Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt
Klinische Forschergruppe
Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

Überprüfung der Bedeutung eines Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens für die Entstehung von Über-, Untergewicht und Anorexia nervosa

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Katrin Middeke
aus Duisburg

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 18. April 2002

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold
Referent: Prof. Dr. J. Hebebrand
Korreferent: PD Dr. Rieder

1 Einleitung 1

1.1 Das Körpergewicht 1

1.2 Leptin 1

1.3 Untersuchungsverfahren 3

2 Literaturübersicht 4

2.1 Körpergewicht und dessen Regulation 4

2.2 Formalgenetische Studien zur Körpergewichtsregulation 6

2.3 Adipositas 7

2.4 Anorexia nervosa 8

2.5 Monogene Tiermodelle 10

2.6 Das *obese*-Gen 12

2.6.1 Das *obese*-Gen-Produkt: Leptin 13

2.6.2 Leptin und Gewicht 14

2.6.3 Leptin und Geschlecht 15

2.6.4 Leptin-Transport ins Gehirn und seine Wirkorte 16

2.6.5 Wirkung von Leptin im Gehirn 16

2.6.6 Exkurs: genetische Untersuchungen und statistische Auswertung 18

2.6.7 Kopplungsuntersuchungen am Leptingen 21

2.6.8 Mutationen im Leptingen beim Menschen 25

2.6.9 Monogene Formen der Adipositas durch Mutationen im Leptingen des Menschen 29

2.6.10 Der Leptinrezeptor 31

2.6.11 Andere Wirkungsbereiche von Leptin 32

3 Ziel der Arbeit 38

4 Material und Methoden 39

4.1. Material 39

4.1.1 Probandenrekrutierung 39

4.1.2 Chemikalien 40

4.1.3 Enzyme 41

4.1.4 Puffer und Lösungen 41

4.1.5 DNA-Längenstandard 45

4.1.6 Oligonukleotide 45

4.1.7 Geräte 46

4.2 Methoden 47

4.2.1 DNA-Extraktion 47
4.2.2 Polymerasekettenreaktion 49
4.2.3 DNA-Digestion 54
4.2.4 Gelelektrophorese 55
4.2.5 Sequenzierung des PCR-Produktes 57
4.2.6 Statistik 61

5 Ergebnisse 64

5.1 Untersuchung des Polymorphismus der Position +19 mittels DNA-Digestion 64
5.1.1 PCR-Optimierung 64
5.1.2 DNA-Digestion 64
5.1.3 Gelelektrophorese 65
5.1.4 Genotypen der Probanden 66
5.1.3 Verteilung der Allele des 19A/G-Polymorphismus im Leptingen 67
5.1.4 Der TDT-Test 68

5.2 Sequenzierung 70

6 Diskussion 73

6.1 Methodendiskussion 74
6.1.1 PCR 74
6.1.2 DNA-Digestion 75
6.1.3 Gelelektrophorese 75
6.1.4 Statistische Auswertung 76

6.2 Ergebnisdiskussion 78

6.3 Erweiterte Diskussion 79

6.4 Zusammenfassung 81

7 Zusammenfassung 82

8 Abkürzungsverzeichnis 84

9 Literaturverzeichnis 87

10 Akademische Lehrer 108

11 Danksagung 109

1 Einleitung

1.1 Das Körpergewicht

Das Körpergewicht des Menschen ist ein komplex regulierter Phänotyp, der durch kulturelle, soziale, sozioökonomische, psychologische und metabolische Faktoren beeinflußt wird. Tierexperimentelle Befunde, aber auch Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien deuten auf eine genetische Beteiligung hin [Hebebrand und Remschmidt, 1995a+c]. Auch psychiatrischen Erkrankungen, die mit der Ausbildung eines Gewichtsextrems einhergehen, wie zum Beispiel Anorexia nervosa (AN), werden genetische Ursachen zugeschrieben [Holland et al., 1988; Hebebrand et al., 1995a].
Die Energiebilanz hat Einfluß auf das Körpergewicht. Sie beschreibt einerseits die Zufuhr durch Nahrungsaufnahme und andererseits den Verbrauch des Körpers an Energie. Verhalten sich diese beiden Komponenten im Gleichgewicht, besteht eine ausgeglichene Bilanz, was sich in stabilem Körpergewicht zeigt. Bei negativer Energiebilanz (Verbrauch > Zufuhr) sinkt das Körpergewicht, bei positiver Bilanz steigt es. Dabei spielt das Eßverhalten eine große Rolle. Nur zum Teil ist es kognitiv, also bewußt durch Wissen, Information und die Einstellung, gesteuert. Weitere Dimensionen sind z. B. emotionaler Ursache (Depression, Streßessen) oder biologischer Ursache (genetische Mechanismen). Auf der anderen Seite hat die körperliche Aktivität einen erheblichen Anteil an der Einstellung der Energiebilanz. Zu wenig äußert sich in Gewichtszunahme, zu viel in Gewichtsabnahme [Ellrott und Pudel, 1996].

1.2 Leptin

Bei der Regulation des Körpergewichts handelt es sich um einen komplexen und noch nicht bis ins Detail entschlüsselten Prozeß, bei dem verschiedene Komponenten (z.B. Neuropeptid Y, Melanocorticotropes Hormon und Serotonin) eine Rolle spielen [Hebebrand et al., 1996a; Qu et al., 1996]. Besondere Bedeutung wird dem Leptin zugesprochen, einem in Adipozyten gebildeten Protein, welches langfristig Energieaufnahme und -verbrauch reguliert. Diese Regulatoren funktionieren über Regelkreise, bei denen der Hypothalamus das Regelzentrum ist. Dabei spielen u. a. der Nucleus ventromedialis als „Sättigungszentrum“ und der laterale Hypothalamus als „Eßzentrum“ eine Rolle [Silbernagl und Lang, 1998]. Bei der sogenannten *„Lipostase-*

Hypothese“ wird postuliert, daß die Fettmasse des Körpers mit Hilfe eines von den Fettzellen sezernierten Stoffes (evtl. Leptin) festgestellt wird und Rückkopplungsmechanismen diese Masse über Änderungen von Appetit und körperlicher Aktivität konstant halten (s. Abbildung 1.1).

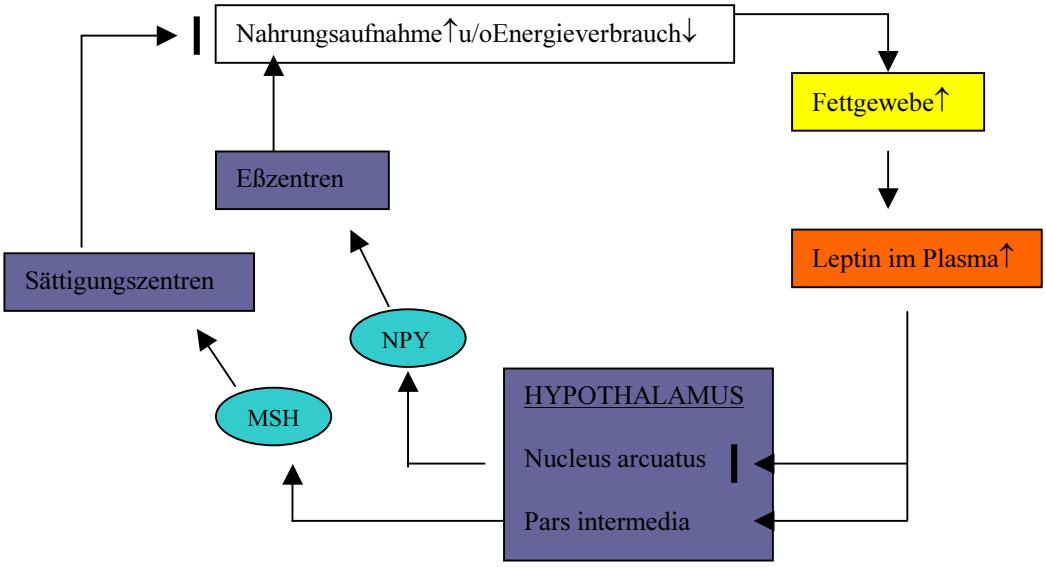

Abbildung 1.1: Regelkreislauf der *„Lipostase-Theorie“* [mod. nach Silbernagl und Lang, 1998]

Leptin erhielt seinen Namen aus dem griechischen (*„leptos“* = „dünn“) [Halaas et al., 1995], weil es als Protein dazu in der Lage ist, das Körpergewicht von Mäusen zu reduzieren. Die schon vor mehr als 40 Jahren postulierte *„Lipostase-Theorie“* [Kennedy, 1953] wird durch Parabiose-Experimente aus den 70er Jahren gestützt, wobei die Kopplung der Blutkreisläufe von normalgewichtigen und adipösen Mäusen (*obese*-Mäuse) zu einer deutlichen Gewichtsabnahme bei den letzteren geführt hat [Coleman, 1978]. Ende 1994 gelang es dann, das *obese*-Gen und sein Genprodukt (Leptin) bei Maus und Mensch zu identifizieren [Zhang et al., 1994]. Seither wird die Rolle dieses Gens sehr intensiv untersucht. Das vorwiegend im Fettgewebe synthetisierte Leptin ist ein 16 Kilodalton Protein, welches bei *ob/ob*-Mäusen nicht vorhanden ist aufgrund von zwei verschiedenen Punktmutationen. Exogen appliziertes Leptin führt bei diesen Mäusen zu Gewichtsabnahme, Abfall der Insulin- und Glukose-Konzentrationen, sowie zur Zunahme von Grundumsatz, Körpertemperatur und Aktivitätsgrad [Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Weigle et al., 1995].

Die Expression der *ob*-mRNA ist bei Mäusen vom Ernährungsstatus abhängig: Fasten verringert die Expression, Wiederfütterung läßt sie wieder ansteigen [Trayhurn et al., 1995a]. Desweiteren korrelieren die *ob*-mRNA-Spiegel mit dem Körpergewicht und der gespeicherten Fettmenge.

Beim Menschen deutet die Kopplung der Leptingen-Region mit extremen Formen von Adipositas auf eine Mutation oder Variante des *ob*-Gens als Ursache extremer Adipositasformen hin [Reed et al., 1996; Clément et al., 1996; Roth et al., 1997; u. a.]. Mittlerweile konnten auch Mutationen im *ob*-Gen identifiziert werden, die mit einem kongenitalen Leptin-Mangel einhergehen und bereits im Kindesalter zu massiver Adipositas, Hyperphagie und Hyperinsulinämie führen [Montague et al., 1997a; Strobel et al., 1998].

Auch beim Menschen korrelieren die *ob*-mRNA-Spiegel mit dem Körpergewicht und der Fettmasse [Hamilton et al., 1995]. Adipöse Personen haben gegenüber schlanken Personen erhöhte Expression, Frauen weisen gegenüber Männern erhöhte Werte auf, was auf eine geschlechtsabhängige Regulation schließen läßt [Lönnqvist et al., 1995]. Bei der Regulation der Leptin-Produktion scheinen auch Insulin und Glukose eine Rolle zu spielen [Boden et al., 1996], weiterhin spielen das sympathische Nervensystem [Trayhurn et al., 1995b], Glukokortikoide [Wabitsch et al., 1996] und NPY [Stephens et al., 1995] eine Rolle bei der Signalübermittlung.

Nach der Identifizierung des Leptingens wurde auch ein leptinbindender Rezeptor bei Maus und Mensch kloniert [Tartaglia et al., 1995]. Es konnte nachgewiesen werden, daß der Phänotyp der *db/db*-Mäuse auf eine defekte Leptin-Rezeptorform und somit fehlende Leptinwirkung zurückzuführen ist [Lee et al., 1996].

1.3 Untersuchungsverfahren

Da das *obese*-Gen und sein Produkt Leptin in Zusammenhang mit der Ausprägung des Phänotyps Körpergewicht zu stehen scheinen, wurde eine Variante im Leptingen auf Assoziation und Kopplungsungleichgewicht in unterschiedlichen Gewichtskollektiven und bei Patientinnen mit Anorexia nervosa untersucht.

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließender Gel-Elektrophorese wurde die aus dem Blut der Probanden extrahierte DNA hinsichtlich eines Polymorphismus im Leptingen untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Körpergewicht und dessen Regulation

Das Körpergewicht des Menschen kann nicht als isolierte Größe betrachtet werden, vielmehr ist es von unterschiedlichen Variablen abhängig, zu denen Körpergröße, Geschlecht und Alter gehören [Gray, 1989]. Anhand von Untersuchungen amerikanischer Lebensversicherungsanstalten wurden Ende der 50er Jahre erstmals Durchschnittsgewichte in Abhängigkeit von Körpergröße, Alter und Geschlecht ermittelt und anhand der längsten Überlebensrate die sogenannten Idealgewichte definiert [Metropolitan Life Insurance, 1959]. Da man diese nicht auf die verschiedenen Populationen übertragen kann, bedient sich die moderne epidemiologische Gewichtsforschung des Body-Mass-Index (BMI oder Quetelet Index). Seine Formel lautet:

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

Der BMI wird verwendet, weil er eine hohe Korrelation zum Körpergewicht (0,6 – 0,8) zeigt, aber nur eine geringe zur Körpergröße (- 0,15). Somit ist es möglich, ein weitgehend körperlängenbereinigtes Gewicht zu erhalten. Mit Hilfe des BMI wurden verschiedene Definitionen zu den Gewichtsklassen erstellt. Die weitest verbreitete ist die nach WHO [1998] (siehe Tabelle 2.1).

