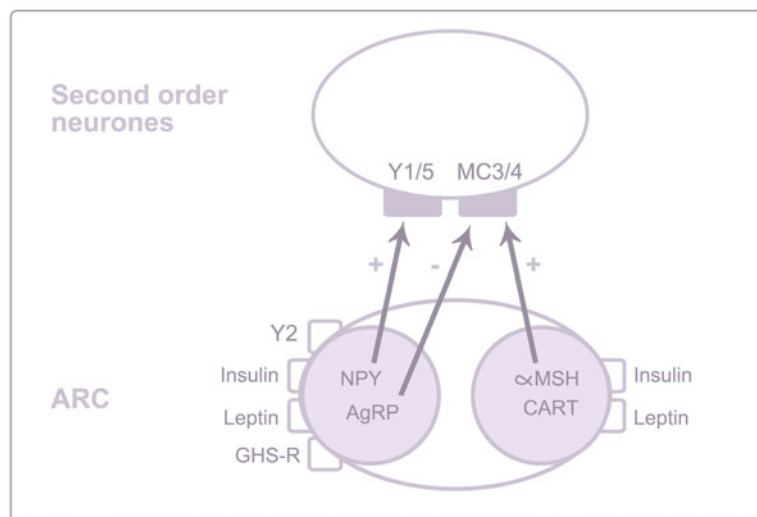


Abb.4 The ARC and the control of appetite (Quelle: Wynne K et al 2005) [58]

auf den MRC4-Rezeptor und wirkt hierdurch gegensätzlich. Wie AgRP stimuliert auch NPY die Nahrungsaufnahme und hemmt den Energieverbrauch, jedoch entfaltet er seine Funktion durch Bindung an einen der zahlreichen NPY Rezeptoren im Paraventriculären Hypothalamischen Kern.

1.4 Die Rolle von CART in der Nahrungsaufnahme

1.4.1 CART als anorektisches Peptid

Cocaine- and amphetamine- regulated transcript (CART) ist ein anorektisches Peptid, das in weiten Bereichen des Hypothalamus exprimiert wird und in die Kontrolle der Nahrungsaufnahme involviert ist [37]. CART wurde 1995 entdeckt, nachdem seine mRNA im Hirn von Ratten nach Injektion von cocaine und amphetamin vermehrt nachgewiesen wurde.

Das humane CART Gen ist 2.5 kb groß und wurde auf Chromosome 5q13-q14 lokalisiert [38]. Es umfasst eine Promoterregion von 340 Nukleotiden, zwei Introns und drei Exons. Aus der Transkription des Gens resultieren bei der Ratte durch alternatives Spleißen zwei unterschiedlich große Propetide, proCART 1-89 und proCART 1-102. Beim Menschen konnte bisher jedoch nur das kürzere pro-CART 1-89 identifiziert werden. Durch anschließende Prozessierung durch Propeptidconvertasen entstehen die zwei aktiven Peptide CART 42-89 und CART 49-89 [39].

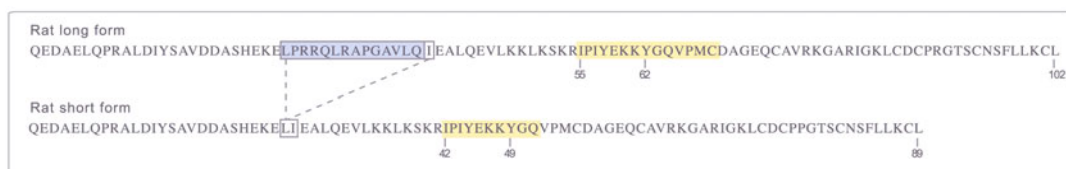


Abb.5 ProCART amino-acid sequences (Quelle: Rogge G et al 2008) [40]

Die Art der Signaltransduktion dieser CART-Peptide ist in mehreren Studien untersucht worden. Obwohl der direkte Nachweis eines CART-Rezeptors bisher nicht erbracht werden konnte, wurde durch die Beobachtung, dass aktive CART-Peptide in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnten, die Annahme erhärtet, dass ein solcher Rezeptor existiert. Die Ergebnisse mehrerer Studien lassen auf einen G-Protein gekoppelten Signalweg schließen, der mindestens drei verschiedene Mechanismen zur Folge hat. Sie werden in Abbildung 6 erläutert.

Nach der Entdeckung der CART- Peptide kam man bald zu der Annahme, dass diese in die Regulation der Nahrungsaufnahme involviert sind, da sie in Bereichen des Gehirns nachgewiesen wurden, die hierbei eine Rolle spielen. Hierzu gehören der Nucleus Arcuatus (ARC), in dem CART zusammen mit POMC exprimiert wird [41, 42]. Neuronen des lateralen Hypothalamus (LHA) und der Paraventriculäre Nucleus (PVN), der Informationen des ARC und anderer Nuclei verarbeitet und die Energieaufnahme und -abgabe reguliert, exprimieren CART ebenfalls [43]. Darüberhinaus wurde CART peripher in den D- Zellen des Pankreas und in efferenten vagalen Neuronen, die mit Cholecystokinin interagieren, nachgewiesen [36].

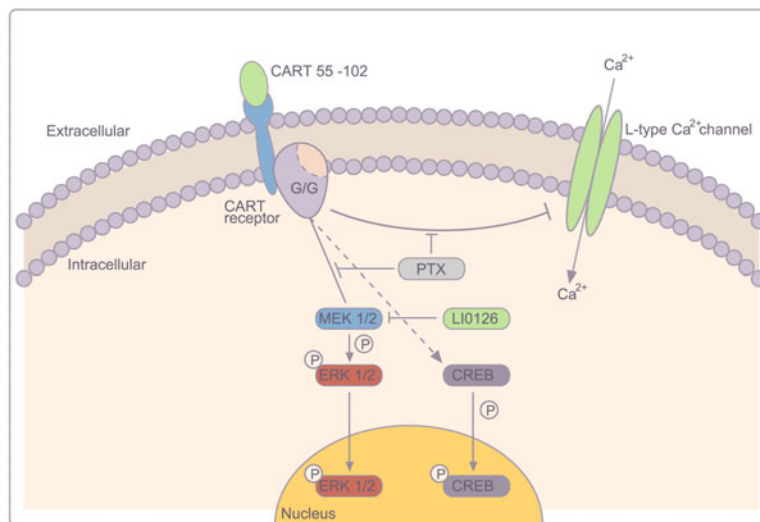


Abb.6 Proposed CART receptor signalling (Quelle: Rogge et al 2008) [40]

1.4.2 Genetik von CART

Leptin reguliert die CART mRNA Expression. Bei Störung des Leptin- Signalweges bei Leptin-knock-out ob/ob Mäusen oder fa/fa Ratten kommt es zur verminderten Expression. Bei peripherer Leptin- Injektion hingegen zu vermehrter CART Expression. Zur Stimulation von CART-mRNA kam es erwartungsgemäß ebenfalls bei peripherer Gabe von Leptin bei Leptin defezienten ob/ob Mäusen [42]. Besonders im Rahmen einer fettreichen Ernährung wurde eine verstärkte Interaktion zwischen Leptin und CART

festgestellt. Mäusen, denen im Experiment Nahrung vorenthalten wurde, zeigten eine deutliche Reduktion von CART mRNA innerhalb des ARC [44].

Direkte intracerebroventriculäre (icv) Injektion von CART senkt bei Ratten die weitere Nahrungsaufnahme und antagonisiert das durch NPY hervorgerufene Hungergefühl. Bei icv- Gabe von Antikörpern, die gegen CART gerichtet sind, kommt es zur verstärkten Nahrungsaufnahme [42, 45]. Diese Beobachtungen sind in mehreren Studien bestätigt worden [37, 46-48].

CART-knock-out Mäuse zeigten eine deutliche Zunahme von Nahrungsaufnahme, Körpergewicht und Fettmasse unter der Voraussetzung, dass diese einer fettreichen Diät ausgesetzt waren [49].

Die an Menschen bisher durchgeführten Studien zeigen eine Vielzahl von Small nuclear polymorphismen (SNPs) innerhalb des CART Genes, die ebenfalls für einen anorektischen Effekt von CART sprechen.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Varianten im CART und der Entwicklung von Adipositas konnte bisher jedoch noch nicht zweifelsfrei bewiesen werden.

1.5 Bedeutung von SNPs als genetische Variation

1.5.1 Common disease-common variant model

Die Vererbung von komplexen Merkmalen wie Adipositas folgt nicht dem Mendelschen Erbgang, sondern resultiert aus dem kumulativen Effekt von Mutationen in verschiedenen Genen. Sie ist somit polygenetisch bedingt. Die Variation von Merkmalen liegt hierbei dem komplexen Zusammenspiel mehrerer small nuclear polymorphismen (SNPs) zugrunde. Jeder einzelne der SNPs zeigt nur einen geringen Effekt und entwickelt seine Auswirkung erst in Kombination mehrerer SNPs. Diese Betrachtungsweise der Vererbung wird als „Common disease-common variant model“ bezeichnet [50]. Diese Art der Merkmalsvererbung wurde bisher in sogenannten Assoziationsstudien untersucht. Die Untersuchung häufig vorkommender SNPs in einer Patientenpopulation und der anschließende Vergleich mit einer Kontrollgruppe in Assoziationsstudien, zeigte oft richtige biologische Zusammenhänge auf und konnte einen Teil der genetischen Variation erklären. Diese Hypothese der genetischen Variationen ist jedoch nur dann nachvollziehbar, wenn nur wenige Gene miteinbezogen

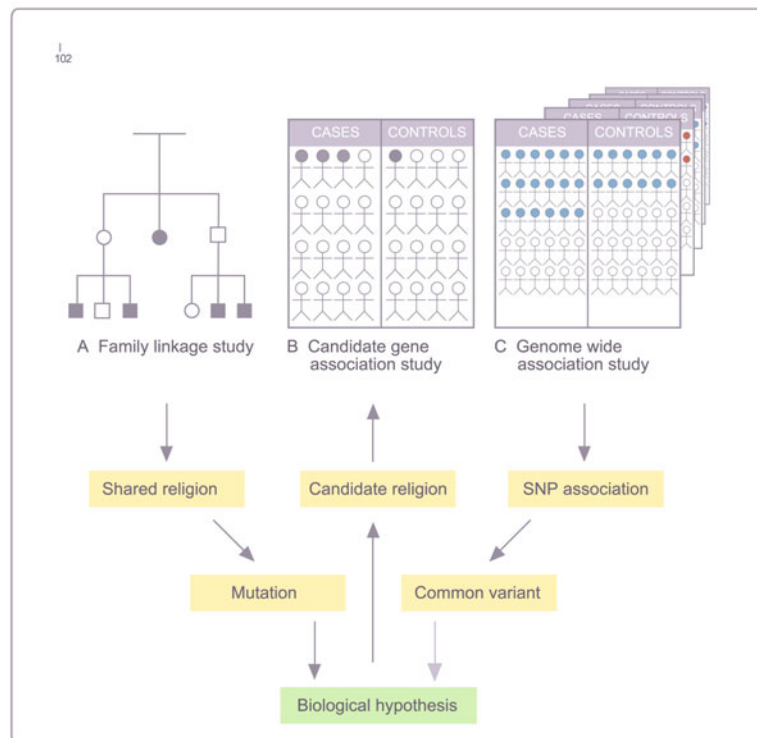


Abb.7 Three ways of identifying disease- related genes (Quelle: Mullen SA et al 2009) [60]

sind. Müssten jedoch sehr viele Gene mit SNPs betrachtet werden, um eine genetische Variation zu erklären, da der Effekt des einzelnen SNP zu gering wäre, würde man sich in der Betrachtung der Vielzahl der Gene verlieren. Es wären zum Beispiel ca. 93 000 SNPs nötig, um 80% der Variationen des Merkmals Größe in der Bevölkerung zu erklären. Ähnliche Zahlen ergeben sich für das komplexe Merkmal des Diabetes. Zudem geht das „Common disease-common variant model“ dabei davon aus, dass die einzelnen SNPs-Effekte sich addieren lassen [51].

1.5.2 Common-disease-multiple rare variant Hypothese

Initiale Assoziationsstudien sind somit wichtig, da sie einen Teil der genetischen Variation der Merkmale erklären und biologische Mechanismen erkennen. Darüber hinaus ist die wiederholte Untersuchung eines Merkmals in immer größeren Studien wenig sinnvoll, da zumeist keine weiteren „common SNPs“ entdeckt werden und wenn doch, diese in ihrer Auswirkung

bedeutungslos sind. Wiederholte Assoziationsstudien zu einem Merkmal werden nicht zur Klärung des verbleibenden großen und ungeklärten genetischen Anteils beitragen.

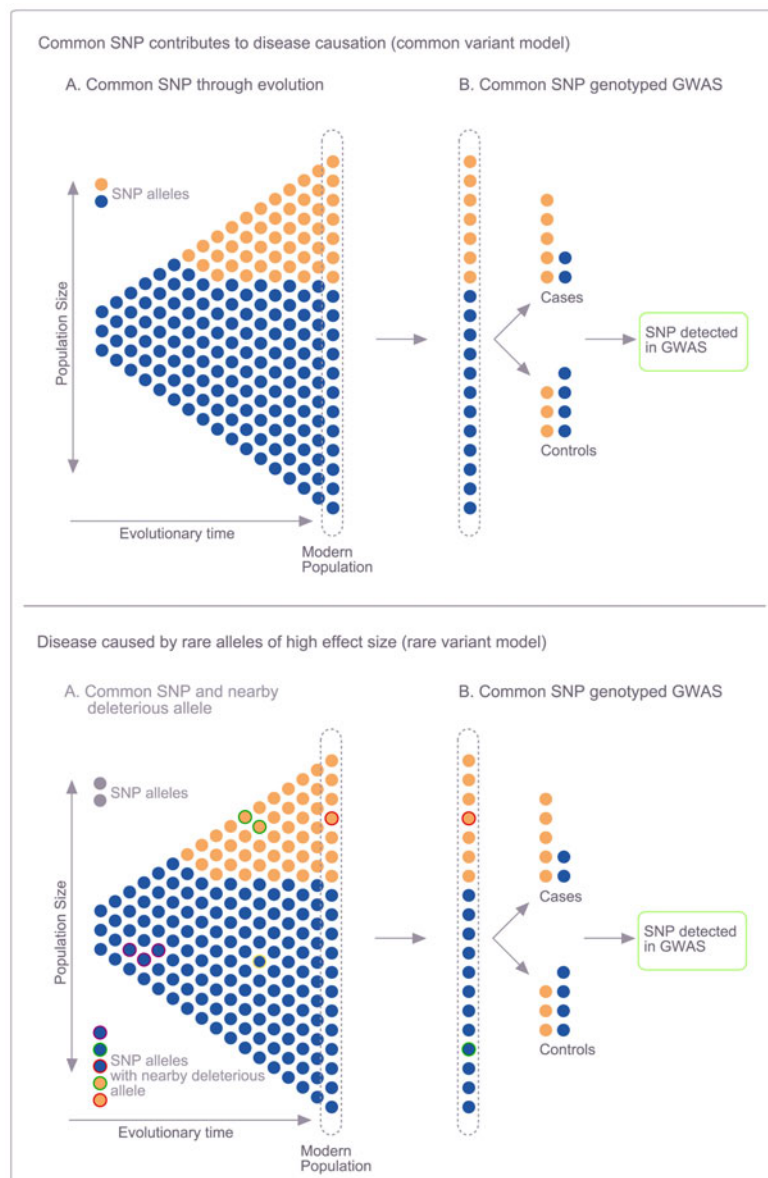


Abb.8 Schematic illustration of a genome-wide association study in diseases due to common or rare variants (Quelle: Mullen SA et al 2009) [60]

Aus diesen Beobachtungen hat sich die alternative Hypothese entwickelt, dass der große Teil der genetischen Variation nicht in der Vielzahl der „common SNPs“ zu finden ist, sondern vielmehr durch die Gesamtzahl vieler seltener Varianten zu erklären ist. Diese Hypothese wird als „common-disease-multiple rare variant“ (CDMRV) bezeichnet [52]. Die seltenen Varianten zeigen mit einem Relativen Risiko (RR) von 5-10 einen wesentlich größeren Effekt (effect size) auf als die Häufigen Varianten mit einem RR von 1-2.

Sie unterliegen damit gleichzeitig einem größeren Selektionsdruck und sind damit evtl. schwerer ausfindig zu machen als die häufigen Varianten, die in ihrem Effekt neutral und damit einem geringen Selektionsdruck ausgesetzt sind. Sie sind somit um ein vielfaches häufiger anzufinden als seltene Varianten (rare variants), zeigen jedoch wie gesagt nur einen geringen Effekt. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob einige der häufigen SNPs in Assoziationsstudien in Verbindung mit Merkmalen gebracht werden, für die in Wirklichkeit seltene SNPs verantwortlich sind.

Die seltenen Allele könnten hierbei wiederholt gehäuft in unmittelbarer Nähe der häufigen SNPs auftreten und somit für common SNPs gehalten werden. Somit wären viele Informationen bereits in den gewonnenen Daten enthalten und müssten reevaluiert werden. Die common variants würden dann als genetische Marker funktionieren, in deren unmittelbarer Nähe seltene Allele zu finden wären. Es wird dann die Gesamtzahl der auftretenden seltenen Mutationen gemessen und nicht das Aufkommen der einzelnen Mutationen.