Gewichtsklasse	Body-Mass-Index (kg/m²)
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	≥ 25
Präadipositas	25,0 – 29,9
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9
Adipositas Grad III	≥ 40

Tabelle 2.1: Definition der Gewichtsklassen [nach WHO, 1998]

Bei dieser Einteilung der Gewichtsklassen wird allerdings das Alter nicht berücksichtigt. Das Körpergewicht ist aber auch vom Alter abhängig. So nimmt der Erwachsene jährlich ca. 100 - 500 g an Gewicht zu [Hebebrand et al., 1995a]. Abhängig von den verschiedenen Entwicklungsphasen des Menschen weist der BMI deutliche Schwankungen auf [Rolland-Cachera, 1993]. Begründen kann man dies durch einen unterschiedlichen prozentualen Anteil von Fett und fettfreier Masse am Gesamtkörpergewicht in den verschiedenen Entwicklungsphasen [Gray, 1989]. Schwierig ist es daher eine altersunabhängige Definition der Gewichtsklassen zu erhalten und auch den unterschiedlichen Verteilungen von Fett und fettfreier Masse bei Mann und Frau gerecht zu werden. In einigen Ländern wurden aufgrund dessen sogenannte Altersperzentile für beide Geschlechter getrennt eingeführt [z. B.: Coners et al., 1996; Hebebrand et al., 1994]. Sie erlauben es, den BMI eines Menschen in Bezug zur jeweiligen Alterspopulation zu setzen [Hebebrand et al., 1994] (siehe Tabelle 2.2).

Gewichtsklasse	Perzentil
Untergewicht	< 15.
Adipositas	85. – 95.
extreme Adipositas	> 95.

Tabelle 2.2: Altersperzentile für verschiedene Gewichtsklassen [nach Hebebrand et al., 1994]

Der BMI bei Geburt hat eine nachweisbare - wenn auch nur sehr kleine - Vorhersagekraft für den BMI im Erwachsenenalter. Mit zunehmendem Alter steigen die BMI-Korrelationen zum Gewicht Erwachsener an [Rolland-Cachera et al., 1988; Casey et al., 1992].

Im allgemeinen wird angenommen, daß das Körpergewicht hauptsächlich durch Umweltfaktoren reguliert wird, da eine erhöhte Energiezufuhr zu einer Gewichtszunahme führt. Wenn man aber bedenkt, daß bei einer jährlichen Gesamtenergiezufuhr von durchschnittlich 900.000 Kilokalorien das Gewicht nur wenig ansteigt (100 - 500 g), sieht man, daß das Körpergewicht einer strengen Regulation unterliegt [Hebebrand et al., 1995a]. Diese Regulation beruht auf Genotyp-Umwelt-Interaktionen. Eine strikte Einteilung in genetische und Umweltfaktoren ist kaum möglich. Ähnlich wie auch das Ausmaß von körperlicher Betätigung genetischen

Faktoren unterliegt [Pérusse et al., 1989], so unterliegt auch das Körpergewicht genetischen Faktoren (zum Beispiel erhöhte Präferenz für fettreiche Lebensmittel). Zu den Umweltfaktoren zählen: fettreiche Nahrung, mangelnde körperliche Betätigung, übermäßiges Fernsehen, Aufwachsen als Einzelkind oder als Kind alleinerziehender Eltern [Poskitt, 1993].

2.2 Formalgenetische Studien zur Körpergewichtsregulation

Die Beteiligung genetischer Faktoren an der Regulation des Körpergewichts läßt sich anhand verschiedener Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien darstellen. Untersuchungen an getrennt und gemeinsam aufgewachsenen Zwillingspaaren zeigen, daß genetischen Faktoren eine entscheidende Rolle zukommt. Die Intrapaarkorrelation des BMI bei monozygoten Zwillingen beträgt ca. 0,7 (unabhängig vom Geschlecht). Interessanterweise ähneln sich gemeinsam aufgewachsene Zwillinge nicht mehr als getrennt aufgewachsene Zwillinge. Das gemeinsame Aufwachsen hat somit offenbar keinen Einfluß auf den BMI. Ein genetischer Einfluß auf den BMI zeigt sich über das gesamte Gewichtsspektrum [Stunkard et al., 1990].

Bouchard und Mitarbeiter untersuchten mit Zwillingsansätzen Genotyp-Umwelt-Interaktionen. Unter standardisierten Bedingungen wurden eineiige Zwillinge überernährt, für den Zeitraum von 100 Tagen bekamen sie täglich 1000 kcal zusätzlich zum zuvor ermittelten Tagesbedarf. Dabei stellte sich heraus, daß innerhalb der monozygoten Zwillingspaare die Zunahme an Gewicht signifikant ähnlicher war als im Vergleich der Zwillinge insgesamt [Bouchard et al. 1990; Poehlmann et al., 1986].

Andere Studien zur Überprüfung des genetischen Einflusses auf den BMI sind Adoptionsstudien. Dabei zeigt sich, daß der durchschnittliche BMI der leiblichen Eltern in Abhängigkeit vom Gewicht der Adoptivlinge ansteigt. Es zeigen sich Geschlechtsabhängigkeiten: die Beziehung zwischen leiblichen Müttern und Adoptivkindern ist hochsignifikant ($p < 0{,}0001$), die Beziehung zwischen leiblichen Vätern und Adoptivkindern ist gerade signifikant ($p < 0{,}02$). Ein Test zur Trendbestimmung ergibt eine ausgeprägte lineare Komponente für beide leiblichen Eltern [Stunkard et al., 1986].

Der BMI leiblicher Geschwister von Adoptivlingen steigt signifikant in Abhängigkeit vom Gewicht der Adoptivlinge an. Der BMI der Halbgeschwister zeigt einen stetigen,

insgesamt aber schwächeren Anstieg über die verschiedenen Gewichtsklassen der Adoptivlinge hinweg. Die BMIs der leiblichen Geschwister der Adoptivkinder aus der höchsten Gewichtsklasse sind ebenfalls deutlich erhöht, was man als Hinweis darauf wertet, daß es einen stark ausgeprägten genetischen Effekt für die Entstehung der Adipositas gibt [Hebebrand und Remschmidt, 1995a].

Auch für Anorexia nervosa gibt es Zwillingsuntersuchungen: Monozygote weibliche Zwillinge zeigen eine Konkordanz von 55 % und dizygote weibliche Zwillinge von 7 %. Schwere Anorexieverläufe sind nicht signifikant häufiger konkordant gegenüber leichteren Verlaufsformen [Holland et al.; 1984 + 1988]. Heritabilitätsschätzungen ergeben, daß bis zu 75 % genetische Faktoren an der Entwicklung einer Anorexia nervosa beteiligt sind. Fichter [1985] und Schepanek [1992] kommen zu ähnlichen Ergebnissen.

2.3 Adipositas

Adipositas (Fettleibigkeit) resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Kalorienaufnahme und Energieverbrauch zugunsten der Kalorienaufnahme. Als häufigste Ernährungsstörung der westlichen Gesellschaft stellt sie ein großes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar. Vor allem eine stammbetonte Fettverteilung geht mit einer erhöhten Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II, Hiatushernie, Cholezystolithiasis und verschiedenen Malignomen einher [Burton et al., 1985]. Betrachtet man Adipositas aus evolutionsbiologischer Sicht, so scheint es einleuchtend anzunehmen, daß Übergewicht mit einem evolutionären Vorteil einher geht, da übergewichtige Menschen in Hungerperioden bessere Überlebenschancen hatten. Das in westlichen Industrienationen vorhandene Überangebot an hochkalorischer Nahrung stellt allerdings für den Menschen eine neue Situation dar und führt in den letzten Jahrzehnten dazu, daß „dickmachende“ Genotypen sich eher nachteilig auswirken [Hebebrand und Remschmidt, 1995b]. Dennoch ist die Prävalenz von Adipositas in vielen europäischen Ländern in den letzten Jahren angestiegen [Barth et al., 1997; Seidell et al., 1995; Kuskowska-Wolk et al., 1993].

Bei der Adipositas lassen sich verschiedene Formen unterscheiden. Die stammbetonte Adipositas (auch androider oder Apfel-Typ genannt), die hauptsächlich Männer betrifft,

geht dabei vor allem mit den o. g. Erkrankungen einher. Dies ist bei der hüftbetonten Adipositas (auch gynoider oder Birnen-Typ genannt) nicht der Fall. Neben diesen allgemeinen Formen gibt es auch lokalisierte Fettansammlungen, wie z. B. das Vollmondgesicht beim Cushing-Syndrom. Als weitere Beurteilungskriterien ob Adipositas vorliegt, lassen sich neben dem BMI noch die waist-to-hip-ratio (WHR, Taillen/Hüftumfangs-Quotient) und die Dicke von verschiedenen Hautfalten (z. B. über dem M. triceps brachii) hinzuziehen. Dabei sollte z. B. die WHR bei Frauen < 0,85 und bei Männern < 1 sein, um der Entstehung von Begleiterkrankungen vorzubeugen [Füeßl et al., 1998]. Trotz vieler Versuche, Adipositas zu behandeln (mit Diät, Bewegungstherapie oder Medikamenten), gibt es bisher noch keine langfristig effektive Therapieform. Nichts desto trotz verschlingt die Behandlung der Adipositas jährlich viele Millionen DM und es scheint umso nötiger, Kenntniss von den Faktoren zu erlangen, die ursächlich für das Ungleichgewicht im Energiehaushalt verantwortlich sind.

2.4 Anorexia nervosa

Diagnostische Kriterien nach DSM IV:

Nach den internationalen DSM IV-Kriterien [American Psychiatric Association (APA), 1994] gehören zur Diagnose einer Anorexia nervosa (AN) mindestens vier Kriterien. Dazu zählen:

A. *Weigerung, das Minimum des für Alter und Körpergröße normalen Körpergewichts zu halten (z. B. der Gewichtsverlust führt dauerhaft zu einem Körpergewicht von weniger als 85 % des zu erwartenden Gewichts; oder das Ausbleiben einer während der Wachstumsperiode zu erwartenden Gewichtszunahme führt zu einem Körpergewicht von weniger als 85 % des zu erwartenden Gewichtes).*

B. *Ausgeprägte Ängste vor einer Gewichtszunahme oder davor, dick zu werden, trotz bestehenden Untergewichts.*

C. *Störung in der Wahrnehmung der eigenen Figur und des Körpergewichts, übertriebener Einfluß des Körpergewichts oder der Figur auf die Selbstbewertung, oder Leugnen des Schweregrades des gegenwärtigen geringen Körpergewichts.*

D. *Bei postmenarchalen Frauen das Vorliegen einer Amenorrhoe, d. h. das Ausbleiben von mindestens drei aufeinanderfolgenden Menstruationszyklen (Amenorrhoe wird*

auch dann angenommen, wenn bei einer Frau die Periode nur nach Verabreichung von Hormonen, z. B. Östrogen, eintritt).

Zusätzlich zu diesen vier Kriterien kann man noch zwei verschiedene Typen der Anorexia Nervosa unterscheiden:

Restriktiver Typ:

Während der aktuellen Episode der Anorexia Nervosa hat die Person keine regelmäßigen „Freßanfälle" gehabt oder hat kein „Purging"-Verhalten (das heißt selbstinduziertes Erbrechen oder Mißbrauch von Laxantien, Diuretika oder Klistieren) gezeigt.

Binge-Eating/Purging-Typus:

Während der aktuellen Episode der Anorexia Nervosa hat die Person regelmäßig Freßanfälle gehabt und hat Purgingverhalten (das heißt selbstinduziertes Erbrechen oder Mißbrauch von Laxantien, Diuretika oder Klistieren) gezeigt.

Laut ICD - 10 [WHO, 1992] liegt das Gewichtskriterium für eine Anorexia Nervosa ab einem BMI < 17,5 kg/m^2 vor. Diese Definition berücksichtigt in keiner Weise das Alter der Patienten. Auch bei den DSM-IV Kriterien ist es schwer einzuschätzen, wie hoch das zu erwartende Gewicht in jedem individuellen Fall sein sollte. Deshalb sollten auch zur Diagnose der Anorexia nervosa die zuvor beschriebenen Altersperzentile für den BMI herangezogen werden. Nach Hebebrand et al. [1996b] liegen die Gewichtskriterien zur Diagnosestellung der AN zwischen der 5. und 10. Altersperzentile, wobei stationär behandelte Patientinnen meist einen BMI unterhalb der 3. Perzentile haben. Außerdem läßt sich mit Hilfe der Altersperzentile das Problem der Bestimmung eines individuellen Zielgewichtes besser angehen [Hebebrand et al., 1996b]. Die Prognose verschlechtert sich deutlich, wenn im Akutstadium der Erkrankung der BMI auf unter 13 kg/m² fällt [Hebebrand et al., 1997].