1.6 Fragestellung:

Die Untersuchung des CART Gens in vorausgehenden Assoziationsstudien hat bereits eine Vielzahl von common SNPs identifiziert, die jedoch bisher nicht in direkten Zusammenhang mit Adipositas gebracht werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit soll nun der „common- disease- multiple rare variant Hypothese“ folgend erneut das CART Gen, insbesondere der Promoter Bereich des CART Gens auf seltene Varianten hin untersucht werden. Eine seltene Variante mit einem hohen Effekt könnte zu einem veränderten Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren im Promoterbereich führen und damit zum verminderten Ablesen oder dem Ausbleiben des Ablesens des CART Gens führen. Die verminderte CART-Expression könnte wiederum in der Folge das Risiko für Adipositas erhöhen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Materialien wurden in p. A. Qualität verwendet.

2.1.1 PCR

- Vorwärts - Primer (5'-TTTGAGACAGAGCCTCGC- 3')
- Rückwärts - Primer (5' - TCCTCTCCCATCCCTCAC- 3')
- Taq-DNA -Polymerase (5 Unit/ μ l)
- dNTP 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu gleichen Anteilen) (Quiagen)
- 10x Reaktionspuffer (1,0 ml Tris-HCl, 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, pH 8,3) (Roche, Mannheim)
- H₂O dest.
- Mineralöl (Sigma)
- Reaktionsgefäße 0,5 ml (Sarstedt)

2.1.2 Restriktionsverdau

- Restriktionsendonuklease Hae III (10 000 Units/ml) (New England BioLabs, Inc.)
- 10x NEB Puffer

2.1.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

- 40% Acrylamid/ N-N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1) (Roth)
- 1% Ammoniumperoxodisulfat (Merck)
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)
- 10 % Tris Borat EDTA (TBE)- Puffer
- Bromphenolblau (Merck)
- Glycerol (Merck, Darmstadt)
- 1kb DNA-Leiter (1 μ l/ng) (Boehringer)
- Glasplatten (Desaga)
- Elektrophoresekammer (Biometra)

2.1.4 Ethidiumbromidfärbung

- 10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)
- 100 ml 10% Tris Borat EDTA (TBE)- Puffer

2.1.5 PCR Aufreinigung

- QIAquick, PCR Purifikation Kit (250) (Qiagene)

2.1.6 Sequenz-Reaktion

- Vorwärts- Primer (5'-TTTGAGACAGAGCCTCGC- 3')
- 10% DMSO
- H₂O_{dest.}
- Pre-mix

2.1.7 Ethanolfällung

- Ethanol (100%) (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (70%) (Merck, Darmstadt)
- 3 M Na-Acetat, pH 4,6

2.1.8 Silberfärbung

- 10% Silbernitrat (Merck)
- 10% Natriumcarbonat (Merck)
- 10% Essigsäure (Merck)
- 5% Essigsäure (Merck)
- H₂O_{dest.}
- Fixierlösung (10 %Essigsäure, 30 %Methanol, H₂O_{dest.}, Anteile 1:3:6)

2.1.9 SSCP Gelelektrophorese

- 40% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (Appligene)
- 10% Glycerol
- 10% Ammoniumpersulfat
- TEMED (Serva)
- 10% TBE
- SSCP Mix: 3ml H₂O dest., 1ml 10% TBE, 5ml 7M Urea (Merck), Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)

2.1.10 Geltrocknung

- Promega Kit

2.1.11 Technische Geräte

- Trio- Thermoblock (Biometra)
- Netzgerät (Biometra)
- Ika-Vibrax-VXR (Elektronika)
- Certomat (Braun)
- Inkubator (Heraeus)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)
- UV-Transluminator (Biometra)

- Sequenzierungsgerät: 310 Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Prinzip:

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die millionenfache Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz in vitro. Als Ausgangsmaterial genügen bereits kleinste Mengen der genomischen DNA oder cDNA.

Die Amplifikation der DNA mittels PCR verläuft ähnlich wie die natürliche Replikation.

Der PCR Prozess besteht aus 15-50 Zyklen, die in einem elektronischen PCR-Gerät, dem Thermozykler, durchgeführt werden. Jeder Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten: der Trennung der DNA- Doppelhelix, der Primerhybridisierung und DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase.

Zunächst erfolgt in der Reaktionskette die thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNA-Doppelhelix bei 95°. Nach der Trennung der beiden Stränge wird die Temperatur auf 60° gesenkt, um die Primerhybridisierung (primer annealing) der sequenzspezifischen Primer an die komplementären Nukleotidequenzen der einzelsträngigen DNA zu ermöglichen. Die Primer sind synthetische Oligonukleotide aus ca. 15-30 Nukleotiden. Die erneute Temperaturerhöhung auf 72° ermöglicht die DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase. Sie beginnt an der 3'-OH Gruppen des angelagerten Primers mit der Anheftung von Desoxynukleotiden und folgt dann dem DNA- Strang in 5' – 3' Richtung. Die Elongation erfolgt komplementär zu der jeweiligen DNA-Matrize. Durch anschließende Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 95° kommt es wieder zur Trennung des neu synthetisierten DNA-Doppelstranges.

Durchführung:

Die folgenden Schritte erfolgten bis zur Zugabe der Patienten-DNA unter einer sterilen Werkbank (Clean bench), um eine Kontamination des PCR-Ansatzes mit fremder DNA zu vermeiden. Zunächst erfolgte die Erstellung eines Master Mix für 20 Reaktionsansätze, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 31,8 µl H₂O_{dest.}
- 4 µl 10 x Reaktionspuffer
- 0,8 µl dNTP
- 0,6 µl Vorwärtsprimer
- 0,6 µl Rückwärtsprimer
- 0,2 µl Taq Polymerase

Je 19 µl des Premixes wurden in 19 Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von jeweils 1 µl der bei 4° gelagerten genomischen DNA in 18 Reaktionsgefäße. In das 19te Reaktionsgefäß wurde als Negativkontrolle für mögliche Verunreinigung 1 µl autoklaviertes H₂O zugegeben. Vor der Platzierung im PCR-Gerät wurden alle Proben mit einem Tropfen Mineralöl beschichtet, um eine Kondensation und Temperaturverzüge zu vermeiden.

Die Programmierung des Thermozyklers war wie folgt:

1 Zyklus	Denaturierung:	95°/5 min.
	Annealing:	65°/1 min.
	Elongation:	72°/1 min.
33 Zyklen	Denaturierung:	95°/1 min.
	Annealing:	65°/1 min.
	Elongation:	72°/1 min.
1 Zyklus	Denaturierung:	95°/1 min.
	Annealing:	65°/1 min.
	Elongation:	72°/10 min.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die amplifizierte DNA im Kühlraum bei 4° gelagert.

2.2.2 Polyacrylamidgel

Prinzip:

Zur Bestätigung einer erfolgreich durchgeführten DNA Vervielfältigung der 19 Proben erfolgte der Nachweis mittels eines Polyacrylamidgels. Diese sind einfach in der Herstellung, chemisch inert und in der Lage, DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 1000 Basenpaaren aufzutrennen.

Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandert DNA in Trägermedien im elektrischen Feld, wobei die Geschwindigkeit einem charakteristischen Verhältnis von Ladung zu Masse bzw. Molekülgröße folgt. Kleinere Moleküle werden weniger stark zurückgehalten und wandern weiter im Gel als große Moleküle.

Die Porengröße und somit der Siebeffekt des Polyacrylamidgels wird durch das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt, sowie durch die Acrylamidkonzentration in der Gellösung.

Die Polymerisation des dreidimensionalen Netzes des Gels entsteht durch die Quervernetzung von Methylenbisacrylamid mit dem monomeren Acrylamid. Diese Reaktion wird durch TEMED und AMP initiiert und katalysiert.

Durchführung:

Die Polyacrylamid-Gele in der Größe von 94x74x0,3 mm wurden in vertikalen Gießkassetten hergestellt. Diese setzen sich aus zwei Glasplatten zusammen, zwischen die ein Abstandhalter in Form eines U-förmigen Gummibandes gelegt wird. Die Platten und der Spacer werden durch Klammern aneinandergespresst. Für die Herstellung eines Gels wurden folgende Reagenzien in einem Becherglas zusammengepeppt und durch anschließendes Schwenken miteinander vermischt:

- 6500 µl H₂O_{dest.}
- 1000 µl 10x TBE-Puffer
- 2500 µl Acrylamid 40%
- 100 µl Ammoniumpersulfat 10%
- 30 µl TEMED

Diese Lösung wurde luftfrei in den Zwischenraum der vorbereiteten Glaskassette gegossen und eine Schablone in Form eines Kammes eingesetzt. Mit Beendigung der Polymerisation des Gels wurde die Schablone entfernt und die entstandenen Probetaschen mit 1x TBE gespült, um das Verbleiben von Gelresten in ihnen zu vermeiden. 19 der 20 Kammern wurden anschließend mit je 5 µl PCR-Produkt beladen. Die 5 µl wurde zuvor mit 2 µl Loading-Buffer (1ml LB: 100µl 10xTBE, 400µl Glycerol, 500µl H₂O_{dest.}) versetzt, um die Diffusion der aufgetragenen DNA aus den Probetaschen zu verhindern. In die 20te Tasche wurde als Größenstandard ein 1kb DNA-Leiter aufgetragen. Dies ermöglicht die anschließende Größenbestimmung und Zuordnung der Restriktionsfragmente, sowie die Reihenfolge der aufgetragenen Proben.

Nach Entfernung des Gummibandes wurden die Glasplatten mit dem Gel in eine mit Pufferlösung (1x TBE) gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt. Bei Raumtemperatur fand die anschließende Auftrennung bei 30 mA für ca. 20 min statt.

2.2.3 Anfärbung von Nucleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid

Prinzip:

Ethidiumbromid (3,8 Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium-bromid) ist eine fluoreszierende, DNA-bindende Substanz. Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA. Die Sequenz der Basen ist dabei nicht von Bedeutung. Durch die Interkalation ändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid; die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht wird erhöht. Der

Ethidiumbromid-Nucleinsäure-Komplex wird nach Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 300 nm fluoreszierend sichtbar. Durch die hohe Empfindlichkeit der Methode lässt sich bereits DNA mit 10 ng Nucleinsäure pro Bande nachweisen.

Durchführung:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer vorsichtig entfernt und für ca. 10 min in einem Ethidiumbromidfärbebad (100 ml 1xTBE, 5 µl Ethidiumbromidstammlösung) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel auf einen UV-Transluminator platziert. Die Bestrahlung mit einer Wellenlänge im Bereich 254-300 nm machte die Banden auf dem Gel fluoreszierend sichtbar. Die Gele wurden mit einer Sofortbildkamera bei einer Beleuchtungszeit von 3 sec. für die Dokumentation fotografiert.

2.2.4 Restriktionsverdau des PCR-Produktes

Prinzip:

Um die bei der PCR entstandenen DNA-Stränge in kürzere Einheiten zu teilen, wurde das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen geschnitten. Dieser Schritt ist für die späteren Analyseschritte der DNA notwendig.

Restriktionsenzyme sind prokaryotische Enzyme, die spezifische Sequenzen aus vier bis acht Basenpaaren auf der DNA-Doppelhelix erkennen und die Phosphodiesterbrücken der Nukleinsäuren an Stellen mit Rotationssymmetrie, den sogenannten Palindromen schneiden. Im Bereich der Palindrome ist aufgrund der zweifachen Symmetrieachse der DNA die Basenfolge der Einzelstränge in 5' – 3' Richtung auf beiden Strängen identisch.

Mittels Gelelektrophorese können die beim Restriktionsverdau entstehenden DNA-Fragmente aufgetrennt werden.

Restriktionsenzym:

Für den Verdau der PCR-Produkte wurde das Restriktionsenzym HaeIII verwendet. Die Endonuklease schneidet die DNA-Doppelhelix an der Erkennungssequenz

- 5'... GG↓CC ... 3'
- 5'... CC↓GG ... 5'

Das Temperatur-Optimum des Enzyms liegt bei 37°C, die Enzymaktivität beträgt 10 000 Units/ml.

2.2.5 SSCP

Prinzip:

SSCP (single strand conformation polymorphism) ist eine molekulares Nachweisverfahren anhanddessen Mutationen erkannt werden können. Bei dieser Technik werden die beiden DNA-Stränge durch Denaturierung voneinander getrennt. Die Einzelstränge nehmen auf Grund intramolekularer Basenpaarungen verschiedene Sekundärstrukturen an. Diese Formation und ihre Ladung zeigen einen für sie spezifischen Lauf im elektrophoretischen Feld. Findet eine Mutation und damit eine Veränderung der ursprünglichen Basenabfolge statt, kommt es zur veränderten Basenpaarung, Formation und Lauf im SSCP-Polyacrylamidgel. Mutationen und Wildtypen können somit verschiedene Bandenmuster im SSCP Gel erzeugen. Bei DNA-Einzelstrangabschnitten von mehr als 200 Basenpaaren wurde vor der folgenden SSCP Reaktion ein Restriktionsverdau des zu untersuchenden DNA-Abschnittes durchgeführt.

Durchführung:

Die Restriktionsverdauprodukte wurden 1:1 mit SSCP-Mix verdünnt (6 µl Verdau Produkt : 6 µl SSCP-Mix), der sich wie folgt zusammensetzt:

- 3ml H₂O dest.
- 1ml 10xTBE,
- 5ml 7M Urea

Der Harnstoff in diesem Gemisch stabilisiert die nach der Denaturierung entstandenen Einzelstränge und verhindert ein Wiederezusammenlegen derselben. Eine Erhitzung auf 96° für 5 min. denaturiert die DNA. Sofort nach Beendigung dieser Reaktion werden die Proben auf Eis gelagert, um ebenfalls die Einzelstränge zu stabilisieren.

Es folgt die Auftragung der Proben auf ein Polyacrylamidgel von je 3 µl pro Tasche. Das für das SSCP Verfahren verwendete Gel unterscheidet sich von dem PCR- bzw. Restriktionsverdau- Polyacrylamidgel durch die Zugabe von Glycerin. Dies bewirkt einen langsameren Lauf und damit genauere Auftrennung der DNA im Gel.

Herstellung des SSCP-Polyacrylamidgels:

- 4,5 ml H₂O
- 2 ml Glycerin
- 1 ml 10x TBE
- 2,5 ml Acrylamid
- 100 µl AMPs
- 15 µl TEMED

Um die Variation der exogenen Einflüsse so gering wie möglich zu halten, fand die Beladung des Gels und die Elektrophorese bei konstanten 4° im Kühlraum statt.

Die Laufzeit der Proben im Gel betrug 3h bei 15mAmp.

2.2.6 Silberfärbung

Prinzip:

Da bei der SSCP nur geringe Mengen DNA eingesetzt werden, wird hier die Silberfärbung angewendet. Sie gehört zu den sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele.

Die chemische Reaktion, auf der diese Färbemethode basiert, ähnelt der in der Fotografie verwendeten Reaktion. Nach der primären Fixierung in 10% Essigsäure, dass durch Denaturierung der Proteine ein Weiterwandern im Gel verhindert, wird das Polyacrylamid-Gel mit Silbernitrat (AgNO₃) behandelt. Die Ag⁺-Ionen binden an die DNA und gehen mit ihr eine Komplexverbindung ein. Die anschließende Zugabe von alkalischem Formaldehyd reduziert das Silbernitrat zu elementarem Ag, wodurch das latente (unsichtbare) Bild entsteht. Durch die Entwicklung in Carbonatlösung wird die Umgebung der reduzierten Silber-Ionen ebenfalls reduziert, so dass sich die Proteine im Gel schwarz färben. Durch das Natriumthiosulfat werden nicht gebundene Silber-Ionen aus der Gelschicht herausgelöst.

Polyacrylamid ist inert gegen diese Reaktion, so dass allein die DNA gefärbt wird.

Durchführung:

Zunächst wird das Gel vorsichtig von den Glasplatten entfernt und für ca. 20min in 10% Essigsäure fixiert. Anschließend erfolgt eine 3 fache Waschung in kaltem H₂O für je 2

Minuten. Diese und alle folgenden Wasch- und Färbeschritte finden unter ständigem Schwenken statt.

Währenddessen wird die Silbernitratlösung aus 2ml 10% Silbernitratlösung und 98 ml H₂O angesetzt und nach Beendigung der Waschung für ca. 45 Minuten auf das Gel gegeben. Die Carbonatlösung wird jetzt aus 60ml Carbonat-Stammlösung und 140 ml kaltem H₂O angesetzt und zunächst auf Eis gelagert. Die Silberlösung wird abgegossen und die Färbeschale bis zum Rand mit kaltem Wasser gefüllt. Dann werden zu der zuvor angesetzten Carbonatlösung 60µl Na-Thiosulfat-Stammlösung und 300µl Formaldehyd pipettiert. Das Wasser aus der Schale wird abgegossen und nur ein wenig der Carbonatlösung aufs Gel gegeben, wenige Sekunden geschwenkt, abgegossen und die restliche Carbonatlösung auf das Gel gegeben. Die Schale wird mit einem lichtschützendem Deckel versehen. Die Färbung erscheint nach 5-10 min.. Nach dem Eintreten der erwünschten Färbeintensität wird das Gel in 5% Essigsäure gelegt, um den Färbeprozess zu beenden. Nach ca. 10-15 min wird das Gel in Fixierlösung gegeben.

2.2.7 Sequenzanalyse

Bei der Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger wird ein neuer DNA-Strang synthetisiert und diese neu-synthetisierte DNA analysiert.

Das Template für die Sequenzierungsreaktion entstammt der PCR (s.o.), welches vor der eigentlichen Sequenz- Reaktion gereinigt wird.

2.2.7.1 PCR-Produktreinigung

Prinzip:

Dieses Verfahren wird vor jeder Sequenzierung durchgeführt und kann PCR Produkte mit einer Länge zwischen 100bp und 10kb aufreinigen. Das PCR Template wird von Nukleotiden, Primern, Enzymen, Salzen, Detergenzien und Mineralöl gereinigt. Dies geschieht durch Adsorption der DNA an eine Silica (Kieselerde)-Gel-Membran. Die Adsorption wird durch eine hohe Salzkonzentration gefördert (PB Puffer) und ist pH abhängig (sollte < 7,5 sein). Das Waschen mit PE-Puffer löst Salze, sowie kurze DNA-Fragmente aus. Die Elution der DNA geschieht wiederum bei einem niedrigen Salzgehalt und alkalischem pH mit H₂O.

Durchführung:

Die PCR-Produkt Aufreinigung findet nach dem Protokoll des QIAquick PCR-Purification Kit statt (QIAquick Spin Handbook 07/2002).

Das PCR Produkt wurde mit der 5 fachen Menge PB-Puffer versetzt, ohne zuvor das Mineralöl zu entfernen. Dieser Mix wurde gevortexet, auf eine Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen aufgetragen und zentrifugiert (30sec. bei 13.000 rpm). Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wird verworfen und die Säule wieder im Sammelröhrchen platziert. Die Säule wird mit 750µl PE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Sammeltube wird dann noch einmal für 1 min zentrifugiert, um eventuelle Reste zu lösen. Die Säule wird in ein frisches Sammelröhrchen platziert und die DNA jetzt mit 50µl H₂O eluiert.

2.2.7.2 Sequenz-Reaktion

Prinzip:

Im Rahmen der Sequenz-Reaktion liegt die DNA zunächst als einzelsträngige Matrize vor. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird nach Bindung komplementärer Primer durch Einbau von dNTPs ein neuer DNA-Strang synthetisiert. In dem Reaktionsgemisch (Pre-mix) befinden sich jedoch auch ddNTPs (didesoxyribonukleosidtriphosphate). Diese tragen am 3'- Ende keine OH-Gruppe und können deshalb nicht verlängert werden. Es kommt bei ihrem Einbau daher zu einem Kettenabbruch. Es entstehen dabei unterschiedlich große DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge nur durch ein einziges Nukleotid unterscheiden können. Alle Fragmente besitzen ein übereinstimmendes 5' Ende und ein durch das ddNTP bestimmtes variables 3' Ende. Die ddNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies ermöglicht später zwischen den vier verschiedenen Basen zu unterscheiden.

Durchführung:

Die Erstellung des Reaktionsansatzes fand bis zur Zugabe der DNA unter der Clean bench statt. Für die Sequenz-Reaktion wurde der gleiche Vorwärts-Primer der zuvor durchgeführten PCR verwendet.

Reaktionsansatz zur Sequenzierung (20 µl):

- 13 µl H₂O_{dest.}
- 1 µl DMSO
- 4 µl premix

- 1 µl Vorwärtsprimer
- 1 µl DNA

Die Probengefäße werden in den Thermocycler gestellt und die Sequenzreaktion nach dem folgenden Protokoll durchgeführt

	Denaturierung: 30 sec. 96°
	Annealing
25 Zyklen	Elongation: 4 min. 60°

Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine Abkühlung auf 4°C.

2.2.7.3 Ethanolfällung

Zur Konzentrierung und Reinigung der im Reaktionsgemisch enthaltenen DNA wurde diese im nächsten Schritt mittels Na-Acetat und Ethanol gefällt.

Dazu wurden

- 20 µl Probenmaterial
- 80 µl H₂O dest.
- 10 µl 3M NaAc, pH 4,6
- 250 µl 100% Ethanol

gut miteinander vermischt und anschließend bei einer Temperatur von 4°C für 20min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Zu der im Reaktionsgefäß verbliebenen DNA wurden frisch angesetzte

- 250 µl 70% Ethanol

gegeben. Nach einer weiteren 10 minütigen Zentrifugation bei 4°C mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 13.000 rpm wurde wiederholt die Flüssigkeit abpipittiert. Das ausgefällte DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in

- 16 µl H₂O

gelöst.

2.2.8 Analyse

Die DNA- Fragmente werden im elektrischen Feld ihrer Größe nach in einer Matrix aufgetrennt. Ein Laser regt die Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs zur Strahlung an, die von einem Detektor erfasst und in elektrische Signale umgewandelt werden. Ein angeschlossener Computer interpretiert diese Signale und rechnet aus der Wellenlänge der detektierten Signale auf die jeweils eingebaute Base zurück, so dass ein Sequenzmuster entsteht, das eine zur ursprünglich sequenzierten Matrize komplementäre Basenabfolge zeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden die DNA-Proben von insgesamt 301 Patienten der Adipositasambulanz im Zentrum für Innere Medizin (jetzt im Medizinischen Versorgungszentrum des UKE) untersucht. Eingeschlossen wurden Patienten mit einem BMI ≥ 25 ; ein 10 jähriges Kind wurde aufgrund seines Alters ausgeschlossen. Darüber hinaus fand keine Selektion bezüglich Geschlecht, Alter und Rasse oder anhand bestimmter Laborparameter statt, so dass sich insgesamt 300 zu untersuchende Patienten ergaben. Es lagen nicht für alle Patienten der vollständige Datensatz vor, teilweise waren die Akten nicht komplett.

Alle Patienten haben der Untersuchung der Gene mit Bezug zur Adipositas und Fettstoffwechselstörungen schriftlich zugestimmt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg liegt vor.

Der folgenden Tabelle ist eine Charakterisierung der Patienten zu entnehmen.

Insgesamt ergab sich für das Gesamtkollektiv ein mittlerer BMI von 41,49 kg/m² .

Tab.6 Patientenkollektiv

	Valid Number	Mean	Minimum	Maximum	Std. Deviation
BMI	268	41,4984	23,22	81,44	9,8384
Age	299	41,4829	16,18	75,80	13,4112
Total Cholesterol	289	201,7163	84,00	324,00	43,5513
Triglycerides	288	174,0243	42,00	927,00	111,2316
HDL	287	54,0697	5,00	101,00	17,208
LDL	282	114,8227	-1,00	237,00	37,4430

3.2 Darstellung der SSCP-Ergebnisse

Das vorliegende Patientenkollektiv wurde auf seltene Mutationen im Promoterbereich des CART-Gens untersucht.

Hierzu wurde die Patienten DNA zunächst mittels der SSCP (single strand conformation polymorphism) Methode analysiert.

3.2.1. Häufige SSCP- Muster Varianten

Als Ergebnis des SSCP-Screenings ergaben sich 12 unterschiedliche Bandenmuster. Jedes Bandenmuster steht wahrscheinlich für einen Haplotypen. Da zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung noch fraglich ist, ob es sich wirklich um eigenständige, echte Haplotypen handelt, werden sie bis zur anschließend durchgeführten Sequenzanalyse als Bandenmuster oder mehrere gleiche Bandenmuster als Mustergruppe bezeichnet.

Die Kategorisierung in Mustergruppen ergab sich aus dem wiederholten Vergleich der Muster eines Gels sowie der Vergleich der Gele miteinander, sowie der Wiederholung von nicht sicher einzuordnen Proben.

Die Einteilung der SSCP-Ergebnisse in Mustergruppen ist den folgenden Gelen zu entnehmen.

In Spur 16 (Abb. 9) bzw. 17 (Abb. 10) wurde eine DNA-Leiter als Indikator für die Länge der Restriktionsfragmente aufgetragen, sowie ein Probe mit unverdauter DNA in Spur 17 (Abb. 9) bzw. 18 (Abb. 10).

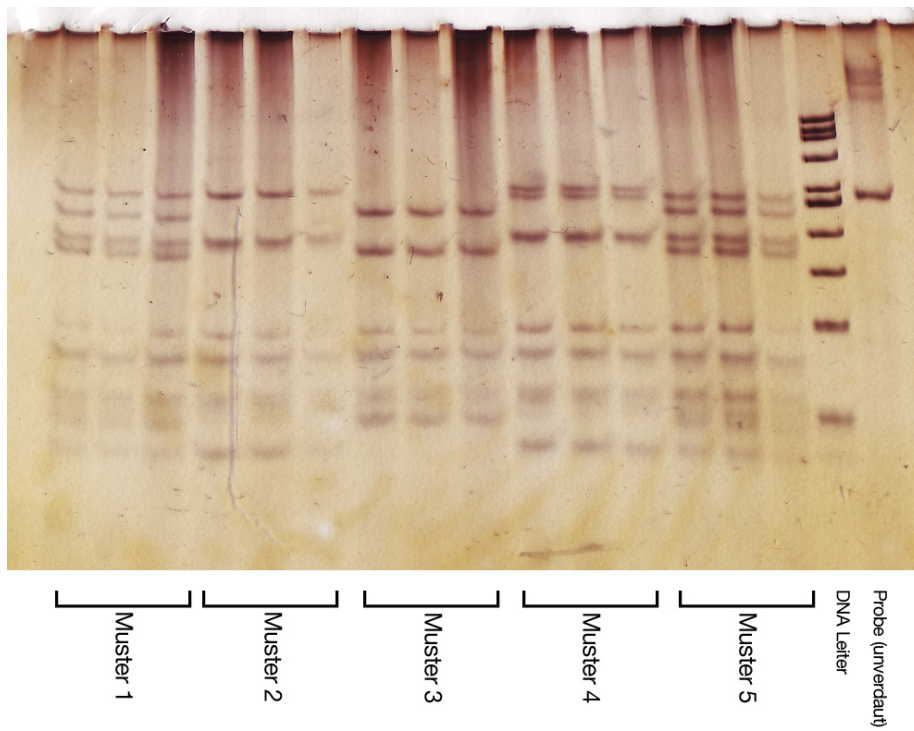


Abb.9 SSCP-Muster 1-5

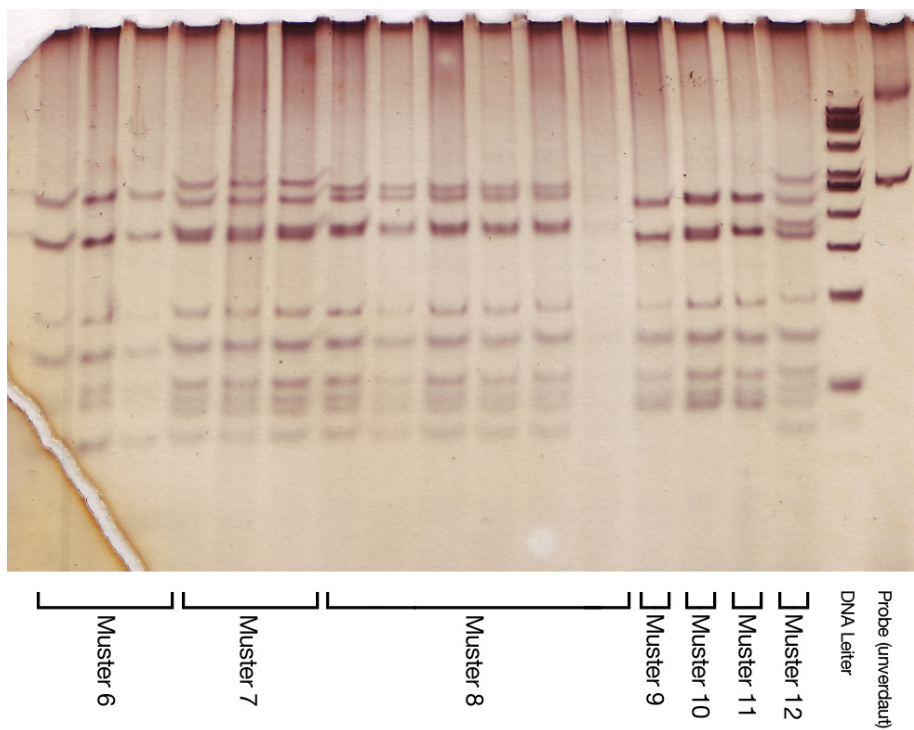


Abb.10 SSCP- Muster 6-12

Das Ergebnis der Analyse wird im Folgenden noch einmal schematisch dargestellt. Das Schema zeigt die Bandenmuster und die Anzahl der Patienten, die ihnen zugeordnet werden konnten:

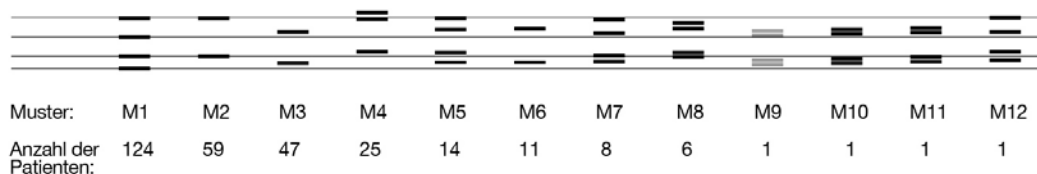


Abb.11 Schema aller SSCP- Muster

3.2.2 Seltene SSCP- Muster Varianten

Das SSCP- Screening ergab vier Bandenmuster, die nur ein einziges Mal vertreten waren und nicht den hauptsächlich vertretenen SSCP-Mustern entsprachen. Auch nach mehrfacher Wiederholung der Proben konnten diese nicht eindeutig einer der häufig vertretenen Mustergruppen zugeordnet werden.

Ursache dieser vier abweichenden Muster könnten seltene Varianten sein, die zu einer Veränderung der Konformation des DNA Einzelstranges und damit Laufweite im Gel führen. Sie werden daher im Folgenden noch einmal näher betrachtet.

3.2.2.1 SSCP- Muster 9

Das erste abweichende Muster stammt von dem Patienten mit der Nr. (3-7) und wird hier als Muster 9 bezeichnet.

Abbildung 12 zeigt zunächst die schematische Abweichung.

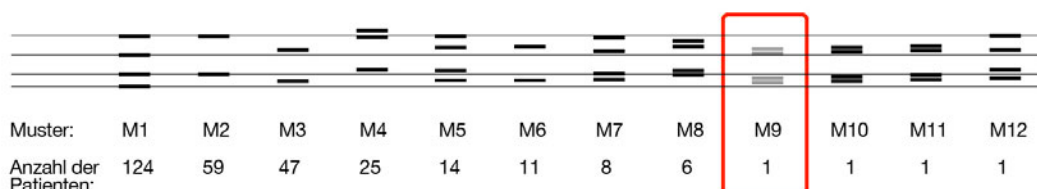


Abb.12 Schema des SSCP- Musters 9

Die darauf folgende Abbildung (Abb.13) ist der Zusammenschnitt aller SSCP-Analysen des Patienten.

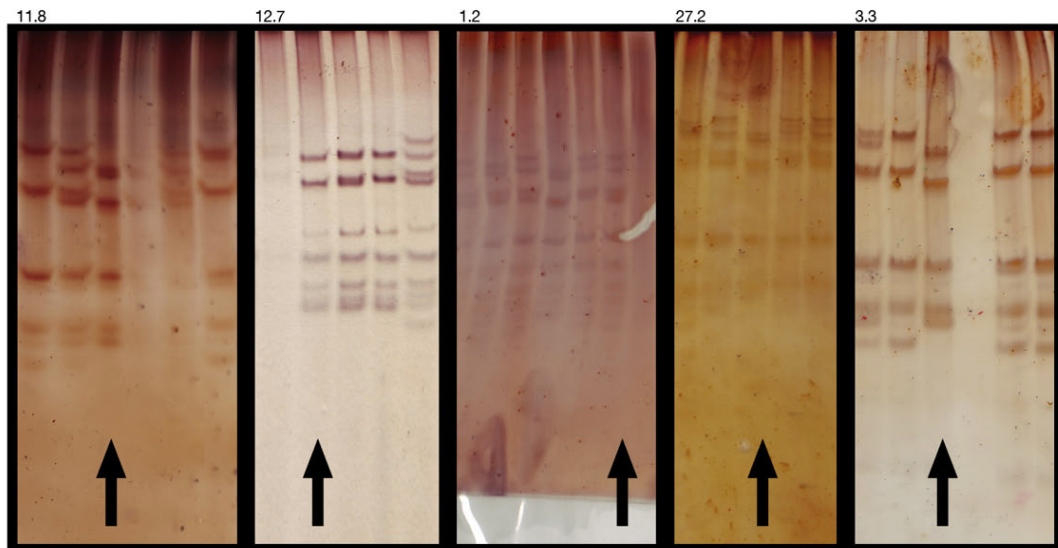


Abb.13 SSCP-Folien Muster 9

Die Probenanalysen von Nr. 11.8 und 3.3 zeigen nur eine unzureichende Trennung der Banden. Die breiten diffusen Banden lassen jedoch eine Spaltung, das heißt zwei DNA Stränge vermuten.