Anorexia nervosa kommt gehäuft bei Frauen vor (80 %). Die Inzidenz scheint in den letzten Jahrzehnten steigend zu sein. Der Krankheitsbeginn zeigt zwei Manifestationsgipfel: das 14. und das 18. Lebensjahr. Selten erkranken die Patienten vor der Pubertät oder nach der vierten Lebensdekade. Das Krankheitsbild der AN geht mit verschiedenen somatischen Symptomen einher: Hypothermie, Ödeme, Bradykardie, Hypotonie, Lanugo-Behaarung. Ebenfalls kommt es zu laborchemischen

Veränderungen: Leukopenie, Lymphozytose, Hypoglykämie, Hypercholesterinämie. Die AN stellt eine Bedrohung für alle Körperfunktionen dar. Dies zeigt sich auch darin, daß Störungen der Hormonfunktionen zu einer Pubertätsverzögerung führen können, der Metabolismus der Schilddrüsenhormone gestört wird und es beispielsweise zu einem Anstieg von Kortisol und Wachstumshormonen kommt [APA, 1994].

Neben der Anorexia nervosa, die als schwerwiegende psychiatrische Störung gilt, ließ sich auch bei anderen psychischen Störungen ein Einfluß auf das Gewicht nachweisen. Von 51 männlichen Jugendlichen, die wegen Zwangsstörungen in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie in Marburg behandelt worden sind, lagen ca. ein Drittel unterhalb der 10. BMI-Altersperzentile. Das niedrige Körpergewicht der männlichen Jugendlichen war nur in wenigen Fällen mit einem klinisch auffälligen Eßverhalten assoziiert [Henninghausen et al., 1999]. Die Frage zum pathogenetischen Zusammenhang mit der AN stellt sich dennoch. Möglicherweise führt ein niedriges Körpergewicht bei Mädchen und jungen Frauen relativ schnell zur Diagnosestellung einer AN, während gleichaltrigen Jungen mit einem vergleichbar niedrigen BMI nicht die gleiche Bedeutung zukommt [Hebebrand et al., 1995b].

2.5 Monogene Tiermodelle

Bei der Maus konnten auf verschiedenen Chromosomen sechs Gene identifiziert werden, die im Falle einer Mutation zur Entwicklung von Adipositas oder Untergewicht führen: *Obese* (*ob*), *Fat* (*fat*), *Tubby* (*tub*), *Diabetes* (*db*), *Agouti* (A^y) und *Anorexia* (*anx*) [Friedman et al. 1991 a+b; Hinney et al., 1997c; Son et al., 1994]. Dabei sind für diese Arbeit die *obese*-Maus, die *diabetes*-Maus und die *anorexie*-Maus von besonderer Bedeutung, ihre Phänotypen sollen daher ausführlicher dargestellt werden.

Die Mutation der *obese*-Maus wird autosomal rezessiv vererbt. Sie wurde 1950 erstmals im *Jackson Laboratory* entdeckt [Ingalls et al., 1950]. Phänotypisch zeigt die homozygote *obese*-Maus (*ob/ob*-Maus) eine früh einsetzende Form der Adipositas mit einer Verdopplung bis Verdreifachung des Körpergewichts gegenüber Wildtypmäusen. Dies wird ausgelöst durch Hyperphagie und einen erniedrigten Energieverbrauch. Zu den weiteren Symptomen zählen Diabetes mit schwerer Insulinresistenz, Hypothermie,

Infertilität der Weibchen, Sterilität der Männchen und vermindertes Längenwachstum [Bray et al., 1979].

Die *diabetes*-Maus (*db/db*-Maus) unterscheidet sich phänotypisch nicht von der *obese*-Maus. Bei ihr wurde eine Mutation im Leptin-Rezeptorgen auf dem Chromosom 4 gefunden [Friedman et al., 1991a]. Hinweise darauf, daß es einen Unterschied in der Pathogenese der Adipositas dieser beiden Mäuse gibt, wurden mit den Parabiose-Experimenten von Coleman gefunden. Parabiose bedeutet, daß die Blutkreisläufe zweier Tiere zusammengeschlossen werden. Bei diesen Versuchen fand man, daß die *ob*-Maus abnimmt, wenn man ihren Kreislauf mit dem der *db*-Maus zusammenschließt, die *db*-Maus ihr Gewicht jedoch unverändert hält. Aus diesen Ergebnissen konnte die Vermutung angestellt werden, daß der *ob/ob*-Maus ein Sättigungsfaktor im Blut fehlt, und die *db/db*-Maus den dazu passenden Rezeptor nicht bilden kann [Coleman et al.; 1978]. Die schon 1953 von Kennedy postulierte *„Lipostase-Theorie“* gewann nun wieder an Bedeutung. Demnach informiert ein im Blut zirkulierender Sättigungsfaktor das Zentralnervensystem über den Ernährungsstatus des Körpers um das Körpergewicht konstant halten zu können [Kennedy, 1953].

Mäuse, die homozygot für eine autosomal rezessive Mutation sind (*anx*/*anx*), stellen das Säugen ein und verhungern. Es wird angenommen, daß diese Mutation eine Dysregulation des Serotoninhaushalts zur Folge hat, was zu einer gesteigerten serotonergen Stimulation führt und damit die Nahrungsaufnahme inhibiert. Kloniert werden konnte das dazugehörige Gen jedoch noch nicht [Son et al., 1994].

Seit 1997 werden molekulargenetische Untersuchungen zur Anorexia nervosa durchgeführt. Die Untersuchungen betreffen das serotonerge System, den Neuropeptid-Y Y5-Rezeptor und das Leptingen [Hinney et al., 1997a+1998; Rosenkranz et al., 1998; Lentes et al., 1997]. Bisher fielen die Ergebnisse negativ aus, es konnte noch kein Gen beim Menschen entdeckt werden, das an der Entstehung der Anorexia nervosa beteiligt ist.

Diese Mausmodelle sprechen zum einen für die Beteiligung genetischer Faktoren an der Gewichtsregulation, andererseits machen sie deutlich, daß das Körpergewicht wahrscheinlich durch verschiedene Gene beeinflußt wird.

Für die „Adipositas-assoziierten Gene“ der Maus konnten beim Menschen homologe Regionen ausfindig gemacht werden, die wohl auch beim Menschen zur Gewichtsregulation beitragen und daher als Kandidatengene bezeichnet werden.

1994 gelang es der Arbeitsgruppe um Zhang das *obese*-Gen bei Maus und Mensch zu klonieren [Zhang et al., 1994]. Dies bedeutete einen enormen Aufschwung für die molekulare Adipositasforschung.

2.6 Das *obese*-Gen

Die Isolierung und Sequenzierung des murinen und des menschlichen *obese*-Gens (Leptingen) ergab, daß es jeweils aus 3 Exons und aus 2 Introns besteht. Die kodierende Sequenz liegt jeweils im 2. und 3. Exon, das 1. Exon wird nicht abgelesen. Beim Menschen kodiert es für ein 167 Aminosäuren großes Protein. Es konnte festgestellt werden, daß es bei Mensch und Maus sehr ähnlich aufgebaut ist. Die Nukleotidsequenzen sind dabei zu 83 % identisch, die sich ergebenden Aminosäuresequenzen zu 84 % [Zhang et al., 1994; He et al., 1995; Isse et al., 1995; Gong et al., 1995].

Vor dem ersten Exon liegt ein Promoter. Dies ist ein bestimmter DNA-Bereich am Anfang eines Gens der als Erkennungs- und Bindestelle für die RNA-Polymerase der Transkription [Knippers, 1995] dient und verschiedene regulatorische Bereiche enthält, die den Vorgang der Transkription kontrollieren. Um die Aktivität eines Promoterbereiches zu testen, wird der putative Promoterbereich vor ein sogenanntes Reportergen kloniert. Die Aktivität des Reportergens gibt Auskunft über die Promoteraktivität. Mit dieser Methode kann man auch feststellen, wie groß der minimale Promoterbereich sein muß. Untersuchungen beim menschlichen *obese*-Gen zur Promoterfunktion an einer 3 kb großen Region flankierend zum 5´-Ende konnten zeigen, daß eine Region von nur 300 bp eine stärkere Luziferase-Aktivität (das hier verwandte Reportergen) bewirkt als die gesamten 3 kb. Das könnte darauf hindeuten, daß der Rest der Sequenz eher inhibitorische Wirkung hat [Gong et al.; 1995]. In einem 172 bp großen Bereich am 5´-Ende des Gens konnten mehrere cis-aktive Regulatoren, eine TATA-Box-ähnliche Sequenz und eine Bindungsstelle für C/EBP nachgewiesen werden. Diese Strukturen sind wichtige Voraussetzungen für eine gute Promoteraktivität [Isse et al., 1995]. Die optimale Promoteraktivität benötigt allerdings mindestens 217 bp als essentiellen Promoter. Herausgefunden werden konnte dies durch den Vergleich der Expression von Luziferase in Fettgewebszellen und Zellen anderen Ursprungs. Bei Vorhandensein von dem Adipozyten-spezifischen Regulationsprotein C/EBPα wird die

Genexpression stimuliert. Eine Mutation in der Bindungsstelle für dieses Protein führt zu einer reduzierten Genexpression [Miller et al., 1996].

Mutationssuchen im Leptingen normalgewichtiger und adipöser Mäuse (*ob/ob*-Mäuse) fanden bei letzteren zwei verschiedene Mutationsformen. Bei der C57B6J*ob/ob*-Maus wurde ein Cytosin zu Thymin Austausch identifiziert, der dazu führt, daß statt Einbaus eines Arginins eine vorzeitige Termination der Leptin-Synthese erfolgt. Im Serum dieser Tiere wurden 20-fach erhöhte Konzentrationen eines biologisch inaktiven Proteins gefunden [Zhang et al., 1994].
Bei der SM/Ckc-$+^{Dac}ob^{2J}/ob^{2J}$-Maus konnte die Insertion eines Transposons im ersten Intron des Leptingens nachgewiesen werden, die dazu führt, daß keine *ob*-mRNA gebildet wird und somit auch kein Leptin [Moon und Friedman, 1997].
Die Ergebnisse der oben genannten Untersuchungen führten dazu, daß Experimente mit rekombinantem *ob*-Protein gemacht wurden. Dabei wurde sowohl normalgewichtigen wie auch *ob/ob*-Mäusen täglich intraperitoneal rekombinantes *ob*-Protein injiziert. Daraufhin nahmen die Tiere wesentlich weniger Nahrung zu sich und ihr Energieverbrauch stieg an. Die *ob*/*ob*-Mäuse hatten nach nur zwei Wochen 30 % ihres Gewichtes verloren, die normalgewichtigen Mäuse 12 %. Auch diese Ergebnisse bestärkten die Vermutung, daß man mit dem *ob*-Protein einen im Blut zirkulierenden Sättigungsfaktor gefunden hatte. Die Ergebnisse führten auch zur Namensgebung des *ob*-Proteins: Leptin (von dem griechischen Wort „*leptos*“: dünn) [Halaas et al., 1995].

2.6.1 Das *obese*-Gen-Produkt: Leptin

Leptin, das Produkt des *obese*-Gens ist ein 16 Kilodalton Protein, welches mit seinem helikalen Aufbau an verschiedene Zytokine erinnert [Madej et al., 1995]. Das Leptingen wird vor allem in Adipozyten exprimiert, wobei die Expression bei übergewichtigen im Gegensatz zu normalgewichtigen Probanden stark erhöht ist und im Allgemeinen bei Frauen stärker als bei Männern ausgeprägt ist [Lönnqvist et al., 1995]. Es wird aber unter anderem auch in der Plazenta [Masuzaki et al., 1997; Señaris et al., 1997] und im Gehirn [Esler et al., 1998] synthetisiert und dann in die Blutbahn sezerniert. Die pulsatile Sekretion [Licino et al., 1997] unterliegt tageszeitlichen Schwankungen [Sinha et al., 1996; Saad et al., 1998], dabei zeigen die Werte nachts gegen 2.30 Uhr einen

höchsten Stand und einen niedrigsten mittags gegen 13.00 Uhr. Nach dem Frühstück kommt es zu einem Abfall der Leptinkonzentration, nach den anderen Mahlzeiten konnte dies nicht beobachtet werden. Leptin zeigt verschiedene Charakteristika eines Sektretionsproteins [Mac Dougald et al., 1995], für das mittlerweile verschiedene Bindungsproteine im Blut nachgewiesen werden konnten [Houseknecht et al., 1996].
Leptin ist ein relativ kleines Protein und wie Proteine ähnlicher Größe wird es letztlich über glomeruläre Filtration, mit nachfolgendem metabolischen Abbau in den Tubuli der Niere, ausgeschieden [Cumin et al., 1997].