3.2.2.2 SSCP- Muster 10

Das zweite aus der Reihe stehende Muster von dem Patienten der Nr. 14-23 ist folgend dargestellt. Es wird hier als Muster 10 bezeichnet.

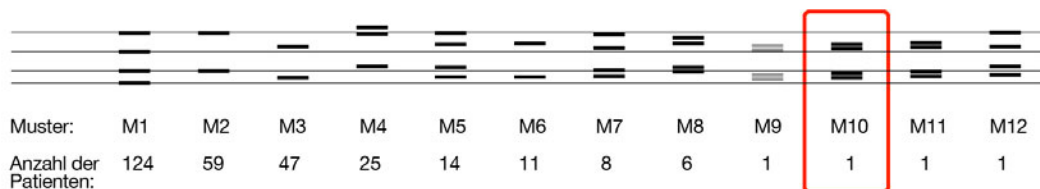


Abb.14 Schema des SSCP- Musters 10

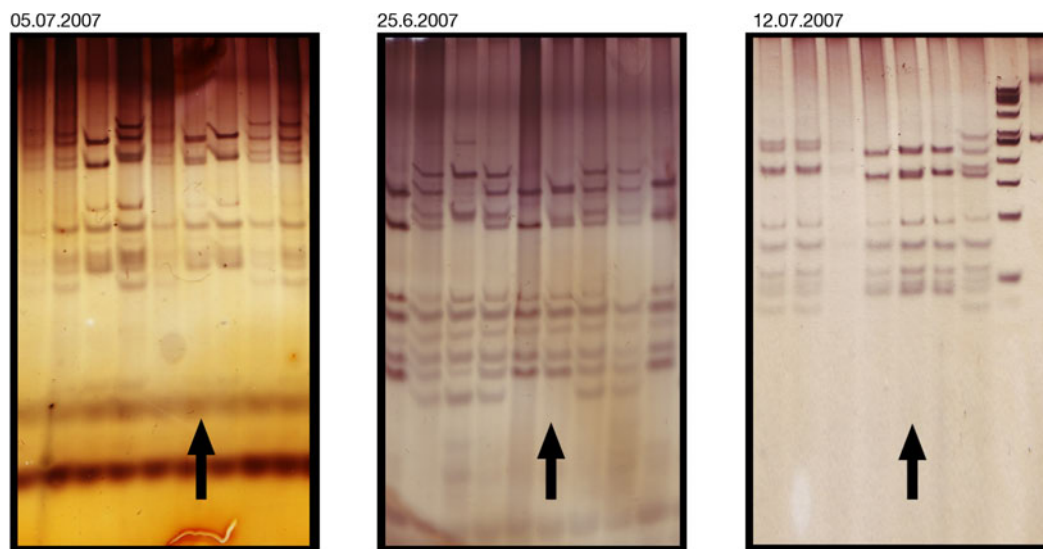


Abb.15 SSCP-Folien Muster 10

3.2.2.3 SSCP- Muster 11

Das dritte abweichende Muster von dem Patienten mit der Nr.14-25 und wird als Muster 11 bezeichnet:

Muster:	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Anzahl der Patienten:	124	59	47	25	14	11	8	6	1	1	1	1

Abb.16 Schema des SSCP- Musters 11

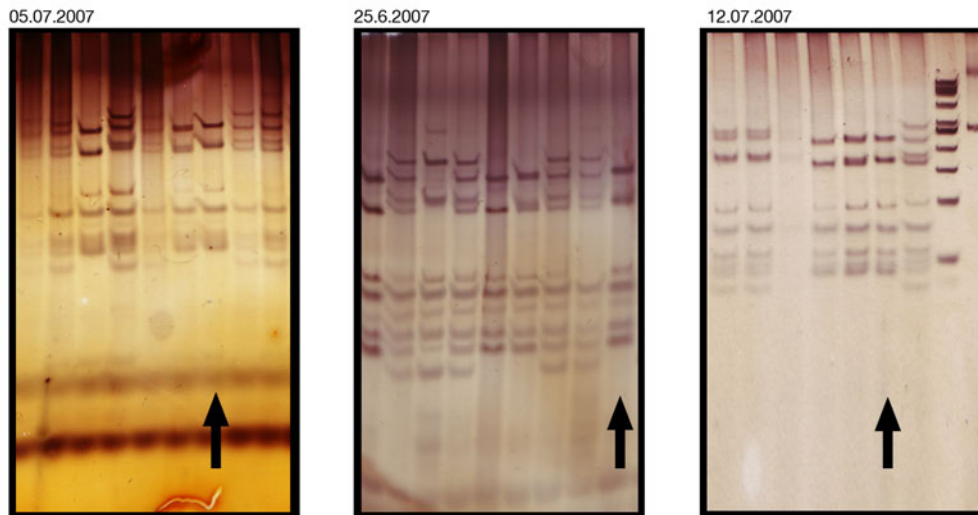


Abb.17 SSCP-Folien Muster 11

3.2.2.4 SSCP- Muster 12

Das vierte abweichende Muster stammt von dem Patienten mit der Nr. 5-18 und wird als Muster 12 bezeichnet:

Muster:	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Anzahl der Patienten:	124	59	47	25	14	11	8	6	1	1	1	1

Abb.18 Schema des SSCP- Musters 12

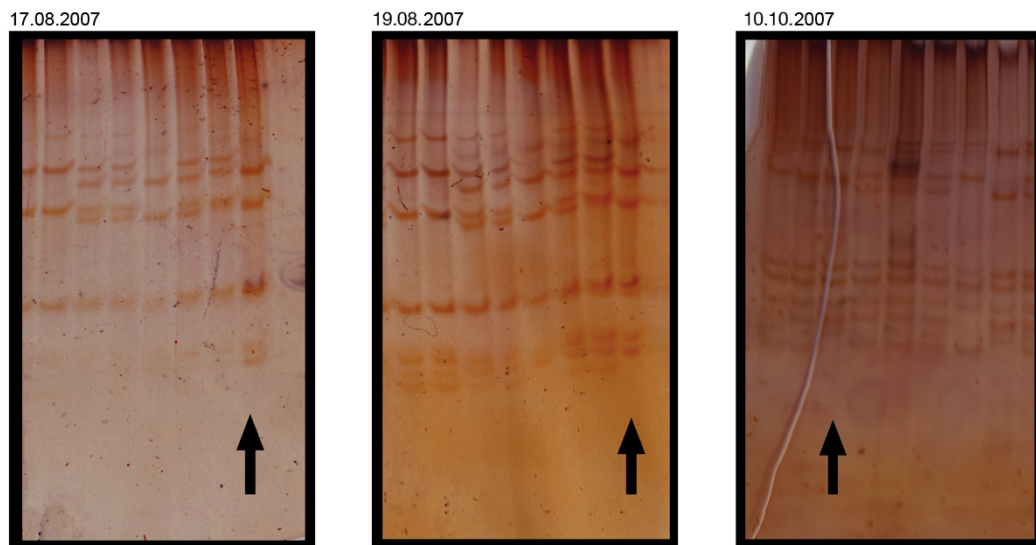


Abb.19 SSCP-Folien Muster 12

3.2.3 Überprüfung häufiger SSCP- Muster Varianten

Zur Überprüfung, ob es sich bei den 8 häufig vorkommenden Mustern um eigenständige Muster handelt und diese nicht z.B. durch Artefakte entstanden sind, wurden Proben der verschiedenen Muster miteinander vermengt. Hierdurch soll die Laufweite der einzelnen Banden deutlich gemacht und die Abgrenzung zueinander überprüft werden. Das Ergebnis ist folgend dargestellt:

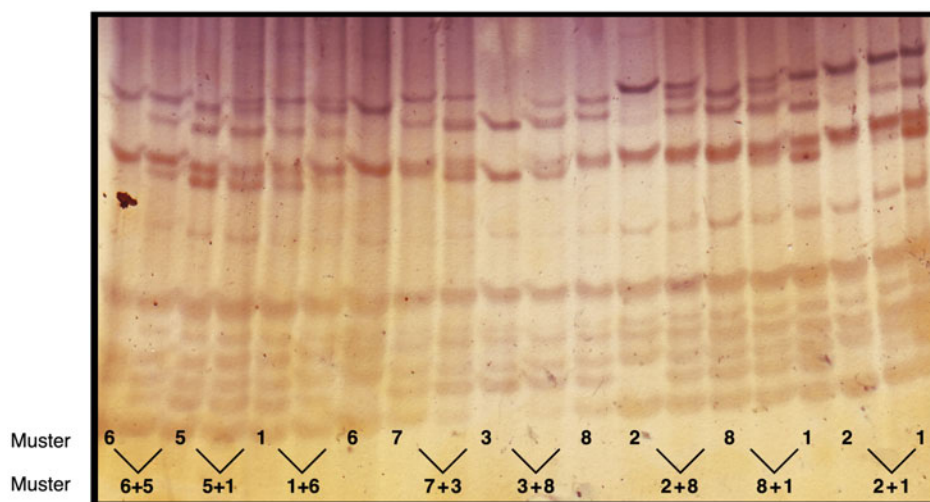


Abb.20 Überprüfung der Muster durch Probenvermischung

Die Vermengung der verschiedenen Proben zeigt durch die deutliche Abgrenzung der Banden zueinander, dass es sich bei den 8 häufigen Mustern tatsächlich um eigenständige Muster handelt und diese nicht artefaktbedingt sind.

3.3 Darstellung der Sequenzanalyse-Ergebnisse

Da die SSCP Methode keinen Aufschluss über die Art, Lokalisation und Anzahl der Mutationen geben kann, folgte eine Sequenz-Analyse der DNA.

Von jedem der 8 Muster wurden nicht die gesamten, sondern stellvertretend 3 Patienten sequenziert, sowie die 4 nur einmal vorkommenden Muster. Im Ganzen wurden somit 28 Proben sequenziert.

3.3.1 Häufige Muster Varianten

Die Sequenzierung der Proben der häufig vorkommenden Muster ergab 6 SNPs:

Die Bezeichnung der Lokalisation der SNPs orientiert sich am A des ATG Startcodons als +1.

Die AS Nummer ist nachfolgend in Klammern angegeben.

- 1 - 3608T>C (741047268)
- 2 - 3607C>T (741047269)
- 3 - 3540G>A (741047332)
- 4 - 3532A>G (741047440)
- 5 - 3514C>T (741047458)
- 6 - 3414C>T (741047558)

Die Positionen der SNPs sind am Patient 14-20 beispielhaft dargestellt. Die Sequenzierung der häufigen Muster Varianten ergab ebenfalls 8 häufig vorkommende Haplotypen. Jeder Haplotyp ist im Anhang in seiner Sequenz beispielhaft dargestellt (Anhang 1, Abb. 1-8).

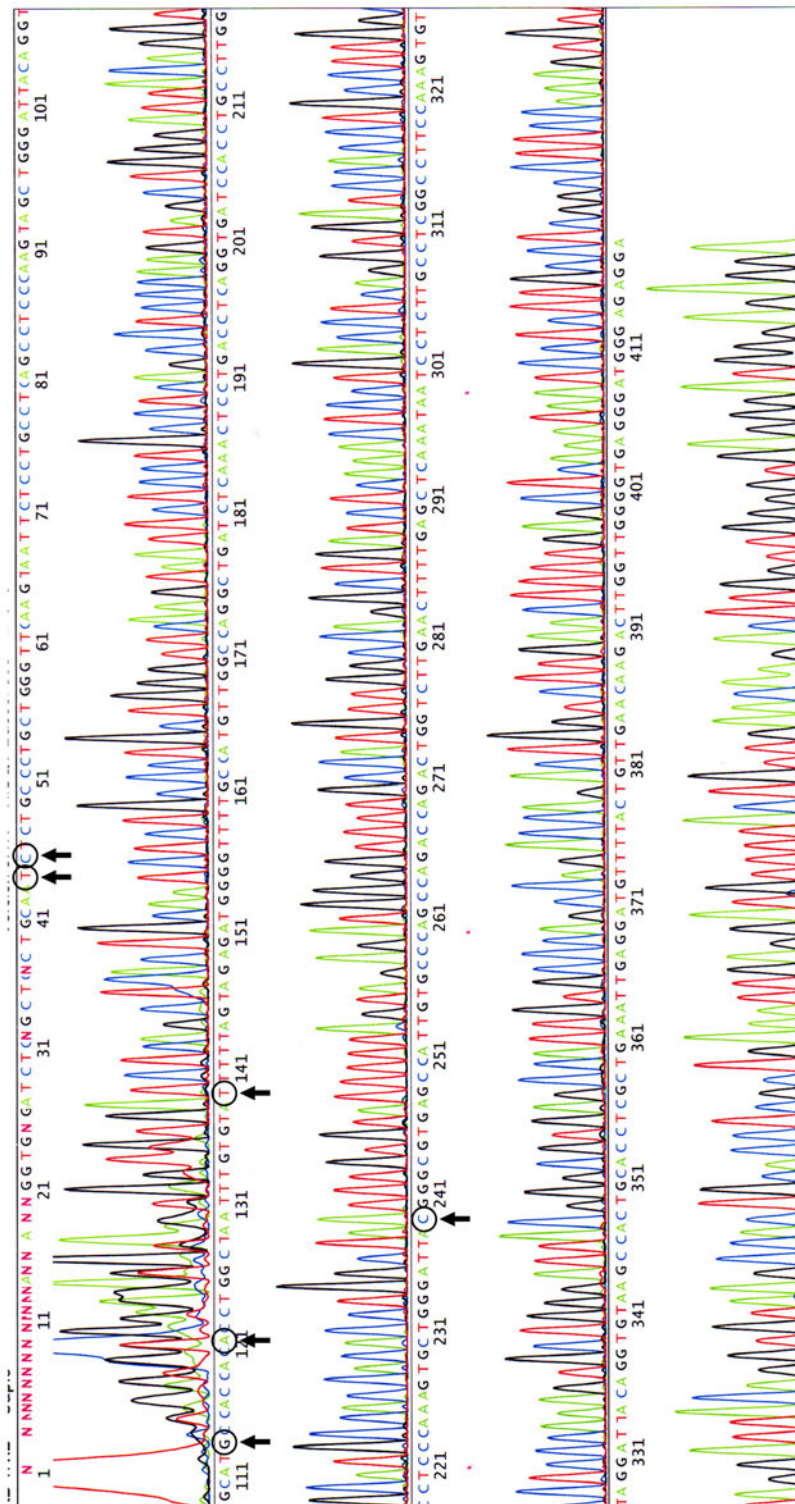


Abb.21 SNP-Positionen in dem untersuchten Abschnitt der Promoterregion

Der Vergleich der Gruppeneinteilung vom SSCP-Screening und der Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung der Gruppenzuordnung der Proben.

3.3.1.1 Allel- und Genotypverteilung

Die Allel und Genotyp Verteilung der 6 detektierten SNPs in dem hier untersuchten Kollektiv sind in folgender Tabelle (Tab.7) dargestellt:

Tab.7 Allel und Genotyp Verteilung der 6 SNPs

SNPs	Allele		Genotypen		
- 3608 T>C	T 276(46,3%)	C 320(53,7%)	TT 59(19,8%)	TC 158(53,0%)	CC 81(27,2%)
- 3607 C>T	C 343(57,6%)	T 253(42,4%)	CC 95(61,2%)	CT 153(51,4%)	TT 50(16,8%)
- 3540 G>A	G 343(57,6%)	A 253(42,4%)	GG 95(31,9%)	GA 153(51,3%)	AA 50(16,8%)
- 3532 A>G	A 343(57,6%)	G 253(42,4%)	AA 95(31,9%)	AG 153(51,3%)	GG 50(16,8%)
- 3514 C>T	C 236(39,6%)	T 360(60,4%)	CC 48(16,1%)	CT 140(47,0%)	TT 110(36,9%)
- 3414 C>T	C 343(57,6%)	T 253(42,4%)	CC 95(31,9%)	CT 153(51,3%)	TT 50(16,8%)

3.3.1.2 Genotypverteilung nach Hardy-Weinberg- Gleichgewicht

Die Genotypverteilung wurde für die SNPs -3608T>C, -3607C>T, -3540G>A, - 3532A>G, -3514C>T und -3414C>T mit den Formeln des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes überprüft. Sie befinden sich im Hardy -Weinberg Equilibrium (siehe Tab.8).

Tab.8 Genotypverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

SNP - 3608 T > C	CC	CT	TT
Genotyp Verteilung nach HWG:	86 (28,8%)	148 (49,7%)	64 (21,5%)
Genotyp Verteilung dieser Studie:	81 (27,2%)	158 (53,0%)	59 (19,8%)
SNP - 3607 C > T	CC	CT	TT
Genotyp Verteilung nach HWG:	98 (32,9%)	146 (49,0%)	54 (18,1%)
Genotyp Verteilung dieser Studie:	95 (31,8%)	153 (51,4%)	50 (16,8%)
SNP - 3540 G > A	GG	GA	AA
Genotyp Verteilung nach HWG:	98 (32,9%)	146 (49,0%)	54 (18,1%)
Genotyp Verteilung dieser Studie:	95 (31,8%)	153 (51,4%)	50 (16,8%)
SNP - 3532 A > G	AA	AG	GG
Genotyp Verteilung nach HWG:	98 (32,9%)	146 (49,0%)	54 (18,1%)
Genotyp Verteilung dieser Studie:	95 (31,8%)	153 (51,4%)	50 (16,8%)
SNP - 3541 C > T	CC	CT	TT
Genotyp Verteilung nach HWG:	48 (16,1%)	143 (48,0%)	107 (35,9%)
Genotyp Verteilung dieser Studie:	48 (16,1%)	140 (47,0%)	110 (36,9%)
SNP - 3414 C > T	CC	CT	TT
Genotyp Verteilung nach HWG:	98 (32,9%)	146 (49,0%)	54 (18,1%)
Genotyp Verteilung dieser Studie:	95 (31,8%)	153 (51,4%)	50 (16,8%)

3.3.2 Seltene Muster Varianten

Im Sequenzvergleich zeigt sich bei den 4 seltenen Bandenmustern neben den 6 common SNPs keine neue Mutation. Es ergibt sich jedoch bei den DNA- Proben von Muster 10 und 11 jeweils ein nur einmal vorkommender Haplotyp, der sich aus einer neuen Kombination der 6 common SNPs ergibt.

Die Sequenzanalyse der Patienten der SSCP- Muster 9 und 12 ergab, dass die Ergebnisse der SSCP- Analyse artefaktbedingt waren. Sie ließen sich durch die Sequenzierung den häufig vorkommenden Haplotypen zuordnen.

Die Sequenzanalyse der 4 seltenen SSCP-Muster (Muster 9, 10, 11, und 12) ergab somit keine seltene Variante (rare SNP).

3.4 Haplotypen und Stoffwechselfparameter

Es zeigte sich keine statistisch signifikante Assoziation von Muster/Haplotypen mit BMI oder Lipidparametern. Die Daten sind im Anhang 2 in den Abbildungen 1-11 zusammenfassend dargestellt. Bei den Haplotypen der Muster-Gruppe 6 und 7 liegen die BMI- Werte deutlich über dem Mittelwert von 41,5 kg/m², bei einem einzelnen Patienten sogar sehr deutlich (BMI 77.9 kg/m²); in der Mustergruppe 11 wurde im Vergleich zum Gesamtkollektiv ein niedrigerer BMI von 38 kg/m² dokumentiert.

4 Diskussion

Das CART Gen wurde in dieser Arbeit bei Patienten mit Adipositas auf seltene Genvarianten (rare variants) im Promoterbereich untersucht. Eine genetische Veränderung in diesem Bereich könnte ein verändertes Bindungsverhalten für Transkriptionsfaktoren mit einer verminderten Expression des CART Gens (anorectic peptide) bedingen und durch vermindertes Sättigungsgefühl zur Adipositas führen. Die Fragestellung der Arbeit ergibt sich aus der Vorstellung, dass neben den bereits entdeckten häufigen Varianten innerhalb des Promoterbereichs mit geringem Effekt auch seltene SNPs (rare variants) mit deutlich höherem Effekt auf die Adipositas existieren (common-disease-multiple rare variant Hypothese). Das genetische Risiko für das Merkmal Adipositas wäre dann einerseits durch die Summe vieler seltener Varianten mit im einzelnen geringen Effekt und seltenen Varianten mit im einzelnen grossen Effekt bedingt [53].

Eine Untersuchung im Sinne der common-disease-multiple rare variant (CDMRV) Hypothese, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, ist zum Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Arbeiten für die CART Promoterregion noch nicht durchgeführt worden. Die CDMRV-Hypothese geht davon aus, dass die genetischen Variation nicht allein in der Vielzahl der common SNPs zu finden ist, sondern sieht die genetische Variation vielmehr in der Gesamtzahl vieler seltener Varianten begründet.

Common variants (Häufige SNP)

Der Promoterbereich des CART Gens ist bereits in früheren Studien als polymorph beschrieben worden (Abb. 22) [54].

Bisherige Studien haben sich jedoch darauf konzentriert, die einzelnen common (häufig vorkommenden) SNPs innerhalb des CART Gens oder seiner Promoterregion in Assoziationsstudien auf einen Zusammenhang mit Adipositas hin zu untersuchen. Die Assoziationsstudien gehen in ihrer Betrachtungsweise der Vererbung von einem komplexen Zusammenspiel mehrerer small nuclear polymorphismen (SNPs) aus, wobei jeder einzelne der SNPs nur einen geringen Effekt zeigt und seine Auswirkung erst in Kombination mehrerer SNPs hat. Dies wird als „common-disease-common-variant model“ bezeichnet.

In der Studie von Guerardel et al (2005) ist die 5' Region 3.6kB vor Beginn der Coding Area des CART Gens untersucht worden. Die Assoziationsstudie von 621 Adipösen (BMI > 35) und einer Kontrollgruppe von 368 Personen der Normalbevölkerung ergab, dass von allen analysierten SNPs die Kombination der SNPs -3608T und -3607C möglicherweise mit Adipositas assoziiert ist (p: 0.0013). Vermutet wird hier ebenfalls ein verändertes Bindungsvermögen für Transkriptionsfaktoren durch diese Mutation.

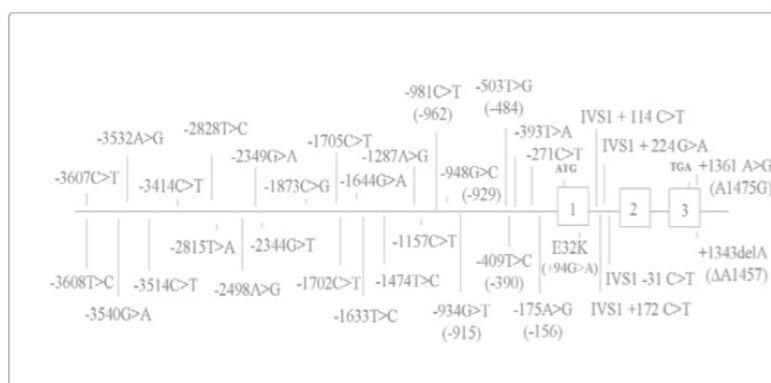


Abb.22 SNPs map of CART gene (Quelle: Guerardel et al 2005) [54]

Vergleicht man die Allel und Genotyp Verteilung dieser zwei SNPs -3608 T>C und -3607 C>T in der Studie von Guerardel et al und den Ergebnissen des hier untersuchten Kollektivs, so zeigen sich eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse (Tabelle 9).

Tab.9 Allel und Genotyp Verteilung von -3608 T>C u. -3607 C>T in der Studie von Guerardel et al 2005 und dieser Untersuchung [54]

	SNPs	Allele		Genotypen		
Ergebnisse dieser Arbeit	3608 T>C	T	C	TT	TC	CC
		276 (46,3%)	320 (53,7%)	59 (19,8%)	158 (53,0%)	81 (27,2%)
Ergebnisse von Guerardel et al 2005	3608 T>C	T	C	TT	TC	CC
		586 (49,4%)	600 (50,6%)	143 (42,1%)	300 (50,6%)	150 (25,3%)
Ergebnisse dieser Arbeit	3607 C>T	C	T	CC	CT	TT
		343 (57,6%)	253 (39,4%)	95 (61,2%)	153 (51,4%)	50 (16,8%)
Ergebnisse von Guerardel et al 2005	3607 C>T	C	T	CC	CT	TT
		688 (57,9%)	500 (42,1%)	202 (34,0%)	284 (47,8%)	108 (18,2%)

So liegen beispielsweise die T- und C-Allel Frequenz des SNP -3608 T>C bei 46,3% bzw. 53,7% in unserem Kollektiv im Vergleich zu den Guerardel mit 49,4% bzw. 50,6% auf gleichem Niveau. Der Genotyp TC in dieser Untersuchung gleicht ebenfalls mit 53% den 50,6% von Guerardel et al. Auch für das SNP -3607 C>T ergeben sich in der T- und C- Allel Frequenz von 39,4% vs. 42,1%(Guerardel) bzw. 57,6 vs. 57,9%(Guerardel) kaum Unterschiede.

Die Ergebnisse der Genotypfrequenz dieser Arbeit sind zuvor anhand des Hardy-Weinberg - Gleichgewichts als weitestgehend übereinstimmend überprüft worden (siehe Tab.8).

Außerhalb des von mir untersuchten Promoterabschnitts des CART-Gens sind weitere common variants in Zusammenhang mit Adipositas gebracht worden. Die Untersuchung des SNP -175 A>G (bzw. -156 A>G) bei 500 Adipösen (BMI >30) ergab bei Yamada et al 2002 [52] ein erhöhtes Risiko für Adipositas im Vergleich zur Kontrollgruppe (p: 0.0076). Guerardel et al 2005 hat hingegen keine Assoziation zwischen diesem SNP und Adipositas festgestellt.

Rare variants

Bisher sind keine „rare variants“ im Promoterbereich des CART Gens in Bezug auf Adipositas in der Literatur beschrieben.

Die SSCP Analyse in unserem Kollektiv ergab zunächst den Verdacht auf 4 seltene

Varianten. Methodenbedingt zeigte sich jedoch in der anschließenden Sequenzanalyse ein anderes Ergebnis. Zwei in der SSCP Analyse abweichende SSCP- Muster (Muster 9 u. 12 s. Abb. 13 u. 19) ließen sich einem anderen Haplotypen zuordnen. Die anderen zwei abweichenden Haplotypen ergaben sich aus einer Neukombination der bekannten SNPs -3608T>C, -3607C>T, -3540G>A, -3532A>G, -3514C>T, -3414C>T, jedoch nicht aus einer neuen Mutation.

Die Untersuchung ergab damit 10 Haplotypen (SSCP Muster 1 bis 10), die sich aus einer Kombination der insgesamt 6 common SNPs - 3608T>C, -3607C>T, -3540G>A, -3532A>G, -3514C>T, -3414C>T in der Promoterregion ergaben.

In der vorgelegten Arbeit konnten damit auch keine „rare variants“ nachgewiesen werden.

Relevanz einzelner Haplotypen und Methodenkritik

Wie bereits zuvor angesprochen sind zwei der zunächst in der SSCP Analyse als Produkt seltener Varianten interpretierten SSCP-Muster das Ergebnis einer neuen Kombination der bekannten common SNPs. Dies könnte jeweils eine Varianz mit oder ohne funktionelle Folge sein.

Das SSCP - Muster 11 zeigt im Ergebnis der statistischen Analyse einen mit 38 kg/m² unter dem Gesamtdurchschnitt des Kollektivs liegenden BMI von 41 kg/m². Von einer funktionellen Variation ist hier aber vermutlich nicht auszugehen.

Hingegen zeigt Patient 14-23 (Muster 10) mit 77.9 kg/m² einen BMI deutlich über dem Durchschnitts-BMI des Kollektivs liegt.

Bei den Haplotypen der Muster-Gruppe 6 und 7 liegen die BMI- Werte 48 bzw. 50 kg/m² ebenfalls deutlich über dem Durchschnittswert des Gesamtkollektivs; insgesamt sind die Stoffwechselfparameter (Gesamtcholesterin, Triglyceride, HDL, LDL) und BMI bei den einzelnen Haplotypen aber nicht unterschiedlich (s. Anhang 1, Abb 1-11).

Wenn sich die Tendenz zu einem niedrigen oder höheren BMI in Abhängigkeit vom Haplotyp doch in grösseren Kollektiven der Patientenkollektiv nachweisen liesse, könnte dies durch ein verändertes Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren bedingt sein. Hier könnte eine weiterführende Analyse durch „electrophoretic mobility shift (EMSA)“

hilfreich sein. Mit der EMSA-Methode kann die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsensussequenzen innerhalb von Promotoreregionen gemessen werden.

Erkenntnisse über mögliche Transkriptionsfaktoren des CART Gens sind bisher jedoch hauptsächlich bei der Ratte und Maus gewonnen worden. In Abbildung 23 sind die prognostizierten „transcription factor binding sites“ schematisch dargestellt. Sie lassen vermuten, dass Transkriptionsfaktoren wie CRE-binding protein (CREB), cJun, SP1 Und AP2 eine Rolle in der Genexpression spielen.

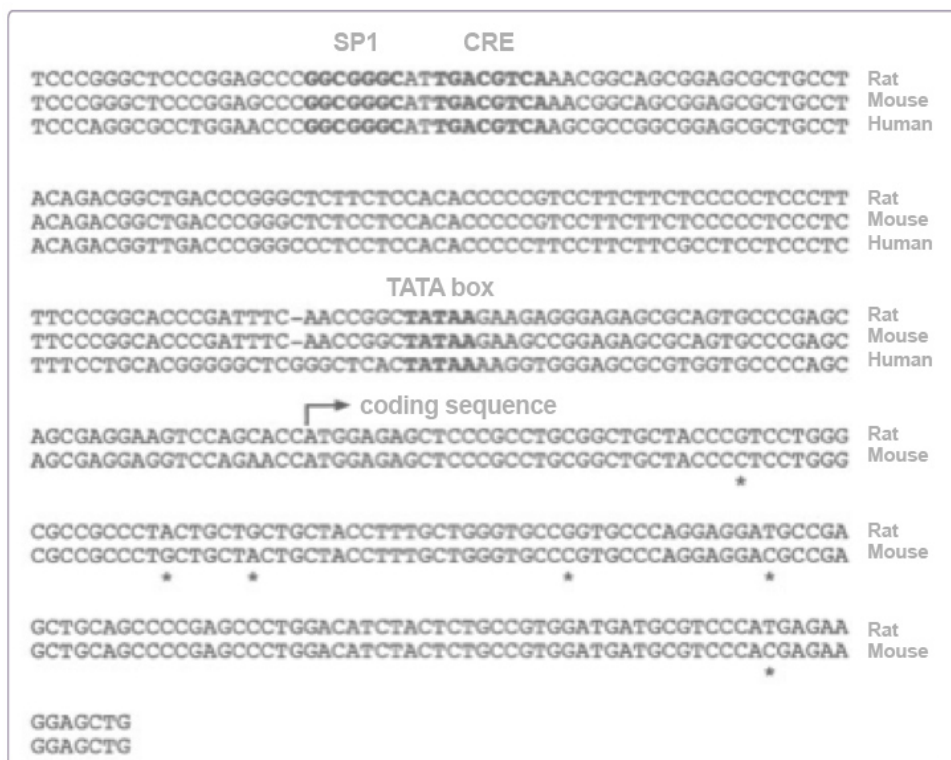


Abb.23 Alignment of the rat promoter sequence from -198 to +168 bp with published upstream sequence of the human *CART* coding sequence, the mouse upstream sequence, and exon 1 of the coding sequence (Quelle: Barrett P et al 2002) [55]

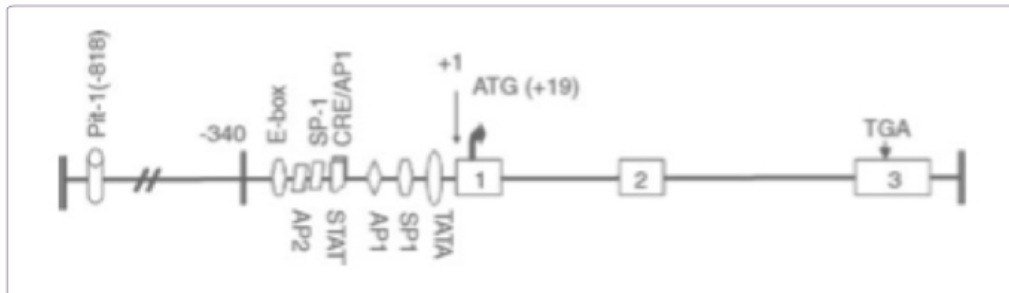


Abb.24 Schematic diagram of the CART gene and its promoter region (Quelle: Dominguez G 2006) [38]

Bei einer Sequenzübereinstimmung der Promotorregion von insgesamt 80% und einer 100% Übereinstimmung der Sequenz über die ersten 189 bp der 5' Region bei Mensch und Maus [38, 55], sind auch im Bereich der Transkription binding sites große Übereinstimmungen zu vermuten. Für den hier untersuchten Abschnitt der Promotorregion sind ebenfalls mögliche Transkriptionsfaktoren (CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein), GATA-3 and OCT-1) untersucht, jedoch bisher nicht sicher bestätigt worden [54]. Um eine Aussage über mögliche Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion machen zu können, sind weitere Erkenntnisse für Transkriptionsfaktoren des CART Gens nötig.

Dass in diesem Abschnitt der Promoter Region des CART Gens bisher keine seltenen Varianten gefunden worden sind, spricht nicht gegen die Hypothese, dass das Zusammenspiel seltener SNPs zu einer Veränderung der CART-Expression führt und einen Faktor bei der Entstehung von Adipositas spielt. Weitere CART-Promoterregion-Abschnitte, in denen bereits common SNPs beschrieben wurden, sollten auf „rare variants“ untersucht werden.