2.6.2 Leptin und Gewicht

Experimente mit normalgewichtigen Mäusen ergaben, daß es eine Beziehung zwischen dem Ernährungsstatus der Tiere und der *ob*-mRNA-Expression gibt. Nach oder während einer Fastenperiode fällt der *ob*-mRNA-Spiegel ab, um dann bei erneuter Fütterung wieder anzusteigen [Trayhurn et al., 1995a; Mac Dougald et al., 1995]. Ähnliche Mechanismen konnten auch beim Menschen nachgewiesen werden [Maffei et al., 1995; Boden et al., 1996; Kolaczynski et al., 1996a; Considine et al., 1996a]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, daß Überfütterung zu einem Anstieg der Leptinspiegel führt [Kolaczynski et al., 1996b]. Untersuchungen haben ergeben, daß der mittlere Serum-Leptinspiegel bei Übergewichtigen im Allgemeinen höher liegt als bei normalgewichtigen Probanden (31,3 ± 24,1 ng/ml vs. 7,5 ± 9,3 ng/ml). Untersucht man zum Beispiel den Anteil des Fettes am Gesamtkörpergewicht bei Mäusen und bei Menschen, so findet man eine positive Korrelation zwischen Leptinspiegeln und diesem Parameter, aber auch zwischen Leptin und BMI [Maffei et al., 1995; Considine et al., 1996a; Kolaczynski et al., 1996b]. Dies klingt einleuchtend, wenn man bedenkt, daß Leptin überwiegend in Fettzellen hergestellt wird. Untersuchungen an Athletinnen, Kontrollen und Diabetes-mellitus-Typ-II Patienten wiesen eine signifikante Korrelation zwischen Leptin und dem Prozentanteil Körperfett bei allen Probanden nach [Ryan und Elahi, 1996].

2.6.3 Leptin und Geschlecht

Allgemein ist festzustellen, daß die Serum-Leptin-Konzentrationen bei Frauen signifikant höher sind als bei Männern, egal ob man Übergewichtige oder Normalgewichtige vergleicht, wenn man die Gruppen durch den BMI definiert [Considine et al., 1996a]. Ostlund et al. fanden 1996 heraus, daß die nüchtern gemessenen Leptinwerte bei Frauen drei mal so hoch sind wie bei Männern. Vergleicht man post- und prämenopausale Frauen miteinander, so findet man, daß die Leptinwerte bei prämenopausalen Frauen höher sind als bei postmenopausalen Frauen [Rosenbaum et al., 1996].
Allerdings ist nicht das genetische Geschlecht, sondern vielmehr das vorherrschende Milieu von Geschlechtshormonen, ausschlaggebend für die unterschiedlichen Leptinspiegel, wie Untersuchungen an Transsexuellen zeigen [Elbers et al., 1997]. Gibt man männlich-zu-weiblich Transsexuellen über 1 Jahr Ethinylestradiol und Cyproteronacetat, so steigen die Leptinwerte bei diesen – genetisch männlichen – Individuen an. Umgekehrt führt die Gabe von Testosteron an weiblich-zu-männlich Transsexuelle zum Abfall der Leptinkonzentrationen.
Zum Zeitpunkt der Geburt zeigen sich noch keine geschlechtlichen Unterschiede der Leptinkonzentrationen [Koistinen et al., 1997], zu diesem Zeitpunkt bestehen aber auch noch keine Unterschiede bezüglich der Geschlechtshormone [Yuen und Mincey, 1987].

Aus den oben genannten Ergebnissen könnte man schlußfolgern, daß adipöse Personen mit hohen Spiegeln des Sättigungsfaktors Leptin dauernd gesättigt sein müßten. Da dies nicht so ist, scheint der Regelkreis von Leptin bei adipösen Patienten nicht richtig zu funktionieren.
In Bezug auf die Frage, über welchen Mechanismus es zu einem Sättigungsgefühl kommen kann, wurde schon 1979 die Vermutung aufgestellt, daß der Hypothalamus, eine zentralnervöse Region im Zwischenhirn, ein Kontrollzentrum der Nahrungsaufnahme darstellen könnte [Bray et al., 1979].

2.6.4 Leptin-Transport ins Gehirn und seine Wirkorte

Direkte Injektion von Leptin in die Seitenventrikel des Gehirns bei *ob*-Mäusen und auch bei schlanken Kontrolltieren hat die gleichen Erfolge wie periphere Verabreichung (s. o.), nur daß die Effekte sehr viel schneller – bereits nach 30 Minuten wird die Nahrungsaufnahme für bis zu 6,5 Stunden eingestellt – erfolgen. Leptin erzielt seine Wirkung also durch direkte Einwirkung auf neuronale Vorgänge [Campfield et al., 1995].

Untersuchungen haben ergeben, daß Leptin über ein unilaterales, sättigbares Transportsystem ins Gehirn gelangt [Caro et al., 1996; Banks et al., 1996]. Die Kapazität dieses Systems scheint bei Übergewichtigen geringer zu sein und könnte ein Mechanismus der Leptinresistenz sein. Es gibt weiterhin Hinweise, daß Leptin im Serum an Trägerproteine gebunden ist, die für den Transport und die Funktion mit verantwortlich sind. Bei Adipösen ist der Anteil an ungebundenem (möglicherweise funktionell weniger aktivem) Leptin erhöht, was auch zur Leptinresistenz bei Adipositas beitragen könnte [Houseknecht et al., 1996].

Das intakte Leptin wird vorwiegend in den Plexus Choroideus und den Nucleus arcuatus des Hypothalamus aufgenommen, wo sich auch der Leptin-Rezeptor befindet [Jacob et al., 1997; Brabant et al., 1996; Tartaglia et al., 1995; Mercer et al., 1996].

2.6.5 Wirkung von Leptin im Gehirn

Mittlerweile ist bekannt, daß Leptin mit verschiedenen Neuropeptiden des Hypothalamus, wie z. B. Neuropeptid Y (NPY), Melanozyten-stimulierendes Hormon (MCH), Pro-opiomelanocortin (POMC), Interleukin-1 (IL-1) u. a. in Wechselwirkung steht [Mizuno et al., 1998; Wolf, 1997; Luheshi et al., 1999]. Allerdings sind die genauen Funktionen und Mechanismen dieser Wechselwirkungen noch nicht bis in alle Einzelheiten geklärt. Es folgt beispielhaft eine Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zu NPY und MCH:

Neuropeptid Y (NPY): NPY ist bekannt als ein Peptid, welches - hauptsächlich im Nucleus arcuatus des Hypothalamus gebildet - die Nahrungsaufnahme stimuliert und die

Thermogenese vermindert [Zarjevski et al., 1993; Billington et al., 1991; Mercer et al., 1996].

Bei Behandlung von *ob/ob*-Mäusen mit Leptin nimmt im Gehirn die Anzahl der Neurone, die das Neuropeptid-Y (NPY) exprimieren, ab [Stephens et al., 1995]. In den meisten Tiermodellen für Adipositas sind die hypothalamischen Konzentrationen von NPY hoch und intrazerebroventrikuläre Injektion von NPY in hoher Konzentration verursacht Übergewicht in normalen Ratten. Niedrige Konzentrationen haben einen gegenteiligen Effekt [Rohner-Jeanrenaud, 1996].

Die durch Leptin-Mangel ungehemmte NPY-Expression bei *ob/ob*-Mäusen spielt eine zentrale Rolle bei der Ausbildung ihres charakteristischen Phänotyps [Erickson et al., 1996]. Gleichzeitige intracerebroventrikuläre Injektion von Leptin und NPY vermindert die durch NPY induzierte Nahrungsaufnahme bei *ob/ob*-Mäusen, nicht aber bei schlanken Mäusen [Mistry et al., 1997].

Leptin-Behandlung reduziert die NPY-Konzentration in hypothalamischen Gebieten. Ebenso wird die Expression von mRNA herabgesetzt. Andersherum führt 5-tägige intracerebroventrikulare Gabe von NPY dazu, daß die Tiere viel fressen und an Gewicht zunehmen. Reduzierte NPY-Freisetzung in den paraventrikulären Kernen könnte also die hypophagen und thermogenen Effekte von Leptin vermitteln [Wang et al., 1997].

MCH: Ein anderer Mechanismus scheint über Melanin-konzentrierendes-Hormon (MCH) gesteuert zu werden. MCH ist ebenfalls überexprimiert in *ob/ob*-Mäusen und zeigt in hohen intrazerebroventrikular verabreichten Dosen auch einen Appetit stimulierenden Effekt [Qu et al., 1996]. Allerdings haben subkutane Leptin-Infusionen einen stimulierenden Effekt auf das neuronale MCH-System, die mRNA-Level für MCH im Hypothalamus steigen in Leptin-behandelten Mäusen an und sind in der Summe bei übergewichtigen Mäusen höher als in schlanken Tieren. In den übrigen Gehirnbereichen aber erhöht Leptin die MCH-Konzentration bei den schlanken Tieren und vermindert die Konzentration bei den adipösen Tieren. Diese Ergebnisse lassen sich also nicht damit vereinbaren, daß MCH einen direkten Einfluß auf die gewichtsreduzierenden Eigenschaften von Leptin hat, sie schließen aber auch nicht vollständig aus, daß MCH etwas mit dem Energiehaushalt zu tun hat [Qu et al., 1996].

Nachdem nun die Struktur des Leptingens aufgeklärt war, und viele Untersuchungen auf eine Verbindung zwischen dem Leptingen, Leptin und der Körpergewichtsregulation

hinwiesen, folgte die Untersuchung des Gens beim Menschen. So könnten wie bei der Maus Veränderungen in der Sequenz des menschlichen Gens eine Ursache für die Entstehung von Adipositas oder auch Untergewicht sein.

2.6.6 Exkurs: genetische Untersuchungen und statistische Auswertung

Zum besseren Verständnis der im weiteren Verlauf besprochenen Untersuchungen am Leptingen des Menschen hinsichtlich Kopplung, Assoziation und Mutationssuche, soll zunächst auf die genetischen Untersuchungsmethoden und ihre statistischen Auswertungen eingegangen werden.

Kopplung, Assoziation, Kopplungsungleichgewicht: Um chromosomale Regionen einengen oder entdecken zu können, in denen sich funktionsrelevante DNA-Varianten befinden, werden in der genetischen Statistik zwei verschiedene Ansätze verwendet. Das sind Kopplung und Assoziation. Bei beiden wird eine Abweichung vom Mendelschen Gesetz der unabhängigen Vererbung ermittelt. Kopplung stellt dabei eine Beziehung zwischen 2 Loci dar. Je näher die Loci beieinander liegen, desto häufiger werden sie gemeinsam (gekoppelt) vererbt [Passarge, 1994]. Geschieht dies häufiger oder seltener als nach der individuellen Häufigkeit der beteiligten Allele zu erwarten wäre, so spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht. Rekombination führt zur Bildung von neuen Kombinationen gekoppelter Allele durch Crossing-over zwischen den Loci. Der Abstand zwischen Genloci wird in Centimorgan (cM) gemessen, wobei 1 cM einer Rekombinationshäufigkeit von ca. 1 % entspricht. Je weiter die Genloci voneinander entfernt liegen, desto häufiger kommt es zur Rekombination. Kopplungsuntersuchungen führt man mit Hilfe von Familienstudien durch. Kopplung kann nur detektiert werden, wenn der Abstand zum Marker weniger als 10 cM beträgt [Passarge, 1994; Böddeker und Ziegler, 2000]. Kopplungsuntersuchungen werden vor allen Dingen zur Entdeckung chromosomaler Regionen mit funktionsrelevanten DNA-Varianten angewandt.

Assoziation dagegen stellt eine Beziehung zwischen Allelen und Phänotypen dar. Die Ausprägung einer Krankheit kann mit dem Vorliegen eines bestimmten Allels assoziiert sein, das Allel kommt bei kranken Personen häufiger vor als in der gesunden Bevölkerung. Man vergleicht Fall- und Kontrollgruppen (z. B. Patienten und Gesunde)

miteinander. Der Abstand der Marker zum Gen muß in der Regel deutlich kleiner als 1 cM sein, damit eine Assoziation detektiert werden kann.

Assoziation kann aus unterschiedlichen Gründen auftreten:

1. Ein Allel kann direkt eine Prädisposition für eine Krankheit bzw. einen Phänotyp verursachen.
2. Liegen zwei Polymorphismen bzw. Varianten eng beieinander, können sie gekoppelt sein. Dabei ist nur einer der beiden Polymorphismen von funktioneller Relevanz, der andere ist nur zufällig an den ersten gekoppelt und hat selber keinerlei Einfluß auf die Ausprägung des Phänotyp.
3. Menschen mit einem bestimmten Phänotyp und Menschen ohne diesen bestimmten Phänotyp sind aus genetisch unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen, die sich gleichzeitig auch in der Häufigkeit eines bestimmten Allels unterscheiden (Stratifikation). Es stellt ein Problem für die Auswertung von Assoziationsuntersuchungen dar, wenn man Probanden aus unterschiedlichen genetischen Bevölkerungsgruppen untersucht oder miteinander vergleichen will. Beispiel: Lander und Schork (1994) nennen eine Assoziation zwischen HLA-A1 und der Fähigkeit mit Stäbchen zu essen. Die Ursache hierfür ist lediglich eine Häufung von HLA-A1 bei Chinesen, durch die eine Scheinassoziation auftritt.

Diese Punkte machen deutlich, daß die Wahl der Kontrollgruppen entscheidend dafür ist zu vermeiden, falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu erhalten [Strachan und Read, 1996]. Häufig wird synonym für „Assoziation“ der Begriff „Kopplungsungleichgewicht“ verwendet. Dieser beschreibt aber eher eine mögliche Ursache für Assoziation, nämlich das überzufällig häufig gemeinsame Auftreten zweier Loci.

Mit Hilfe von Assoziationsstudien mit internen Kontrollen, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, geht man diesen Problemen weitestgehend aus dem Weg. Ein häufig in der Praxis angewandter Test ist der *Transmission Disequilibrium Test* (TDT), der Assoziations- und Kopplungsansatz kombiniert und gleichzeitig auf Kopplung und Kopplungsungleichgewicht zwischen Marker und Phänotyp testet [Spielmann et al., 1993]. Für diesen Test werden Trios, bestehend aus einem Probanden und dessen leiblichen Eltern, untersucht. Dabei sind ausschließlich heterozygote Eltern informativ. Verglichen werden die Häufigkeiten der an die Nachkommen transmittierten und nicht-

transmittierten Allele. Zusätzlich zur Assoziationsinformation der nicht-transmittierten elterlichen Allele nutzt der Test auch die Kopplungsinformation, die in der Segregation der elterlichen Allele auf das erkrankte Kind enthalten ist. Die Idee des TDT ist zu vergleichen, ob ein spezifisches Allel überzufällig häufig von einem heterozygoten Elternteil auf das erkrankte Kind transmittiert wurde. Sind nämlich der genetische Marker und die Krankheit nicht assoziiert oder gekoppelt, erwartet man eine Transmissionsrate des spezifischen Allels von 50 % auf das erkrankte Kind. Der TDT zeigt Kopplung nur, wenn auch Assoziation vorliegt; durch das ausschließliche Verwenden von Familientrios gibt es keine Stratifikation [Strachan und Read, 1996].

Tests wie der TDT können auch mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern durchgeführt werden. Diese bestehen aus kurzen repetetiven DNA-Sequenzen im nicht kodierenden Bereich des Genoms. Gibt es viele verschiedene Ausprägungen der Repeatanzahl an einem Locus, so spricht man von einem hochpolymorphen Marker. Mittlerweile sind im menschlichen Genom eine große Anzahl dieser Mikrosatelliten bekannt, die zu Kopplungsuntersuchungen herangezogen werden. Mit Hilfe solcher informativer Marker kann man ein Gen noch erheblich genauer analysieren, wenn sie auf beiden Seiten des Gens zur Verfügung stehen. Tritt ein spezieller Haplotyp, also eine Kombination von Allelen zweier Marker, fast immer mit einer Mutation in einem Gen gemeinsam auf, so spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht. Ein Kopplungsungleichgewicht ist entstanden, weil die Mutation ursprünglich bei einer Person mit einem bestimmten Haplotypen auftrat. Mutation und Haplotyp blieben dann in der Nachkommenschaft dieses Menschen verbunden, wenn der Abstand so klein ist, daß die Rekombinationsrate $\leq$ 1 % ist [Watson et al., 1993]. Durch den identischen Haplotypen bei mehreren Individuen mit demselben Phänotypen kann vermutet werden, daß diese Personen auch dieselbe Mutation/Variante tragen. Nachfolgende Mutationssuchen können solche Mutationen/Varianten identifizieren.

Man führt also zunächst Kopplungsuntersuchungen durch, um in größeren Studien eine Kandidatenregion zu ermitteln. Bei einem positiven Ergebnis führt man nun eine Feinkartierung durch, um ein Kandidatengen zu identifizieren, sodann kann man eine systematische Mutationssuche durchführen.

2.6.7 Kopplungsuntersuchungen am Leptingen

1995 beschrieben Green et al. acht Mikrosatelliten-Marker flankierend zum humanen Leptingen. Mit Hilfe dieser Marker konnten andere Arbeitsgruppen dann Kopplungsuntersuchungen bei Probanden mit Adipositas und mit verschiedenen mit Adipositas assoziierten Phänotypen (z. B. Diabetes-mellitus-Typ-II) durchführen.

Positive Kopplungsergebnisse: Bei einer Untersuchung von 101 französischen Familien, die aufgrund eines übergewichtigen Indexprobanden (BMI > 35 kg/m²) rekrutiert wurden, ergab sich mit drei von acht untersuchten Markern positive Kopplung zum Phänotyp Adipositas. Die Marker, für die in der Familienstudie Kopplung ermittelt wurde, liegen in einem Bereich von 2 cM um das Leptingen. Wenn das Geschwister des Indexprobanden einen BMI > 30 kg/m^2 aufwies, fand sich keine Kopplung. Unter der Einbeziehung nur solcher Geschwister, die einen BMI > 32,5 kg/m² aufwiesen, fand sich hingegen Kopplung. Statistisch noch deutlicher war die Kopplung bei ausschließlichem Verwenden von Geschwistern mit einem BMI > 35 kg/m². Es ließ sich feststellen, daß nur bei extrem übergewichtigen Geschwisterpaaren eine Kopplung nachgewiesen werden konnte [Clément et al., 1996].

Auch bei Geschwisterpaaren mit extremer Adipositas (BMI > 40 kg/m²) konnte Kopplung nachgewiesen werden. Unter Verwendung des TDT zeigte sich, daß ein bestimmter Haplotyp (D7S504-145 bp und D7S1875-214 bp) aus Markern, die den Leptingen-Lokus einschließen, vermehrt von heterozygoten Eltern an die extrem adipösen Nachkommen weitergegeben wurde. Hier zeigte sich ein Transmissionsungleichgewicht [Reed et al., 1996].

Erhärtet werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an einer Studiengruppe mit extremer Adipositas in Deutschland [Roth et al., 1997]. Bei den Probanden handelte es sich um 88 nicht verwandte Kinder und Jugendliche (mittleres Alter 14 Jahre ± 2,3) mit BMIs von 32 ± 6 kg/m², sowie ihre Eltern. Ein Kopplungsungleichgewicht mit dem oben beschriebenen Haplotypen konnte mit Hilfe des TDT nachgewiesen werden (p-Wert = 0,039).

Duggirala et al. [1996] rekrutierten 32 mexikanisch-amerikanische Familien über einen Indexpatienten mit Diabetes-mellitus-Typ-II und testeten sie auf den Zusammenhang zwischen verschiedenen mit Übergewicht assoziierten Phänotypen (z. B. Dicke von Hautfalten an Extremitäten und Körperstamm, Fettmasse, Taillenumfang und BMI) und

verschiedenen metabolischen Parametern (z. B. Plasma-Glukose, Serum-Insulin) mit der Region des Leptingens. Die Analyse von Geschwisterpaaren ergab potentielle Kopplung zwischen einzelnen dieser Marker und verschiedenen der vorgenannten Phänotypen. Zum Beispiel ist die Dicke der Extremitäten-Falten mit einer Region in der Nähe des Markers D7S514 gekoppelt. Bei den metabolischen Parametern waren die Höhe der jeweiligen Serumspiegel von intaktem Proinsulin, 32,33-geschnittenem Proinsulin und 2-Stunden-postchallenge Insulin gekoppelt zu einer Region in der Nähe des Mikrosatelliten-Markers für humane Carboxypeptidase A1 (HCPA1). Diese Ergebnisse könnten auf einen Zusammenhang zwischen sowohl den Spiegeln von Insulin-Vorstufen im Serum als auch mit den mit Übergewicht assoziierten Phänotypen und dem Genort des Leptingens hinweisen

Die Ergebnisse der positiven Kopplungsbefunde faßt Tabelle 2.3 zusammen (siehe Seite 23).

Negative Kopplungsergebnisse: Bray et al. [1996] untersuchten ebenfalls eine Gruppe von mexikanisch-amerikanischen Probanden mit Übergewicht. Untersucht wurden 177 übergewichtige Individuen (BMI > 30 kg/m²). Diese Arbeitsgruppe konnte keine Kopplung zwischen Übergewicht und den benutzten Mikrosatelliten-Markern finden. Dieses Ergebnis steht jedoch in keinem Widerspruch zu der Arbeit von Clément et al., die eine Kopplung erst ab einem BMI von mindestens 32,5 kg/m^2 feststellten. Andere Untersuchungen konnten zwar keine Kopplung feststellen, jedoch eine Assoziation zwischen einem Mikrosatelliten-Marker (D7S530) und Serum-Leptinwerten nachweisen [Oksanen et al., 1997a]. Ebenfalls konnte von dieser Arbeitsgruppe eine statistisch signifikante Relation zwischen zwei Markern (D7S649, D7S2519) und der Gewichtsabnahme nach einer 16-wöchigen Diät gezeigt werden.

Es gibt noch weitere negative Befunde zu Kopplungsuntersuchungen im Bereich des Leptingens [Stirling et al., 1995; Norman et al., 1996; Oksanen et al., 1997b; Shintani et al., 1996], die Kopplung nicht nur zum BMI, sondern auch zu verschiedenen mit Adipositas assoziierten Phänotypen testeten. Die wichtigsten Ergebnisse dazu faßt Tabelle 2.4 (siehe Seite 24) zusammen.

Autor	Studiengruppe	Marker	Resultat
Clément et al.; 1996	übergewichtige Geschwister aus 101 französischen Familien (BMI des Indexprobanden > 35 kg/m²)	D7S680 D7S530 D7S514	Kopplung mit extremem Übergewicht
Duggirala et al.; 1996	579 Individuen aus 32 mexikanisch - amerikanischen Familien von Patienten mit Diabetes-mellitus-Typ-II	15 Marker, u. a.: D7S514 HCPA1 D7S530 D7S635 D7S644	Kopplung der nebenstehenden Marker mit verschiedenen Phänotypen
Reed et al.; 1996	78 Familien: BMI ≥ 40 kg/m² bei mindestens einem Geschwister BMI ≥ 30 kg/m² bei einem weiteren Geschwister ein schlankes Geschwister und ein schlankes Elternteil	D7S504 D7S1875	Haplotyp, der mit extremem Übergewicht gekoppelt ist
Roth et al.; 1997	88 deutsche Familientrios (Proband mit mittlerem BMI von 32 ± 6 kg/m² und beide Eltern)	D7S504 D7S1875	Kopplungsungleichgewicht (TDT) unter Verwendung der Haplotypen von Reed et al.; siehe Reed et al.; 1996

Tabelle 2.3: Zusammenfassung der positiven Kopplungsuntersuchungen

Autor	Studiengruppe	Marker	Resultat
Stirling et al.; 1995	346 Geschwister aus 176 mexikanisch - amerikanischen Familien mit Diabetes-mellitus-Typ-II 110 ethnisch und geographisch gematchte Kontrollen	D7S514 D7S635	keine Kopplung keine Assoziation
Bray et al.; 1996	177 übergewichtige Geschwister aus 64 mexikanisch - amerikanischen Familien (BMI ≥ 30 kg/m²)	D7S635 D7S1875	keine Kopplung
Norman et al.; 1996	716 Geschwister aus 217 Kernfamilien von Pima Indianern mit Diabetes-mellitus-Typ-II	D7S530 HCPA2	keine Kopplung zu Übergewicht und Energiemetabolismus
Shintani et al.; 1996	69 japanische Probanden mit Diabetes-mellitus-Typ-II 84 japanische Kontrollen	D7S3039	keine Kopplung
Oksanen et al.; 1997a	252 extrem übergewichtige finnische Probanden (BMI ≥ 40 kg/m²) 95 davon mit Diabetes-mellitus-Typ-II 151 gesunde finnische Kontrollen (BMI ≤ 25 kg/m²)	8 Marker, u.a. D7S530 D7S649 D7S2519	keine Kopplung, keine Assoziation zum BMI; Assoziation des Markers D7S530 mit Leptinkonzentrationen (Allel 5: verminderter Leptin-Spiegel; Allel 7: erhöhte Leptin-Spiegel) Assoziation Marker D7S649 und D7S2519 mit der Höhe an Gewichtsverlust nach 16-wöchiger Diät
Oksanen et al.; 1997b	76 adipöse Geschwisterpaare (BMI ≥ 32 kg/m²)	D7S630 D7S1875 D7S530	keine Kopplung

Tabelle 2.4: Zusammenfassung der negativen Kopplungsuntersuchungen

Obwohl man bei den vorgenannten Kopplungsuntersuchungen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen gekommen ist, deren Ursache zum Beispiel in der Beobachtung von unterschiedlichen Phänotypen oder auch von verschiedenen ethnischen Gruppen liegen könnte, bestärken diese Kopplungsanalysen insgesamt dennoch die Vermutung, daß das Leptingen an der Gewichtsregulation beteiligt ist. Verschiedene Arbeitsgruppen haben dies als Anlaß genommen, das Leptingen auf Mutationen hin zu untersuchen.