Next-generation sequencing

Die mögliche weitere Suche nach „rare variants“ in weiteren Promoter-Abschnitten des CART Gens oder auch die Sequenzierung des gesamten CART-Gens wird durch die Entwicklung des sogenannten „Next-Generation Sequencing“ revolutioniert. Sie ermöglicht die parallele Ablesung von Millionen von Sequenzen gleichzeitig, im Vergleich zu 96 Sequenzen in einem Vorgang nach der bis jetzt verwendeten Methode nach Sanger [56]. Vor ca. 4-5 Jahren, zu Beginn dieser Arbeit, wurden das erste Mal die

„Next-Generation Sequencing“ (NGS)- oder auch „Massivly-Parallel Sequencing“-Methoden vorgestellt. Zuvor ist in den letzten 30 Jahren allein die Sequenzierungsmethode nach Sanger verwendet worden. Diese ist trotz ihrer Weiterentwicklungen stets mit einem hohen technischen und zeitlichen Aufwand, sowie hohen Kosten verbunden. Mit den Methoden des „Next-Generation Sequencing“ können nicht nur bestimmte ausgewählte Genabschnitte, sondern ein ganzes Genom mit einem Gerät in einem Durchlauf innerhalb von 1-3 Tagen (abhängig von Genomgröße und verwendeter Methode) auf Varianten untersucht werden [56]. Nicht nur der zeitliche Aufwand, sondern auch die Kosten sind mit der Einführung der neuen Sequenziermethoden rasant gesunken. So lagen laut dem „National Human Genome Research Institute“ die Sequenzierungskosten eines ganzen Genoms im Okt. 2007 bei durchschnittlich 12.000.000 Dollar und liegen heute bei ca. 10.000 Dollar pro Genom und machen damit insgesamt nur noch einen Bruchteil der ursprünglichen Kosten aus [57].

Zu Beginn dieser Arbeit waren die von mir verwendeten Methoden (SSCP, Sequenzierung nach Sanger) zur Detektierung von seltenen Varianten „state of the art“. Mit der Etablierung der „Next-Generation-Sequencing“ Methoden werden diese jedoch bald obsolet sein. Eine Untersuchung auf seltene Varianten in einem Genabschnitt, wie in dieser Arbeit durchgeführt, wird innerhalb eines Tages vollendet sein. Statt der Untersuchung kleiner Genabschnitte werden jedoch vielmehr in Zukunft mit sinkenden Kosten und Zeitaufwand ganze Gene resequenziert.

5 Zusammenfassung

Adipositas mit ihren Folgeerkrankungen ist ein grosses Gesundheitsproblem in westlichen Industrienationen. Die Ursache für die drastische Zunahme an Adipositas in den letzten Jahrzehnten wird zur Zeit vornehmlich in den sich verändernden Umweltfaktoren (weniger körperliche Arbeit, hochkalorische Nahrung etc.) gesehen. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit diese Zunahme gleichzeitig durch genetisch prädisponierende Faktoren bedingt ist.

Mit dieser Fragestellung wurden 300 Patienten der Adipositasambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf auf seltene Genvarianten der Promoterregion von CART (Cocaine- and amphetamine- regulated transcript) untersucht. CART ist ein Peptid, das an der Erzeugung des Sättigungsgefühls beteiligt ist. Eine genetische Veränderung in der Promoterregion könnte ein verändertes Bindungsverhalten für Transkriptionsfaktoren mit einer verminderten Expression des CART Gens (anorectic peptide) bedingen und durch vermindertes Sättigungsgefühl zur Adipositas führen.

In Untersuchungen des CART Gens in vorausgehenden Assoziationsstudien konnte bereits eine Vielzahl von common SNPs beschrieben werden, die jedoch bisher nicht in direkten Zusammenhang mit Adipositas gebracht werden konnten.

Die Fragestellung der Arbeit ergibt sich aus der Vorstellung, dass neben den bereits entdeckten häufigen Varianten (common variants) innerhalb des Promoterbereichs mit geringem Effekt auch seltene SNPs (rare variants) mit deutlich höherem Effekt auf die Adipositas existieren (common-disease-multiple rare variant Hypothese). Das genetische Risiko für das Merkmal Adipositas wäre dann einerseits durch die Summe vieler seltener Varianten mit im einzelnen geringen Effekt und seltenen Varianten mit im einzelnen grossen Effekt bedingt.

Das Patientenkollektiv wurde zunächst mittels SSCP-Analyse untersucht. Diese ergab zunächst den Verdacht auf vier seltene Varianten. Methodenbedingt zeigte sich jedoch in der anschließenden Sequenzanalyse ein anderes Ergebnis. Zwei in der SSCP Analyse abweichende SSCP-Muster (Muster 9 und 12, s. Abb.10) ließen sich einem anderen Haplotypen zuordnen. Die anderen zwei abweichenden SSCP-Muster (Muster 10 und 11, s. Abb.10) ergaben sich aus einer Neukombination der bekannten SNPs -3608T>C, -3607C>T, -3540G>A, -3532A>G, -3514C>T, -3414C>T, jedoch nicht aus einer neuen Mutation.

Die Untersuchung ergab damit 10 Haplotypen (SSCP Muster 1 bis 10), die sich aus einer Kombination der insgesamt 6 common SNPs -3608T>C, -3607C>T, -3540G>A, -3532A>G, -3514C>T, -3414C>T in der Promoterregion ergaben.

In der vorgelegten Arbeit konnten damit keine „rare variants“ nachgewiesen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
2. WHO. *Obesity and overweight*. 2006; Fact sheet N° 311 September 2006].
3. *Statistisches Bundesamt, www.destatis.de*.
4. Flegal, K.M., et al., *Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008*. JAMA, 2010. **303**(3): p. 235-41.
5. Bergmann, K.E. and G.B. Mensink, *[Anthropometric data and obesity]*. Gesundheitswesen, 1999. **61 Spec No**: p. S115-20.
6. Knoll, K.-P.H.H., *Kosten der Adipositas in der Bundesrepublik Deutschland - Eine aktuelle Krankheitskostenstudie Adipositas 2008*, in *Adipositas*. 2008. p. 204 - 210.
7. Bray, G.A., *Health hazards of obesity*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1996. **25** (4): p. 907-19.
8. Deurenberg, P., M. Yap, and W.A. van Staveren, *Body mass index and percent body fat: a meta analysis among different ethnic groups*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1998. **22**(12): p. 1164-71.
9. Dalton, M., et al., *Waist circumference, waist-hip ratio and body mass index and their correlation with cardiovascular disease risk factors in Australian adults*. J Intern Med, 2003. **254**(6): p. 555-63.
10. Slawik, M. and F. Beuschlein, *[Genetics and pathophysiology of obesity]*. Internist (Berl), 2006. **47**(2): p. 120-9.
11. Gallagher, D., et al., *Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(3): p. 694-701.
12. Lew, E.A. and L. Garfinkel, *Variations in mortality by weight among 750,000 men and women*. J Chronic Dis, 1979. **32**(8): p. 563-76.
13. Waaler, H.T., *Height, weight and mortality. The Norwegian experience*. Acta Med Scand Suppl, 1984. **679**: p. 1-56.
14. Manson, J.E., et al., *A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women*. N Engl J Med, 1990. **322**(13): p. 882-9.
15. Actuaries, S.o., *Blood pressure Study of 1979*. Chicago, Society of Actuaries/ Association of Life Insurance Medical Directors of America, 1980, 1980.

16. Calle, E.E., et al., *Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 1999. **341**(15): p. 1097-105.
17. Larsson, B., et al., *Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **288**(6428): p. 1401-4.
18. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary*. Crit Pathw Cardiol, 2005. **4**(4): p. 198-203.
19. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
20. Stunkard, A.J., T.T. Foch, and Z. Hrubec, *A twin study of human obesity*. JAMA, 1986. **256**(1): p. 51-4.
21. Bodurtha, J.N., et al., *Genetic analysis of anthropometric measures in 11-year-old twins: the Medical College of Virginia Twin Study*. Pediatr Res, 1990. **28**(1): p. 1-4.
22. Meyer, J.M., Silberg, J.L., Eaves, L.J., Maes, H.H., Simonoff, E., Pickles, A. , Rutter, M. L. and Hewitt, J.K., *Variable age of gene expression: Implications for developmental genetic models*. Current Methodological Issues in Behavioral genetic, 1996.
23. Stunkard, A.J., et al., *An adoption study of human obesity*. N Engl J Med, 1986. **314**(4): p. 193-8.
24. Maes, H.H., M.C. Neale, and L.J. Eaves, *Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity*. Behav Genet, 1997. **27**(4): p. 325-51.
25. Neel, J.V., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* 1962. Bull World Health Organ, 1999. **77**(8): p. 694-703; discussion 692-3.
26. Ravussin, E., Kozak LP, *Energy homeostasis*. Pharmacotherapy of obesity, 2004 (CRC Press, Danvers): p. 3-24.
27. Bouchard, C., et al., *The response to long-term overfeeding in identical twins*. N Engl J Med, 1990. **322**(21): p. 1477-82.
28. Farooqi, I.S., et al., *Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1085-95.
29. Branson, R., et al., *Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1096-103.
30. O'Rahilly, S., et al., *Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3757-64.

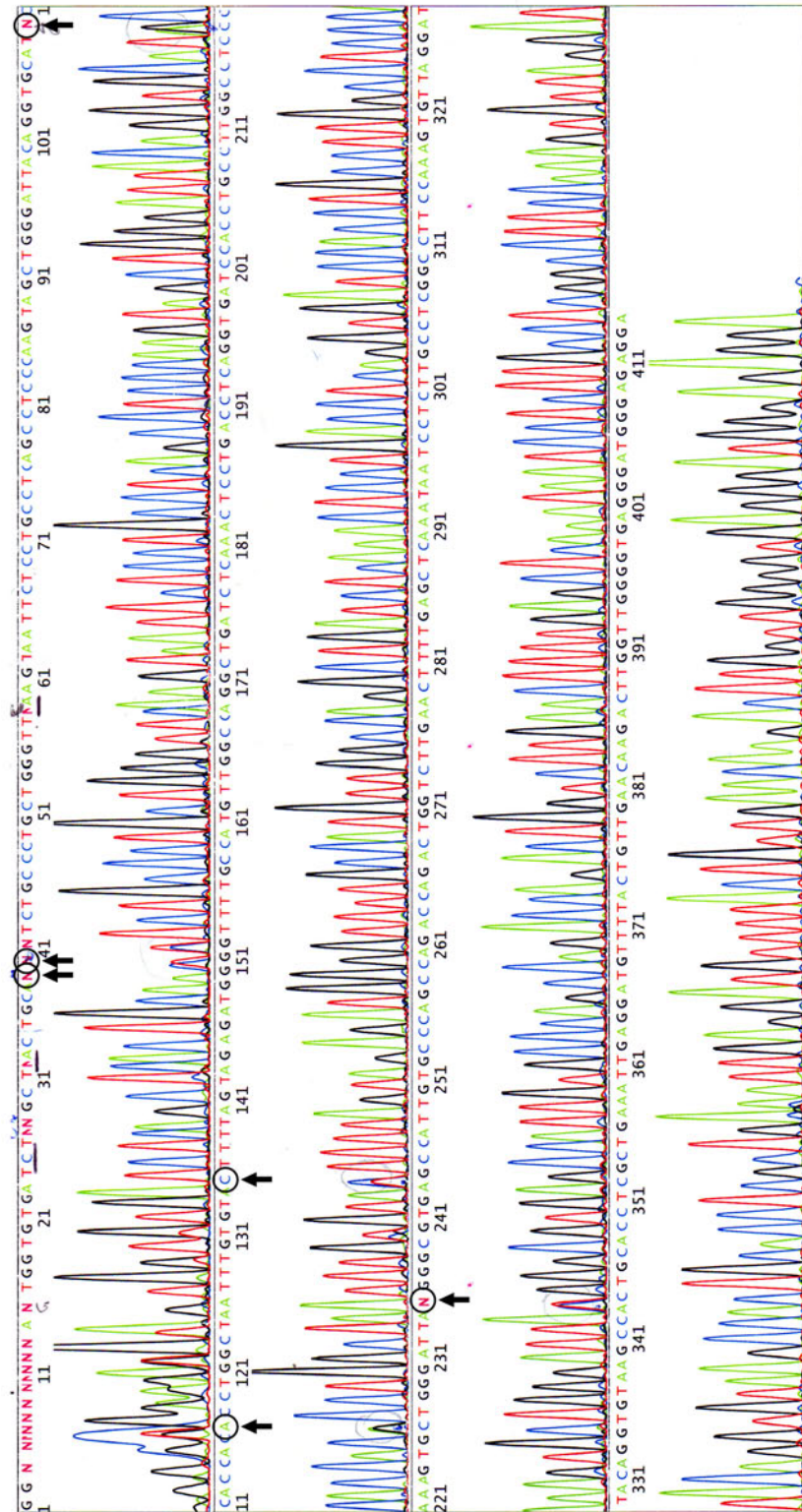
31. Moran, T.H., *Cholecystokinin and satiety: current perspectives*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 858-65.
32. Batterham, R.L., et al., *Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 650-4.
33. Ahima, R.S., et al., *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 250-2.
34. Woods, S.C., et al., *Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight*. Am J Clin Nutr, 1985. **42**(5 Suppl): p. 1063-71.
35. Flier, J.S., *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic*. Cell, 2004. **116**(2): p. 337-50.
36. Broberger, C., et al., *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13506-11.
37. Vrang, N., et al., *Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour*. Brain Res, 1999. **818**(2): p. 499-509.
38. Dominguez, G., *The CART gene: structure and regulation*. Peptides, 2006. **27**(8): p. 1913-8.
39. Douglass, J., A.A. McKinzie, and P. Couceyro, *PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine*. J Neurosci, 1995. **15**(3 Pt 2): p. 2471-81.
40. Rogge, G., et al., *CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(10): p. 747-58.
41. Elias, C.F., et al., *Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord*. Neuron, 1998. **21**(6): p. 1375-85.
42. Kristensen, P., et al., *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*. Nature, 1998. **393**(6680): p. 72-6.
43. Couceyro, P.R., E.O. Koylu, and M.J. Kuhar, *Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization*. J Chem Neuroanat, 1997. **12**(4): p. 229-41.
44. Wortley, K.E., et al., *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet*. Regul Pept, 2004. **117**(2): p. 89-99.
45. Smith, K.L., et al., *Overexpression of CART in the PVN increases food intake and weight gain in rats*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(10): p. 2239-44.

46. Jensen, P.B., et al., *The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans*. FEBS Lett, 1999. **447**(2-3): p. 139-43.
47. Stanley, S.A., et al., *Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats*. Brain Res, 2001. **893**(1-2): p. 186-94.
48. Asakawa, A., et al., *Cocaine-amphetamine-regulated transcript influences energy metabolism, anxiety and gastric emptying in mice*. Horm Metab Res, 2001. **33**(9): p. 554-8.
49. Asnicar, M.A., et al., *Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet*. Endocrinology, 2001. **142**(10): p. 4394-400.
50. Reich, D.E. and E.S. Lander, *On the allelic spectrum of human disease*. Trends Genet, 2001. **17**(9): p. 502-10.
51. Goldstein, D.B., *Common genetic variation and human traits*. N Engl J Med, 2009. **360**(17): p. 1696-8.
52. Pritchard, J.K., *Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?* Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 124-37.
53. Manolio, T.A., et al., *Finding the missing heritability of complex diseases*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 747-53.
54. Guerardel, A., et al., *Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a Caucasian population*. BMC Genet, 2005. **6**: p. 19.
55. Barrett, P., J. Davidson, and P. Morgan, *CART gene promoter transcription is regulated by a cyclic adenosine monophosphate response element*. Obes Res, 2002. **10**(12): p. 1291-8.
56. Mardis, E.R., *The impact of next-generation sequencing technology on genetics*. Trends Genet, 2008. **24**(3): p. 133-41.
57. Institute, N.H.G.R.
58. Wynne, K., et al., *Appetite control*. J Endocrinol, 2005. **184**(2): p. 291-318.
59. obesity, W.r., *Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity*. WHO, Genf, 1998.
60. Mullen, S.A., et al., *A neurologist's guide to genome-wide association studies*. Neurology, 2009. **72**(6): p. 558-65.
61. Katzmarzyk, P.T., C.L. Craig, and C. Bouchard, *Original article underweight, overweight and obesity: relationships with mortality in the 13-year follow-up of the Canada Fitness Survey*. J Clin Epidemiol, 2001. **54**(9): p. 916-20.

62. Aberle, J., *Genetische Ursachen der Adipositas und assoziierter Komorbiditäten*. Medizinische Habilitation, Universität Hamburg, 2009.
63. Bender, R., et al., *Effect of age on excess mortality in obesity*. JAMA, 1999. **281** (16): p. 1498-504.
64. Benecke A, H.V., *Übergewicht und Adipositas*. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch -Institut, 2003. **16**: p. 1-27.