2.6.8 Mutationen im Leptingen beim Menschen

Bei ersten Untersuchungen 1995 an jeweils 5 schlanken und fünf übergewichtigen Probanden konnten Considine et al. keine Mutationen nachweisen. 1996 führte die Arbeitsgruppe eine weitere Untersuchung durch. Bei 106 untersuchten Probanden (68 Übergewichtige mit mittlerem BMI > 27,3 kg/m² [Männer], bzw. > 27,8 kg/m² [Frauen] und 38 schlanke Personen mit mittlerem BMI 23,9 ± 0,4 kg/m²) konnte eine Mutation, die eine Änderung der Aminosäuresequenz von Valin zu Methionin an Position 94 (Val-94-Met) bewirkt, bei einem adipösen Probanden gefunden werden (BMI 32,1 kg/m^2) [Considine et al., 1995 + 1996b]

Maffei et al. [1996] konnten keine Mutationen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen, im menschlichen Leptingen nachweisen. Diese Gruppe hat bei 105 übergewichtigen Probanden (BMI > 38 kg/m²) aus verschiedenen ethnischen Gruppen (Details siehe Tabelle 2.5) die kodierenden Sequenzen des Leptingens untersucht. Eine einzige stumme Variation (Basenaustausch der nicht zu einer Änderung der Aminosäurefolge führt) wurde bei einem Probanden entdeckt.

Niki et al. [1996] untersuchten die DNA von japanischen und indischen Personen im Bereich der kodierenden Regionen des Leptingens. Insgesamt 75 Patienten mit Diabetes-mellitus-Typ-II und Übergewicht (BMI > 25 kg/m²), 40 Diabetes-mellitus-Typ-II Patienten ohne Übergewicht (BMI < 25 kg/m²) und 34 Probanden mit Übergewicht (BMI > 25 kg/m²) wurden untersucht. Es konnten keine Mutationen in den kodierenden Bereichen des Gens nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß keine häufigen Mutationen im Leptingen vorkommen.

1998 berichten Hager et al. über eine Variante, die sie im 1. Exon des Leptingens gefunden haben. Es handelt sich um einen A zu G-Austausch an Position 19 der DNA-Sequenz des Leptingens. Assoziationsanalysen konnten keinen signifikanten Beweis für

eine Assoziation zwischen BMI und dieser Mutation zeigen. Es stellte sich heraus, daß übergewichtige Probanden, die homozygot für die Mutation waren, signifikant niedrigere Leptinwerte hatten als die übergewichtigen Probanden, die entweder homozygot für den Wildtyp (A-Allel) oder heterozygot waren [Hager et al., 1998].

Karvonen et al. berichten über 2 übergewichtige Probanden (BMI 34,0 bzw. 38,2 kg/m²) mit verschiedenen Mutationen (G144A und G328A), die bei beiden Probanden mit niedrigen Leptinwerten assoziiert sind. Beide Probanden waren heterozygot für die jeweilige Mutation. Zu Übergewicht konnte keine Assoziation hergestellt werden [Karvonen et al., 1998].

1999 werden drei Sequenzvariationen in der 5´flankierenden Region an den Positionen +19, -1823 und –2548 gefunden, deren Allelfrequenzen bei Übergewichtigen und Normalgewichtigen unterschiedlich waren [Li et al.; 1999].

Durch künstliche Konstruktion von Punktmutationen im menschlichen Leptingen fanden Verploegen et al. [1997] mehrere Mutationen, die die Bindung von Leptin beeinflussen, bzw. sich auf die biologische Aktivität von Leptin auswirken.

Die Resultate zu den Mutationssuchen werden in Tabelle 2.5 (Seite 27 + 28) ausführlich zusammengefaßt. Dort finden sich auch weitere Arbeiten, die im Text nicht genannt wurden.

Autor	Studiengruppe	Resultate
Considine et al., 1995	5 gesunde übergewichtige Probanden (mittlerer BMI 42,8 ± 2,7 kg/m²); 5 gesunde schlanke Probanden (mittlerer BMI 22,4 ± 0,8 kg/m²)	keine Mutationen
Considine et al., 1996b	68 übergewichtige Probanden (mittlerer BMI 40,9 ±1,5 kg/m²) 38 normalgewichtige Probanden (mittlerer BMI 23,9 ± 0,4 kg/m²)	Val-94-Met bei einem Probanden (BMI 32,1 kg/m²)
Maffei et al., 1996	17 übergewichtige Probanden (mittlerer BMI 38,0 ± 3,1 kg/m²) 22 Pima Indianer (mittlerer BMI 49,7 ± 6,6 kg/m²) 20 pädiatrische Patienten aus Boston (Körpergewicht > 60% über dem Idealgewicht) 26 übergewichtige Patienten (BMI 43,8 ± 2,6 kg/m²) 20 Patienten mit Diabetes-mellitus-Typ-II ohne Übergewicht	1 stumme Mutation Entdeckung eines Polymorphismus [$(TG)_6CATATTT(GT)_{19}$], der für weitere Kopplungsanalysen herangezogen werden könnte
Niki et al., 1996	54 japanische und 21 indische übergewichtige Probanden mit Diabetes mellitus Typ II (BMI 29,2 ± 4,0 kg/m² bzw. 31,8 ± 3,9 kg/m²) 34 japanische und 6 indische normalgewichtige Probanden mit Diabetes mellitus Typ II (BMI 21,8 ± 2,2 kg/m² bzw. 22,2 ± 1,1 kg/m²) 34 japanische übergewichtige Probanden ohne Diabetes mellitus Typ II (BMI 31,9 ± 5,1 kg/m²)	keine Mutationen
Carlsson et al., 1997	94 Schweden (BMI 38 ± 4 kg/m²) 6 Kinder die nach OP im Hypothalamusbereich adipös wurden	keine Mutationen
Echwald et al., 1997a	156 männliche übergewichtige Kaukasier (BMI > 31 kg/m²) 380 gesunde normalgewichtige Kaukasier	Phe-17-Leu bei einem übergewichtigen Probanden; Val-110-Met bei einem normalgewichtigen Probanden; A zu G-Austausch 9 Basen nach dem Stop-Kodon bei einem normalgewichtigen Probanden;
Oksanen et al., 1997b	249 extrem übergewichtige Probanden (mittlerer BMI 42,9 ± 7,1 kg/m²) 141 schlanke Probanden (mittlerer BMI 22,3 ± 1,9 kg/m²)	C188A Allelfrequenzen: 0,06 bei Übergewichtigen; 0,09 bei Normalgewichtigen
Shigemoto et al., 1997	60 übergewichtige Japaner (BMI ≥ 43,6 kg/m²) mit Diabetes mell. Typ II 24 übergewichtige Japaner (BMI ≥ 30 kg/m²) mit vermind. Glucosetoleranz	1 stumme Mutation

Tabelle 2.5: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Mutationssuche im Leptingen beim Menschen (Fortsetzung auf Seite 28)

Autor	Studiengruppe	Resultate
Verploegen et al., 1997	künstlich konstruierte Mutationen	Arg-128-Gln, Arg-20-Gln, Asp-40-Asn, Ser-127-Asp
Hager et al., 1998	24 übergewichtige Probanden (BMI > 40 kg/m²)	A zu G-Austausch an Base 19 des 1. Exons
Hinney et al., 1998	315 extrem adipöse Kinder und Jugendliche (mittlerer BMI 32,62 ± 5,85 kg/m²) 49 jugendliche Patientinnen mit Anorexia nervosa (mittlerer BMI 14,59 ± 1,7 kg/m²)	Ser-91-Ser (keine Änderung der Aminosäuresequenz) Glu-126-Gln -1387 G/A in der LEGLUR-Region (leptin gene linked upstream region)
Karvonen et al., 1998	200 übergewichtige Finnen; BMI 34,7 ± 3,8 kg/m²	G144A und G328A, beide assoziiert mit niedrigen Leptin-Werten; A19G C538T
Mammès et al., 1998	117 übergewichtige Kaukasier (mittlerer BMI 33,2 ± 5,4 kg/m²)	mehrere Polymorphismen in der 5´-untranslatierten Region: C-2549A; T-2437G; C-1887T; C-1823T; G-1387A; C-633T; C-188A; G19A
Li et al., 1999	125 nicht verwandte extrem übergewichtige Probanden (BMI ≥ 40 kg/m²) 86 normalgewichtige Probanden (BMI < 27 kg/m²)	Kodon 102: AAC/AAT (stumme Mutation) mehrere Polymorphismen in der 5´flankierenden Region: +19, -188 – 633, - 1823, - 1963, - 2548, - 476, -477, -570, -1447, -2094, -2570, - 2575, -2672, -2793

Tabelle 2.5: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Mutationssuche im Leptingen beim Menschen **(**Fortsetzung von Seite 27)

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen systematischen Mutationssuchen gelangten andere Arbeitsgruppen durch Rekrutierung von Probanden mit niedrigen Leptinspiegeln zu sehr interessanten Ergebnissen:

2.6.9 Monogene Formen der Adipositas durch Mutationen im Leptingen des Menschen

1997 untersuchte die Arbeitsgruppe um Montague zwei extrem übergewichtige, blutsverwandte, pakistanische Kinder, deren Leptinspiegel an der unteren Nachweisgrenze lagen. Die Kinder zeigten ein normales Geburtsgewicht, aber schon bald nahmen sie aufgrund der sehr ausgeprägten Hyperphagie stark an Körpergewicht zu. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Kinder acht bzw. zwei Jahre alt und hatten jeweils ein Körpergewicht über dem 99,6. Altersperzentil (86 kg bzw. 29 kg) und einen Körperfettanteil von 57 % bzw. 54 %. Im Wachstum lagen beide auf dem 75. Altersperzentil. Sequenzierung ergab, daß beide Kinder homozygot für eine Mutation (Deletion eines Guaninnucleotids in Kodon 133) im Leptingen sind. Dies führt zu einer Leserasteverschiebung mit einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese durch ein Stop-Kodon. Die vier Eltern zeigten jeweils einen heterozygoten Genotyp, ein Teil der Geschwister ebenfalls, die anderen waren homozygot für das Wildtyp-Allel. Bei Eltern und Geschwistern korrelierten die Leptinwerte im erwarteten Maße mit dem Körpergewicht. Kein weiteres Familienmitglied war extrem übergewichtig. Mit der Entdeckung dieser Mutation ist der erste genetische Beweis erbracht, daß Leptin einen wichtigen Regulator in der Energiebilanz auch beim Menschen darstellt.
Ungefähr ein Jahr später wurde das ältere der beiden Kinder mit rekombinantem Leptin behandelt [Farooqi et al., 1999]. Das nun 9-jährige Mädchen wies ein Ausgangsgewicht von 94,4 kg (> 99,9. Perzentil) bei einer Körpergröße von 140 cm (91. Perzentil) auf. Temperatur und Blutdruck befanden sich im Normbereich, der Hormonstatus und der Phänotyp entsprachen einer präpubertalen Phase. Die Gabe von rekombinantem Leptin für 12 Monate einmal täglich subkutan führte schon nach 2 Wochen zu einer Gewichtsreduktion. Dies blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum bestehen, nach 12 Monaten wog das Mädchen 16,4 kg weniger. Dies entsprach einer mittleren Abnahme von 1-2 kg pro Monat. Von diesen gut 16 kg erklärten sich 95 % durch die Abnahme von Fettmasse (zu Beginn betrug die Fettmasse 59 % des KG, nach 12

Monaten noch 52 % des KG). Die Energieaufnahme des Mädchens verringerte sich um ca. 42 %, die metabolische Basalrate verringerte sich um 18 %. Zu Beginn der Untersuchungen befanden sich die Werte für Östradiol, FSH und LH in Übereinstimmung mit der präpubertalen Phase des Mädchens. Während der Behandlung stiegen FSH und LH an, Östradiol blieb auf einem niedrigen Wert. Erst gegen Ende zeigte sich ein Beginn der Pubertät an einer nächtlichen pulsatilen Gonadotropinsekretion.