7 Anhang 1 Sequenzen der 12 Mustergruppen

Abb. 1 Sequenz des SSCP-Bandenmusters 1



[illegible]

Abb. 4 Sequenz des SSCP-Bandenmusters 4

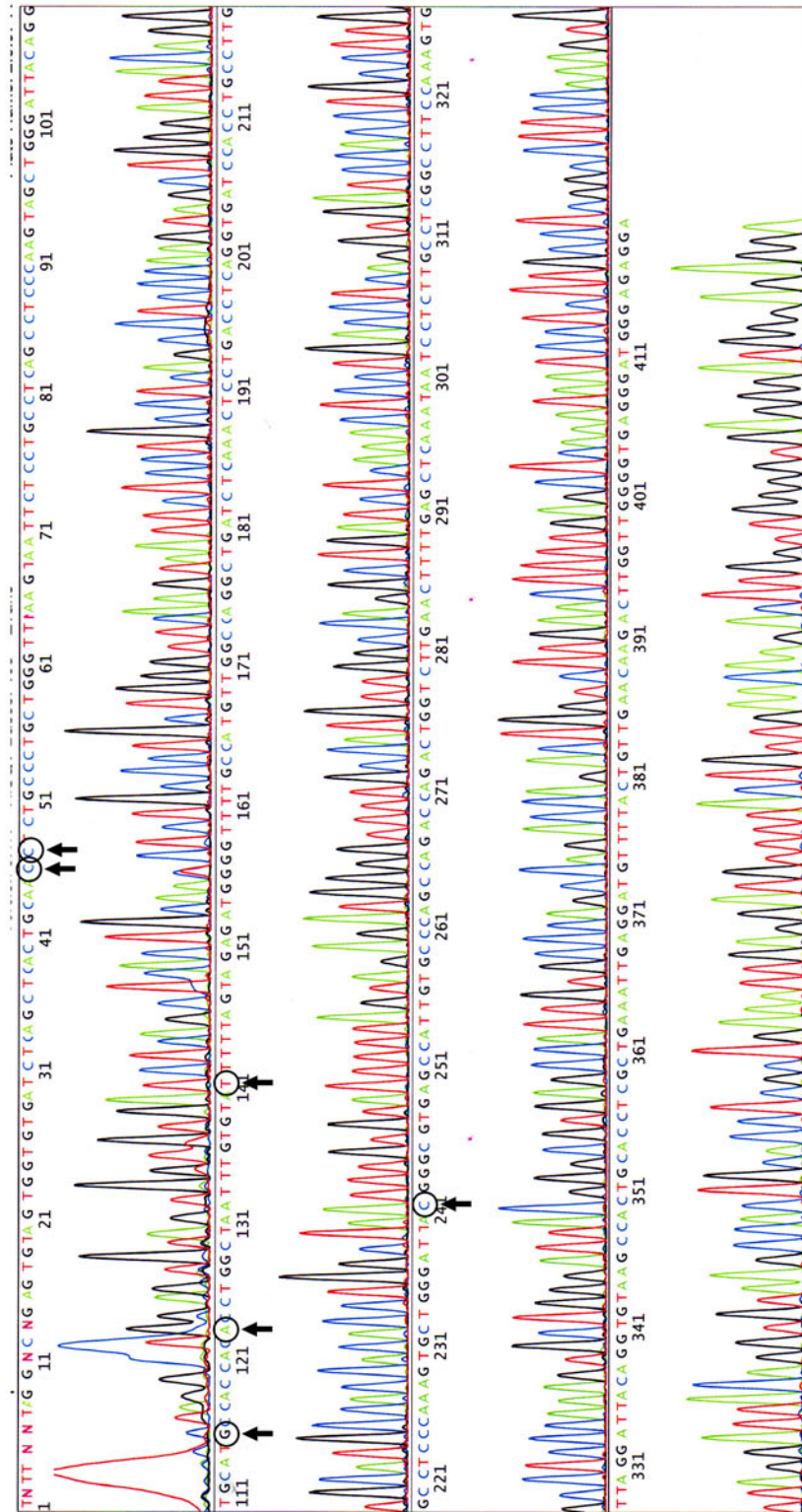


Abb. 5 Sequenz des SSCP-Bandenmusters 5

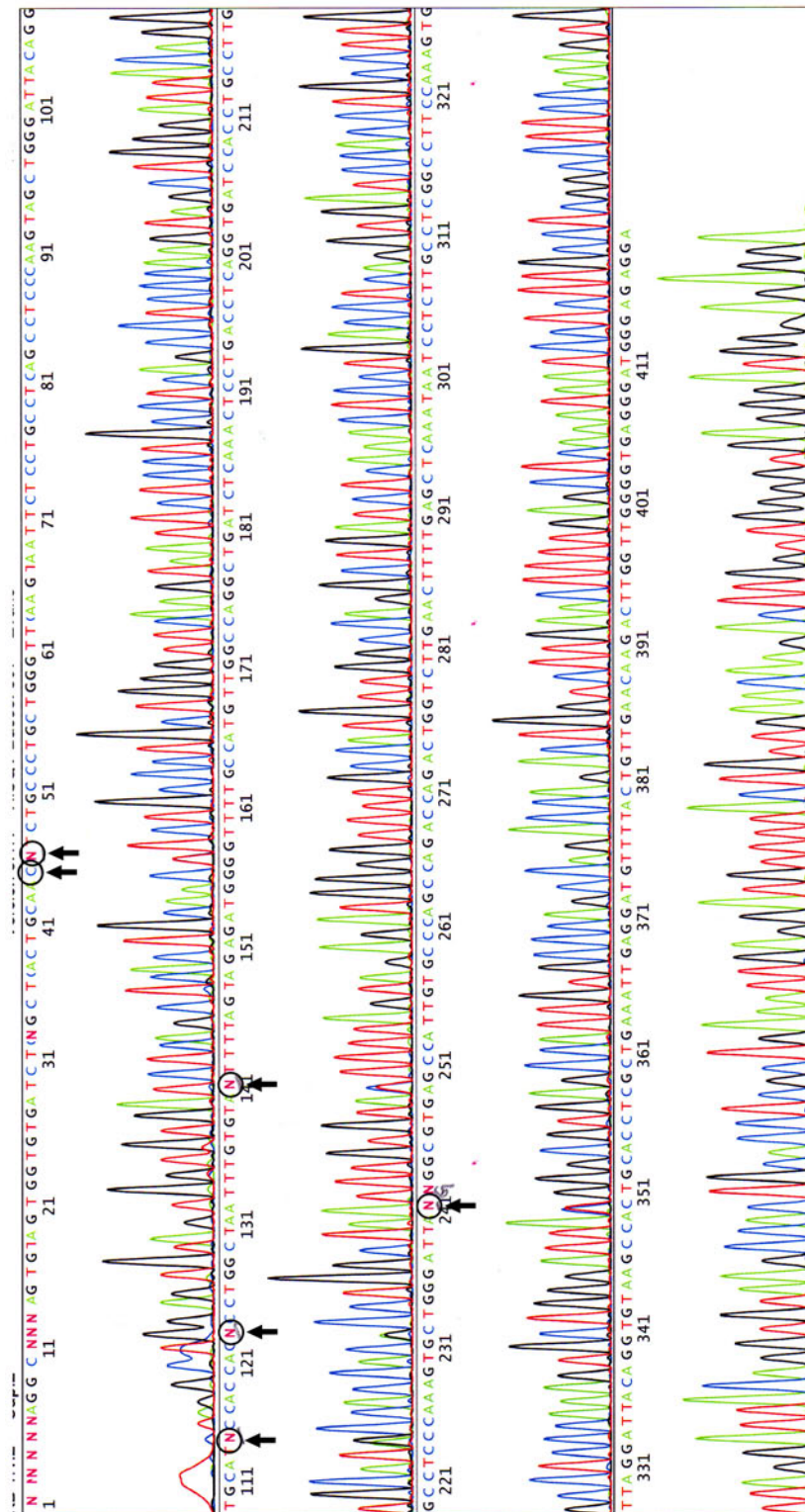


Abb. 6 Sequenz des SSCP-Bandenmusters 6

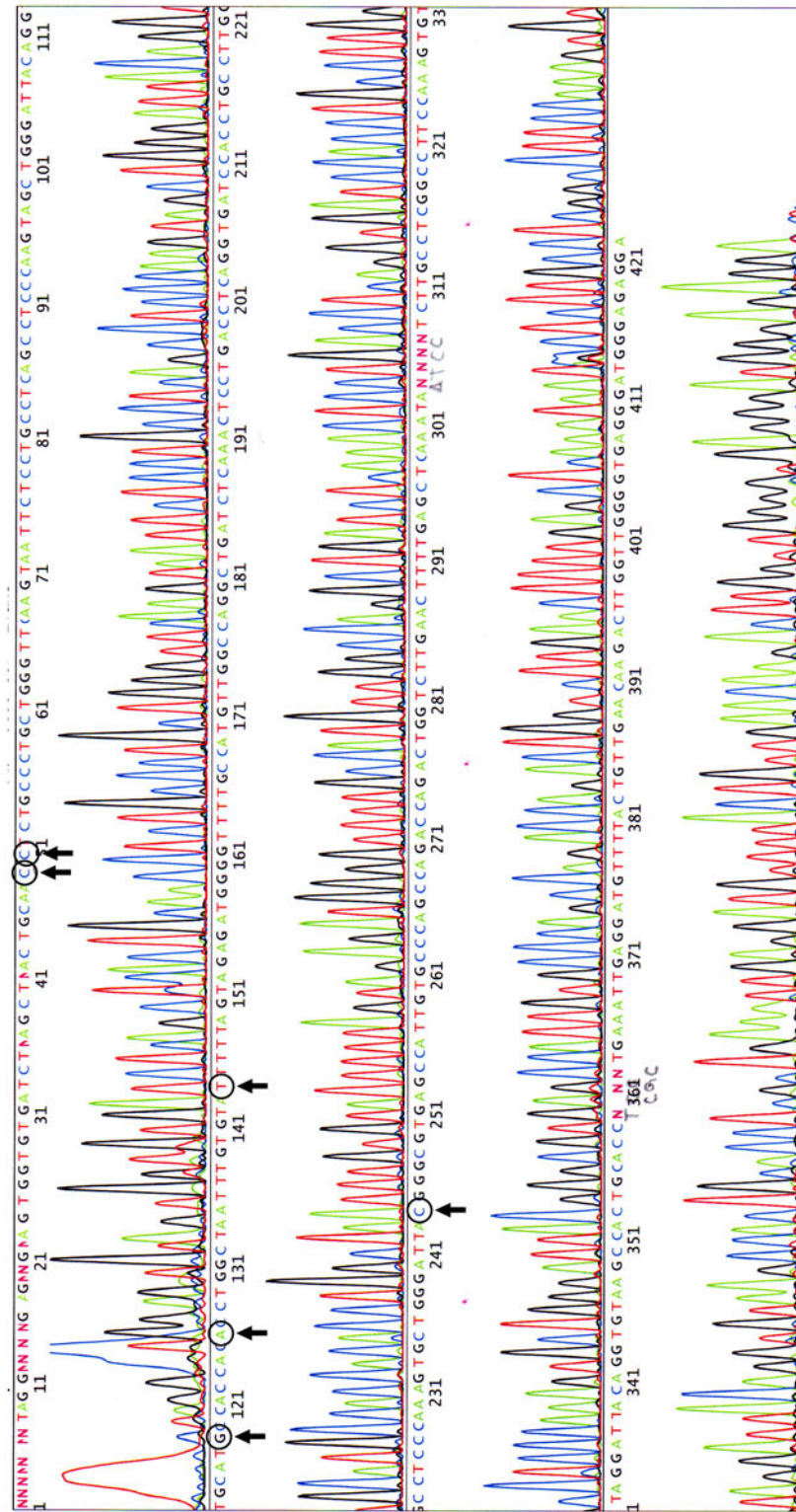
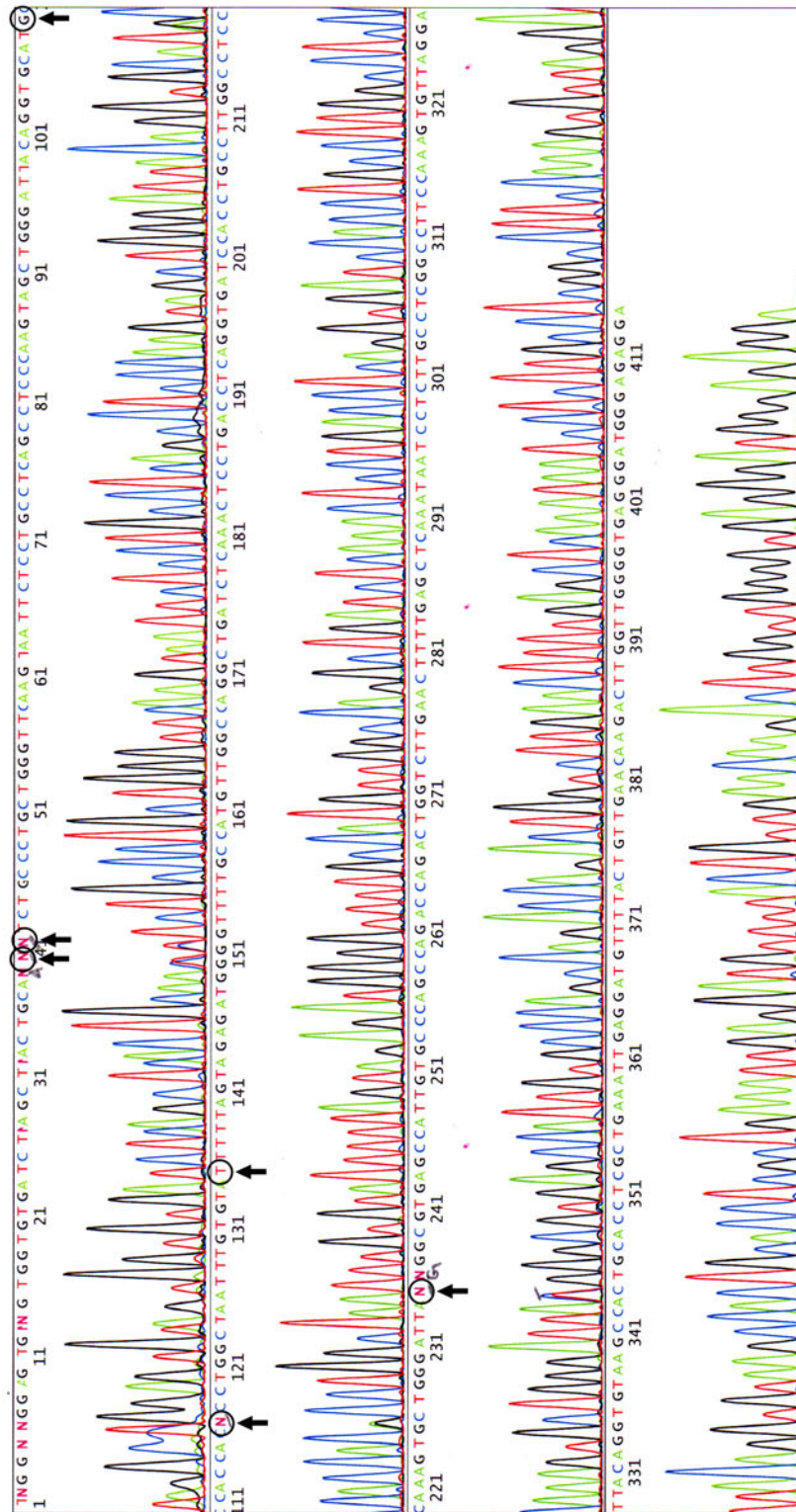


Abb. 7 Sequenz des SSCP-Bandenmusters 7



1
INNNAAGGNNGGGTGTAAGTGGTGATCTNGCTACCTGCAAGTCCCTGCTGGGTNAAGTAACTCTCCTGCCTGACCCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGG
11 21 31 41 51 61 71 81 91 101
GCAACCA(N)CTGGCTAATTTGTGT(TTTTAGAGATGGGGTTTTGCATGTTGGCCAGGCTGATCTCAAACTCTGACCNNGGTGATCCACCTGCCTTGG
111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211
CTCCCAAAGTCTGGGATT(N)NGGCCGTGAGCCATGTGCCCAAGCCAGACCAAGCTGGTCTTGAACCTTTTGGCTCAAAATAATCCTCTTGCCTCGGCCCTCCAAAGTGT
221 231 241 251 261 271 281 291 301 311 321
TAGGATTACAGGTGAAGCCACCTGCAAGCTCGCTGAAATGAGGATGTTTACTCTGTTGAACAAGCTTGGTTGGGGTGAAGGATGGGNGAGGA
331 341 351 361 371 381 391 401 411 4
TAGGATTACAGGTGAAGCCACCTGCAAGCTCGCTGAAATGAGGATGTTTACTCTGTTGAACAAGCTTGGTTGGGGTGAAGGATGGGNGAGGA
331 341 351 361 371 381 391 401 411 4

7 Anhang 2

Legende für Abb. 1-11:

BMI (Body-Mass-Index in kg/m²)

AGE (Alter in Jahren)

TC (Gesamtcholesterin in mg/dl)

TG (Triglyceride in mg/dl)

HDL (HDL-Cholesterin in mg/dl)

LDL (LDL-Cholesterin in mg/dl)