In einer deutschen Studiengruppe von 366 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen (mittlerer BMI 32,5 ± 5,9 kg/m²) konnte diese Mutation bei keinem der Probanden nachgewiesen werden [Hinney et al., 1997b]. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß die Mutation extrem selten ist, möglicherweise bei Deutschen sogar gar nicht vorkommt.

Strobel et al. berichten 1998 über eine Mutationssuche im Leptingen, wobei sie in einer türkischen Population bei drei Probanden mit extremen Übergewicht (alle aus einer Familie) einen C zu T-Austausch in Kodon 105 gefunden haben, der dazu führt, daß Tryptamin anstelle von Arginin in die Proteinkette eingebaut wird. Kurioserweise ist diese Aminosäureposition identisch zu der Position einer Nonsensemutation bei der Maus. Bei den 3 homozygoten Probanden fanden sich extrem niedrige Leptinwerte (diese hatten den Anlaß zur Mutationssuche gebildet) und hohe BMI-Werte (55,8 und 46,9 und 32,5 kg/m²). Sie zeigten extreme Hyperphagie, erhöhte Plasma-Insulinwerte und einer war hyperglykämisch. Eine 34-jährige Patientin war bis dahin primär amenorrhoisch, fing aber im Alter von 36 Jahren an zu menstruieren [Ozata et al., 1999], wobei der Zyklus einen Lutealphasendefekt aufwies. Die Ovarien waren kleiner als normal, die Brust zeigte wenig Drüsengewebe. Ein 22-jähriger Patient kam nicht in die Pubertät, zeigte klinische Zeichen von Hypogonadismus (keine sekundäre Schambehaarung, bilaterale Gynäkomastie, kleiner Penis und Hoden, Azoospermie). Die männlichen Geschlechtshormone waren erniedrigt, ließen sich aber durch Gabe von Gonadotropin auf normale Werte anheben. Die weiteren Familienmitglieder waren durchgehend heterozygot oder homozygot für den Wildtyp und hatten normales Körpergewicht.

Später konnte in der gleichen Familie eine weitere homozygote Probandin identifiziert werden. Sie war ebenfalls extrem übergewichtig und amenorrhoisch [Ozata et al., 1999]. Schon im Kindesalter starben in dieser Familie sieben Mitglieder, die denselben Phänotyp aufwiesen wie die anderen übergewichtigen Probanden, an Infektionen. Ozata und Mitarbeiter schlußfolgerten, daß auch diese Kinder extrem niedrige Leptin-Werte

gehabt haben könnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Leptin eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Pubertät hat, jedoch nicht zwingend notwendig ist. Ozata und Mitarbeiter schließen, daß Leptin-Mangel in der Kindheit zu Infektionen prädisponiert. Wenn diese aber überlebt werden, so ist der Körper in der Lage, auch ohne Leptin einige dieser Defekte zu kompensieren.

2.6.10 Der Leptinrezeptor

Kurz nach der Identifizierung des Leptingens gelang es auch, den dazugehörigen Rezeptor bei Maus und Mensch zu klonieren [Tartaglia et al., 1995]. Bei der Maus ist das Gen für den Leptinrezeptor (*OB*-R), welches auf Chromosom 4 liegt, identisch zum *db*-Gen [Chua et al., 1996]. Dies führte dazu, daß bei der *db/db*-Maus nach Veränderungen in der Sequenz des *OB*-R gesucht wurden. So konnte auch eine Insertion gefunden werden, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führt [Chen et al., 1996], eine Signaltransduktion ist nun nicht mehr möglich. So sind nun, da erwiesenermaßen bei *db/db*-Mäusen eine Leptinresistenz vorliegt, die hohen Leptinspiegel bei diesen Tieren als Kompensationsmechanismus zu sehen.
Das menschliche Gen für den *OB*-R liegt an der Position 1p31. Mit seinen 20 Exons kodiert es für einen Rezeptor, der sich aus einer leptinbindenden extrazellulären Domäne, einer intrazellulären Domäne und einer Transmembranregion zusammensetzt [Tartaglia et al., 1995; Baumann et al.; 1996]. Damit ähnelt er den Rezeptoren der Zytokin-Klasse-I. Es existieren unterschiedliche Varianten des Rezeptors, von einer kürzeren wird z. B. vermutet, daß sie in Form eines löslichen Rezeptors als Transportprotein für Leptin dient [Tartaglia et al., 1995; Lee et al., 1996; Gotoda et al.; 1997]. Die Rezeptoren finden sich im Gehirn im Plexus choroideus, im Hypothalamus und in den Kapillaren des Gehirns, sowie in verschiedenen anderen Organen außerhalb des Gehirns (Niere, Milz, Herz, Leber) [Golden et al., 1997; Lee et al., 1996; Emilsson et al., 1997]. Auf das sättigbare Transportsystem, über welches Leptin ins Gehirn gelangt, ist bereits an anderer Stelle eingegangen worden (siehe 2.6.4); verantwortlich für diesen Transport sind die Leptinrezeptoren.
Da bei *db/db*-Mäusen eine nachgewiesene Mutation zur Leptinresistenz führt, wurden einige Untersuchungen angestellt, ob es solche Mutationen auch beim Menschen gibt. Denn eine daraus resultierende Leptinresistenz kann eine Erklärung für die Entstehung

von Adipositas trotz hoher Leptinspiegel sein. Wie auch beim Leptingen konnten mehrere Sequenz-Polymorphismen identifiziert werden [z. B. Echwald et al., 1997b; Thompson et al., 1997], die aber in ihrer Allelverteilung zwischen adipösen und normalgewichtigen Probanden kein signifikantes Ergebnis zeigten. Einzig Clément et al. [1998] gelang es, bei der Untersuchung einer Familie mit drei extrem adipösen Kindern eine Mutation im Leptinrezeptorgen zu finden, die für die Entstehung von extremer Adipositas verantwortlich zu sein scheint. Die Mutation, ein G- zu A-Austauch, liegt in Exon 16 und führt dazu, daß eine abnormale mRNA produziert wird, in der das 16. Exon fehlt, was wiederum zu einer fehlenden transmembranen und intrazellulären Domäne führt. Probanden, die homozygot für diese Mutation sind, zeigen eine früh einsetzende Adipositas (z. B. BMI im Alter von 19 Jahren 65,5 kg/m²). Die Leptinspiegel sind stark erhöht. Desweiteren bleibt bei ihnen die Pubertät aus und die Sekretion von Wachstumshormonen und thyreotropen Hormonen ist reduziert. Diese Veränderungen zeigen sich nicht bei heterozygoten Probanden, die noch die normale Form des Rezeptors bilden können. Allerdings handelt es sich, wie auch bei den monogenen Formen der Adipositas im Leptingen des Menschen, um eine sehr seltene Mutation. Bei einer Untersuchung an 402 Franzosen konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden [Clément et al., 1998].

2.6.11 Andere Wirkungsbereiche von Leptin

Wie schon zuvor geschildert wurde, wird Leptin nicht nur im Fettgewebe produziert, sondern auch in anderen Geweben (z. B. Plazenta, Gehirn). Dies und die Tatsache, daß auch der Leptinrezeptor in zahlreichen Geweben exprimiert wird, legte die Vermutung nahe, daß Leptin noch weitere Organfunktionen beeinflußt. Anhand zahlreicher Untersuchungen konnte dies mittlerweile bestätigt werden.

Anorexia nervosa: Patientinnen mit Anorexia nervosa haben einen erniedrigten Serum-Leptinspiegel im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen [Hebebrand et al., 1995c+1997]. Der Leptinspiegel korreliert auch hier mit dem Gewicht (ausgedrückt als BMI), und außerdem mit dem Körperfett und dem Prozentanteil Körperfett. Es konnte gezeigt werden, daß die Korrelation von Leptinwerten mit dem Prozentanteil Fettmasse

hoch ist [Mathiak et al., 1999]. Diese Befunde könnten in Zukunft dazu beitragen, daß die Prognosebeurteilung sich nicht mehr nur auf den BMI stützt, sondern auch auf Leptinwerte und Fettmasse. Die Leptin-Synthese bei Anorexia nervosa zeigt sich bei stationärer Behandlung nach Erreichen des Zielgewichts überschießend, nachdem zum Aufnahmezeitpunkt fast alle Patientinnen Serum-Leptinspiegel unter dem Referenzbereich zeigten [Hebebrand et al., 1997]. Die niedrigen Leptinwerte bei AN stehen in Zusammenhang mit einer früheren oder derzeitigen Episode von Amenorrhoe. Man geht davon aus, daß eine kritische Leptinkonzentration von 1,85 ng/ml im Blut vorliegen muß, um die Menstruation zu ermöglichen [Köpp et al., 1997].
Eine Beteiligung des Leptingens an der Entstehung der Anorexia nervosa konnte weitgehend ausgeschlossen werden [Hinney et al., 1998].

Glukosehaushalt: Sowohl Insulin als auch Glukose scheinen bei der Regulation der Leptinproduktion eine Rolle zu spielen [Boden et al., 1996]. Bei einer 52-stündigen Diät kommt es zu einem Abfall von sowohl Glukose- als auch Insulinkonzentrationen, wobei die gemessenen Werte von Insulin und Glukose im Serum positiv mit denen von Leptin korrelieren. Wird hingegen während einer 72-stündigen Fastenperiode der Blutglukosespiegel und der Blutinsulinspiegel auf einem konstanten Niveau gehalten, so ändert sich auch der Serum-Leptinspiegel nicht wesentlich. Die Produktion von *ob*-mRNA und letztendlich also von Leptin im Fettgewebe wird durch Insulin und postprandiale Hyperinsulinämie stimuliert [Cusin et al., 1995; Saladin et al., 1995; Wabitsch et al., 1996] und fallende Spiegel von Insulin senken die *ob*-mRNA-Expression [Saladin et al., 1995]. Andererseits führen Leptininjektionen zu einem Abfall der Insulin-Konzentrationen [Halaas et al., 1995, Weigle et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995]. Leptin hemmt spezifisch zahlreiche Wirkungen von Insulin und induziert damit eine Insulinresistenz [Cohen et al., 1996; Müller et al., 1997].
Beim Menschen ist nachgewiesen, daß eher chronisch erhöhte Insulinsekretionsraten zu einer Stimulation der Leptinausschüttung im Sinne einer Langzeitregulation führen [Kolaczynski et al., 1996c; Malmström et al., 1996; Utriainen et al., 1996].
Leptinrezeptoren konnten auch in pankreatischen β-Zellen nachgewiesen werden [Kieffer et al., 1996]. Leptin wirkte im Pankreas stimulierend auf die Insulinsekretion, bei Vorinkubation der β-Zellen mit immobilisierten Leptin-Antikörpern oder bei Abwesenheit von Glukose kam es nicht zur Stimulation. Dieser Mechanismus könnte

ein Teil der Ursache der Hyperinsulinämie bei adipösen Patienten sein [Tanizawa et al., 1997]. Widersprüchlich dazu stehen die Ergebnisse von Emillson und Mitarbeitern [1997], die eine Hemmung der Insulinsekretion in Pankreasinselzellen durch Leptin feststellten.

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHNA): Leptin in geringer Konzentration stimuliert *in vitro* die Freisetzung von follikelstimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen und von LH-Releasing-Hormon (LH-RH) aus dem Hypothalamus; in hohen Konzentrationen von Leptin läßt dieser Effekt nach. Auch Prolaktin wird dosisabhängig freigesetzt. *In vivo* zeigt sich ein Effekt nur auf die Freisetzung von LH. Leptin spielt also eine Rolle in der Kontrolle der Gonadotropin-Sekretion im Sinne einer Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse [Yu et al., 1997].

Bei normalen Ratten und Mäusen führt das Zusammenbinden der Hinterbeine, also eine Form von Streß für die Tiere, dazu, daß die hypothalamo-adrenale Achse stimuliert wird, was man an einer Erhöhung von sowohl ACTH (adrenocorticotropes Hormon) als auch Kortikosteroiden messen kann. Eine Vorbehandlung mit Leptin führt zu einer Blockierung dieser streßinduzierten Stimulation beider Hormone [Heiman et al., 1997]. Weiterführende Untersuchungen können verdeutlichen, daß diese Blockierung durch Hinderung der CRH-Freisetzung im Hypothalamus erfolgt. Ob dies direkt oder durch Mitwirkung von NPY passiert ist noch unklar.

Auch beim Menschen führt Streß, wie zum Beispiel Infektionen, zu einer Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Auch Leptin ist an diesem Regelkreis beteiligt [Bornstein, 1997]. Patienten mit einer akuten Sepsis zeigten nachts signifikant abfallende Leptinwerte aber einen paradoxen Anstieg von ACTH und Kortisol, was im Kontrast steht zu normalerweise nächtlich erhöhten Leptinwerten und einer Herunterregulation der HHNA [Sinha et al., 1996; Licino et al., 1997]. Leptin inhibiert bei Mäusen die HHNA-Antwort auf Streß [Ahima et al., 1996], so daß die von Bornstein gemessenen nächtlich erhöhten Werte von ACTH und Kortisol bei septischen Patienten eher als Konsequenz denn als Ursache zu verstehen sind.