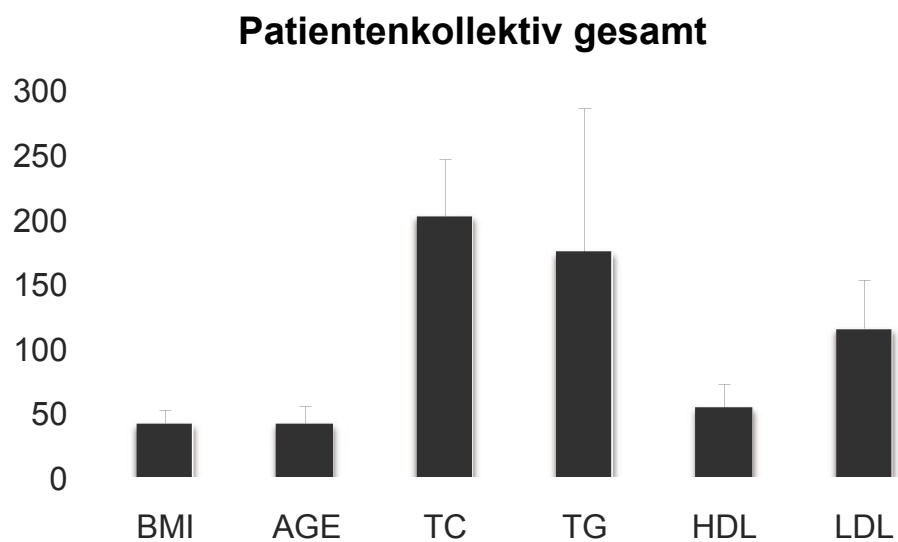


Abb. 1

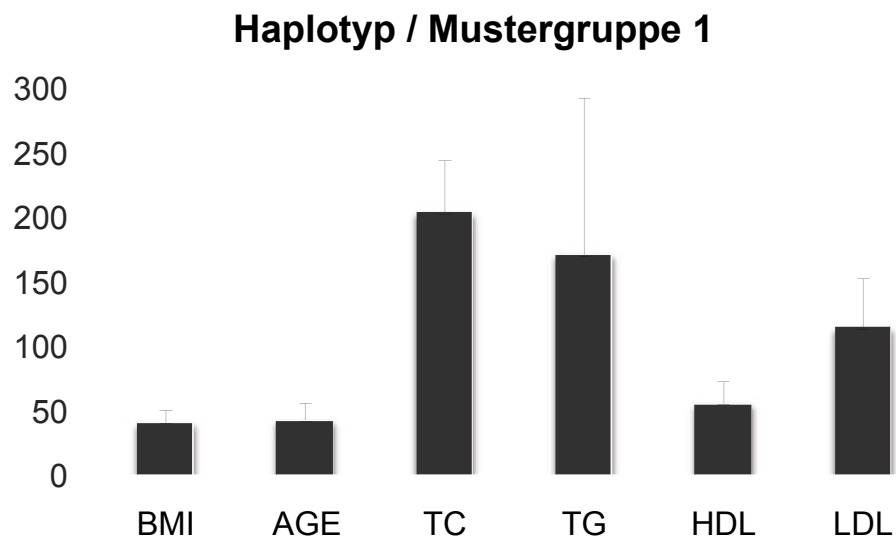


Abb. 2

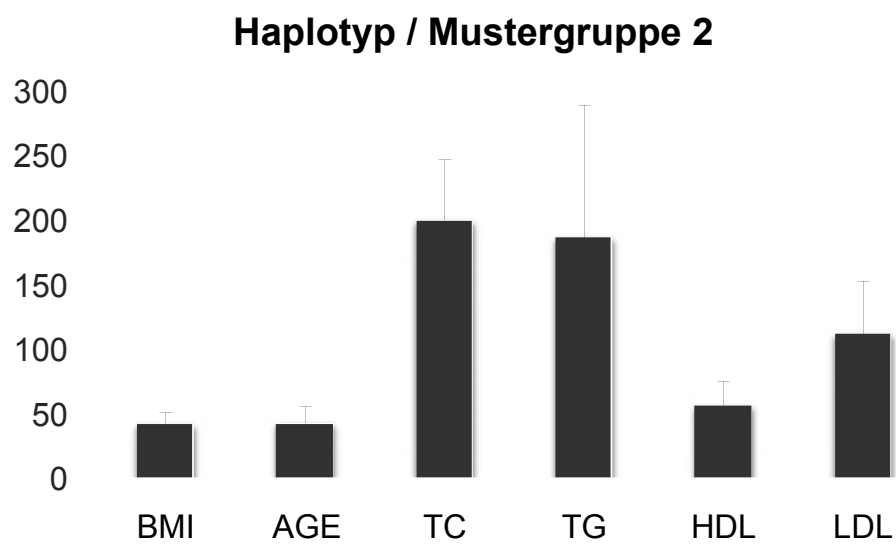


Abb. 3

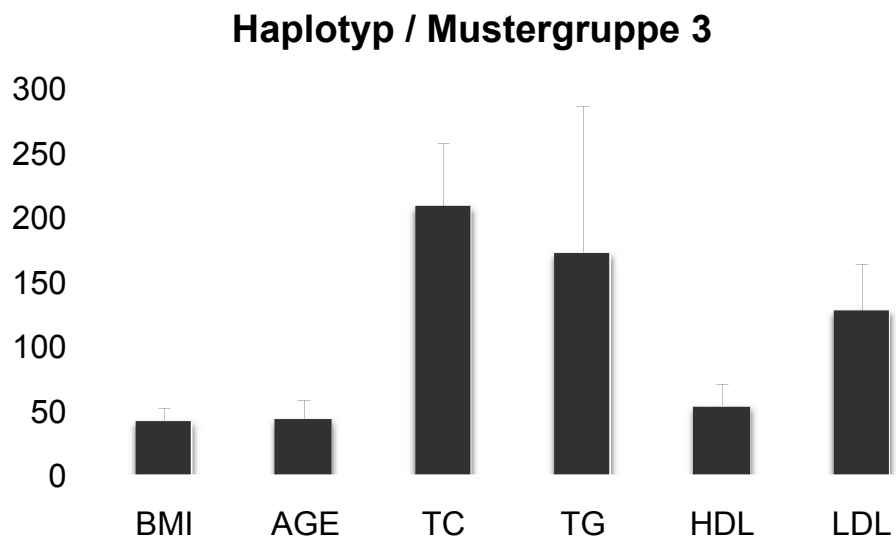


Abb. 4

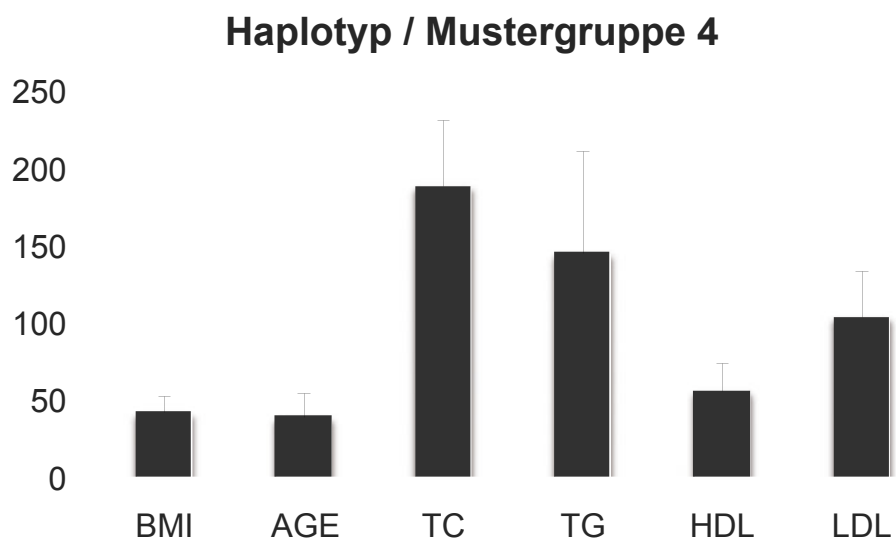


Abb. 5

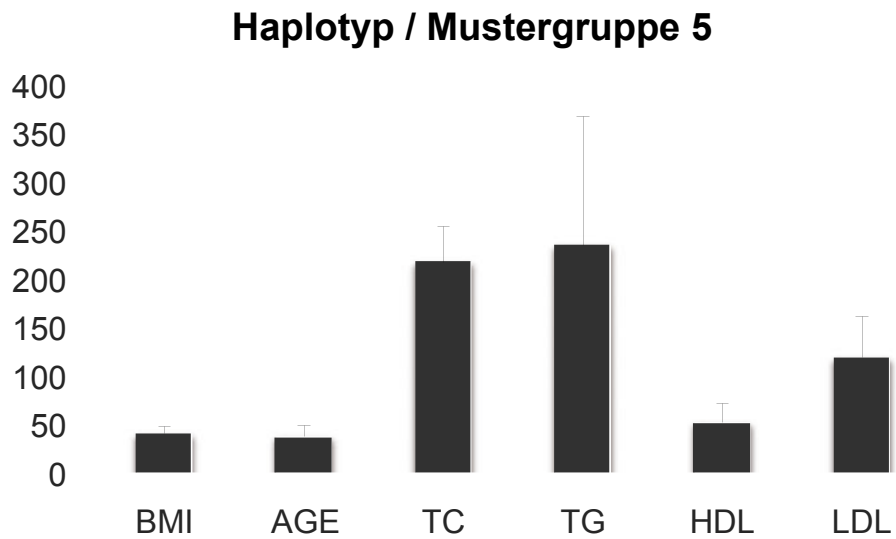


Abb. 6

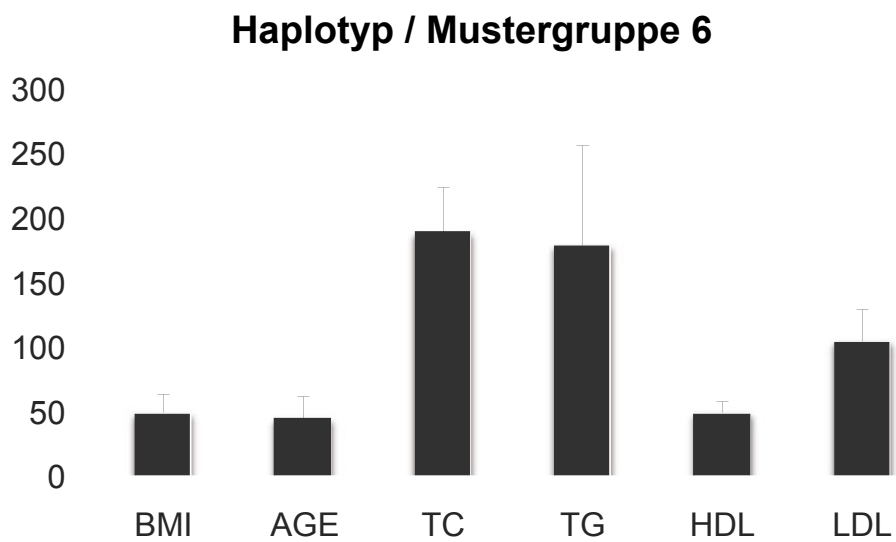


Abb. 7

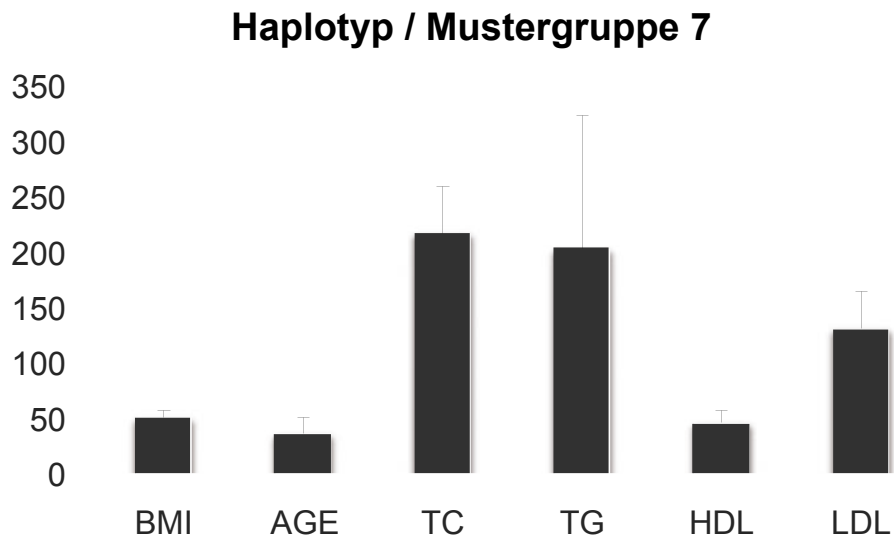


Abb. 8

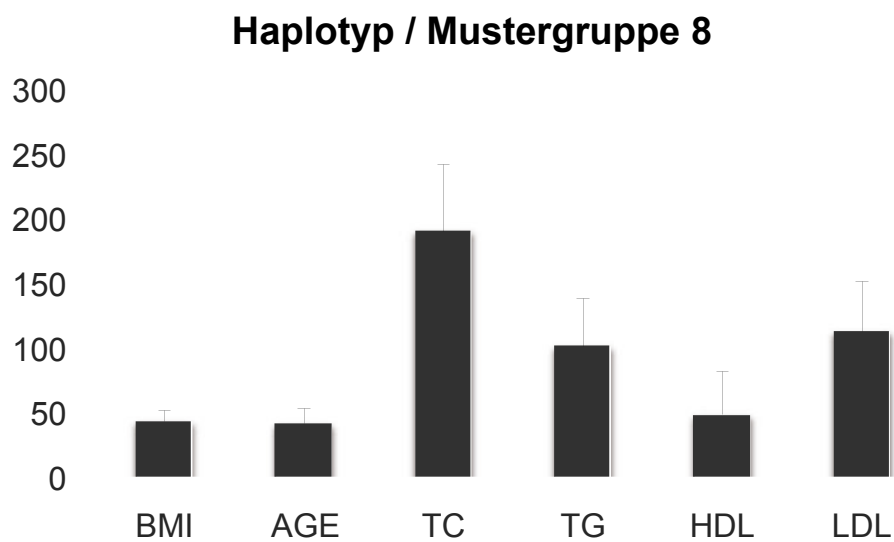


Abb. 9

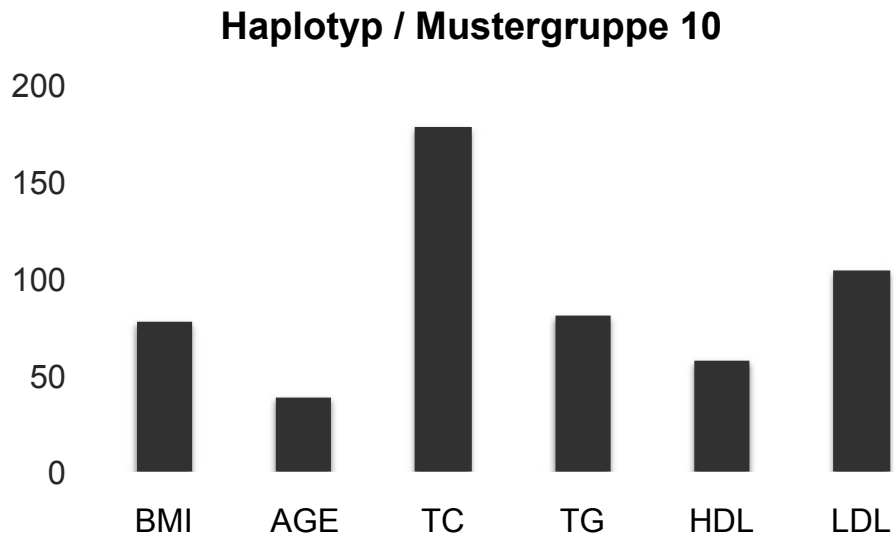


Abb. 10

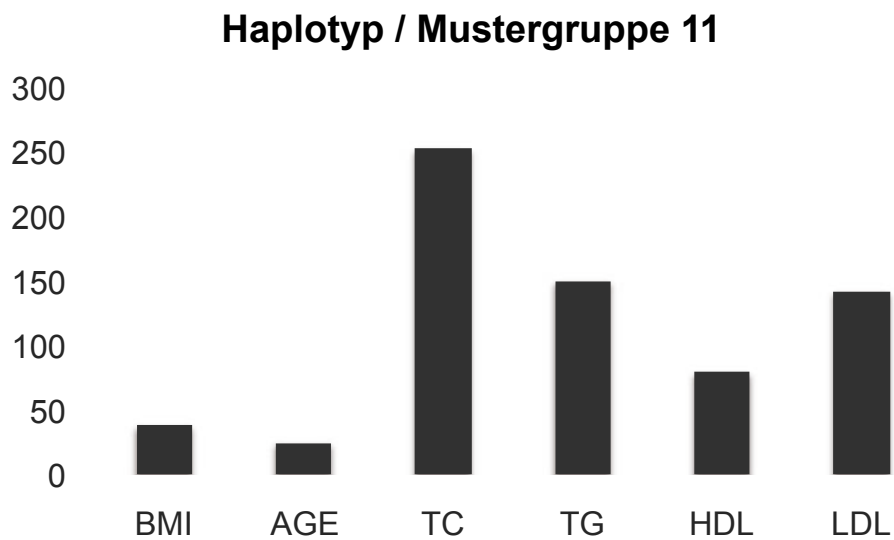


Abb. 11

9 Danksagung

Ich danke zunächst Dr. Dave Evans für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, für die fortwährende Unterstützung bei auftretenden Fragen technischer und theoretischer Art.

Edda George und Christine Koop für die freundschaftliche Einarbeitung, Geduld und konstante Unterstützung in der Laborarbeit, sowie für manches nette Gespräch.

Meinen Eltern für die immerwährende liebevolle und motivierende Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Jan Richter für die Hilfe bei jeglichen Computerproblemen und der Erstellung der Abbildungen.

Hannah Friederike Beil
September 2011

11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift:

Hamburg, September 2011