Sympathisches Nervensystem: Intrazerebroventrikuläre Injektion von Leptin führt bei normalen Ratten zu einem langsamen aber stetigen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes. Der Blutfluß in den iliakalen Arterien und der Arteria mesenterica superior fällt ab, nicht aber der Blutfluß in den Nierenarterien. Weiterhin kommt es zu einer Erhöhung der sympathischen Nervenaktivität [Dunbar et al., 1997]. Die Autoren schließen aus ihren Befunden, daß die Erhöhung des Blutdrucks durch eine Einschränkung des arteriellen Blutflusses zu den Skelettmuskeln und dem Splanchnikusgebiet zustande kommt. Dieser erhöhte periphere Widerstand wiederum ist eine Folge des aktivierten sympathischen Nervensystems.

Mutationen im Leptingen, die zu einer verminderten Leptinsekretion führen, rufen beim Menschen einen Abschwächung des Sympathikotonus hervor [Ozata et al., 1999].

Auf eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems hingegen folgt ein Abfall von *ob*-mRNA [Trayhurn et al.; 1995b]. Bei Mäusen kam es nach zweistündiger Kälteexposition bei 4 °C zu einem Ausbleiben der *ob*-mRNA-Expression. Die Reversibilität dieser Reaktion zeigte sich, als nach 2,5 Stunden bei 24 °C erneut ob-mRNA im weißen Fettgewebe nachgewiesen werden konnte. Daher scheint das sympathische Nervensystem ein weiterer Kontrollfaktor der *ob*-mRNA-Expression zu sein.

Fertilität und Pubertät: Homozygote *ob/ob*-Mäuse sind steril, sowohl Männchen als auch Weibchen. Im Gegensatz zu den Männchen, bei denen die Sterilität durch Gewichtsreduktion reversibel ist, bleibt sie bei den Weibchen auch nach Gewichtsreduktion erhalten. Die Reproduktionshormone bei den Weibchen sind reduziert, was auf einen Defekt der Hypothalamus-Hypophysen-Achse hindeutet [Swerdloff et al., 1976].

Unter einer Therapie mit rekombinantem Leptin können *ob/ob*-Weibchen wieder trächtig werden und die Männchen werden wieder zeugungsfähig [Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997].

Mit Leptin behandelte *ob/ob*-Mäuse haben einen signifikant erhöhten Spiegel von Hormonen des Reproduktionssystems (LH, FSH) und zeigen höhere Gewichte der Fortpflanzungsorgane im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren [Barash et al.; 1996].

Bei einer Überexpression von Leptin zeigten schlanke Mäuse eine früh einsetzende Pubertät und intakte Fertilität, im weiteren Verlauf jedoch wiesen sie eine gegenüber

normalen Mäusen deutlich reduzierte Fertilität auf. Dies wird auf eine hypothalamische Dysfunktion zurückgeführt, da sowohl GnRH erniedrigt ist, als auch extern zugeführtes GnRH nicht zu einem adäquaten LH-Anstieg führt [Yura et al.; 2000].

Die Serum-Leptinkonzentrationen sind negativ mit dem Alter bei Menarche assoziiert [Matkovic et al., 1997]. Ein Anstieg des Leptinwertes um 1 ng/ml verkürzt die Zeit bis zur Menarche um 1 Monat. Ähnlich verhält es sich beim Körperfett. Eine Zunahme von 1 kg Körperfett bewirkt eine im Durchschnitt 13 Tage früher eintretende Menarche. Dies läßt vermuten, daß Leptin in einer bestimmten Menge im Serum vorhanden sein muß, um die Reproduktionsfunktion bei Frauen zu triggern, es also einen Schwellenwerteffekt gibt. Auch Köpp et al. [1997] demonstrieren, daß nüchtern gemessene Leptinwerte eine bessere Vorhersagekraft bezüglich der menstruellen Funktion zeigen als BMI oder Fettmasse. Demnach ist eine kritische Blut-Leptinkonzentration von 1,85 ng/ml notwendig, um die Menstruation zu ermöglichen.

Bei Jungen steigen die Leptinwerte um ca. 50 % an, bevor die Pubertät einsetzt und bevor Testosteron, LH und FSH ansteigen. Sie fallen nach Einleitung der Pubertät wieder auf basale Werte ab [Mantzoros et al., 1997].

Im Zusammenhang mit den schon zuvor beschriebenen Befunden hinsichtlich der Leptin-Therapie bei kongenitalem Leptin-Mangel (siehe 2.6.9) läßt sich feststellen, daß Leptin eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Pubertät zukommt, aber beim Menschen möglicherweise nicht zwingend notwendig ist.

Hämatopoese: In hämatologischen Stammzellpopulationen wird der Leptinrezeptor gebildet und Leptin wird von hämatopoetischem Gewebe gebildet. Leptin wirkt auf die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellpopulationen im Sinne einer Stimulation von Erythropoese, Myelopoese und Lymphopoese. In Übereinstimmung damit konnte festgestellt werden, daß *db/db*-Mäuse, denen der Leptinrezeptor fehlt, ein Defizit an lymphopoetischen Zellen aufweisen [Bennett et al., 1996].

Immunsystem: Leptin wird auch mit der Regulation des Immunsystems in Verbindung gebracht. Sowohl *ob/ob*-Mäuse als auch *db/db*-Mäuse haben ein geschwächtes Immunsystem [Fernandes et al., 1978; Chandra et al., 1980] und eine geschwächte zellvermittelte Immunität [Cason et al., 1986]. Leptin hat einen spezifischen Effekt auf

T-Lymphozyten, indem es T1-Helferzellen stimuliert und T2-Helferzellen in ihrer Produktion hemmt [Lord et al., 1998]. Der immunsuppressive Effekt von akutem Hungern konnte durch die Gabe von Leptin bei Mäusen rückgängig gemacht werden. In der Schwangerschaft wirkt Leptin stimulierend auf die Proliferation und Differenzierung von Dottersackzellen sowie fetalen Leberzellen und hämatopoetischen Stammzellen. Zudem steigert es die Zahl der Granulozyten und Makrophagen [Mikhail et al., 1997]. In Makrophagen wird die Expression von Zytokinen durch Leptin induziert [Loffreda et al., 1998]. Auch die Untersuchungsergebnisse von Ozata et al. [1999] und Strobel et al. [1998] weisen darauf hin, daß Leptin für die Funktion des Immunsystems wichtig ist. Ein von ihnen untersuchtes Kind mit extremer Adipositas z. B. weist eine erniedrigte T-Zell-Zahl auf, und 7 Kinder mit frühmanifester extremer Adipositas starben bereits im Kindesalter an Infektionen. Ozata et al. [1999] gehen davon aus, daß auch diese Kinder homozygote Träger der Mutation waren und aufgrund des Leptindefektes ein unzureichend entwickeltes Immunsystem besaßen.

3 Ziel der Arbeit

Die bisherigen Ausführungen stellen den *Stand der Wissenschaft* zu den Themen Körpergewichtsregulation und Leptin dar. Es wurde deutlich gemacht, daß man mit dem Sättigungsfaktor Leptin einen wichtigen Signalstoff in der Gewichtsregulation gefunden hatte. Die Regulation von Leptin unterliegt einem komplexen, noch nicht vollständig geklärten Miteinander verschiedener Komponenten. Somit ist auch die Regulation des Körpergewichts noch unklar. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es mehr als eine Ursache für die Entwicklung von Übergewicht gibt, da der Regelkreis des Leptins an verschiedenen Stellen unterbrochen werden und somit auf verschiedenen Wegen Adipositas entstehen kann.

Die hier vorliegende Arbeit stützt sich auf die zahlreichen Ergebnisse die darauf hindeuten, daß Leptin an der Regulation des Körpergewichts beteiligt ist. Es wurde eine Mutation im ersten Exon der Leptingens auf ein gehäuftes Auftreten in verschiedenen Populationen untersucht. Obwohl das erste Exon des Leptingens nicht transkribiert wird, können Allelvariationen dennoch Auswirkungen auf die Translationseinleitung oder Transkriptionsrate haben. Die folgende Hypothese wurde Gegenstand dieser Arbeit:

Der 19A/G-Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens führt zu einer Dysregulation der Leptinsekretion. Daher ist ein Allel dieses Polymorphismus mit einem Gewichtsextrem (Adipositas oder Anorexia nervosa) assoziiert.

Das untersuchte Kollektiv setzte sich zusammen aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie Patientinnen mit Anorexia nervosa. Als Vergleichsgruppen dienten untergewichtige und übergewichtige Studenten. Zunächst wurde auf Vorhandensein des Polymorphismus untersucht, dann wurden die Allelverteilungen bestimmt. Der Polymorphismus, der zuerst von Hager et al. [1998] beschrieben wurde befindet sich an Position +19. Ihm liegt ein Basenaustausch von **A→G** zugrunde, welcher in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms *NspB*II liegt. Durch Einbau eines Guanin anstelle eines Adenin wird eine Schnittstelle für das Enzym geschaffen. Ziel der Arbeit war es, die PCR für diesen Bereich zu optimieren und sodann die optimalen Bedingungen für die DNA-Digestion zu erarbeiten. Anhand dieser Untersuchungen konnte dann die Allelverteilung bestimmt werden, welche mittels χ^2-Test auf eine Assoziation zu den verschiedenen Phänotypen untersucht wurde. Zusätzlich wurde ein Transmission Disequilibrium Test (TDT) durchgeführt.

4 Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1 Probandenrekrutierung

Für die Assoziations- und Kopplungsstudien wurden Probanden mit unterschiedlichen Gewichtsextremen untersucht, sowie Patienten mit Anorexia nervosa. Die BMI-Werte wurden mit Hilfe des gemessenen Körpergewichts und der Körpergröße bestimmt.

- Die untergewichtigen Probanden waren Studenten der Philipps-Universität Marburg, die folgende Voraussetzungen erfüllen mußten:
  - BMI ≤ 15. Altersperzentil
  - keine organischen Erkrankungen
  - keine Anorexia nervosa oder andere Eßstörungen in der Vorgeschichte
  - Zigarettenkonsum von weniger als 10 Zigaretten pro Tag
- Die übergewichtigen Probanden, ebenfalls Studenten, mußten folgende Einschlußkriterien erfüllen:
  - BMI ≥ 90. Altersperzentil
  - keine organischen Erkrankungen
  - Zigarettenkonsum von weniger als 10 Zigaretten pro Tag
- Extrem adipöse Kinder und Jugendliche aus Kliniken in Murnau und Berchtesgarden, die sich auf die Behandlung dieser Gewichtsextreme spezialisiert haben, sowie adipöse Kinder aus Marburg. Sie unterlagen folgenden Aufnahmebedinugen:
  - BMI > 90. Altersperzentile
- Patienten mit Anorexia nervosa, die die Kriterien nach DSM-IV erfüllten, wurden aus den Kliniken für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitäten von Marburg, Frankfurt, Mannheim und Köln rekrutiert. Befragt wurden sie entweder mit der neuesten Version des *Composite International Diagnostic Interview* [CIDI, zur Verfügung gestellt von Professor Wittchen, München] oder dem *Diagnostic Interview for Genetic Studies* und dem *Eating Disorder Family History Interview* [zur Verfügung gestellt von Professor Strober, Los Angeles].
- Zusätzlich wurden teilweise auch die Eltern der Patienten mit AN und mit Übergewicht befragt.

Von allen Probanden beziehungsweise ihren Erziehungsberechtigten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg hatte keine Bedenken hinsichtlich der Durchführung der Untersuchung.

Die Unterteilung des Probandenkollektivs wird in Tabelle 4.1 dargestellt.

Diagnose	Geschlecht	BMI-Perzentile Min-Max	BMI-Durchschnitt ± σ	Durchschnittsalter ± σ
Adipöse Kinder N=323	f	90-100	32,6 ± 6,6	14,4 ± 2,5
	m	90-100	32,3 ± 5,2	13,6 ± 2,1
Adipöse Studenten N=40	f	90-100	29,1 ± 4,8	24,7 ± 3,8
	m	90-100	29,8 ± 2,7	25,6 ± 4,3
untergewichtige Studenten N=92	f	0-11	17,6 ± 0,5	24,5 ± 3,9
	m	0-14	19,1 ± 0,9	26,2 ± 3,9
Patienten mit AN N=76	f	0-16	14,5 ± 1,5*	16,6 ± 3,4
	m	0-1	13,9 ± 2,0*	15,3 ± 6,9

Tabelle 4.1: Probandenkollektiv

σ Standardabweichung
f weibliches Geschlecht
m männliches Geschlecht
* unbehandelt

4.1.2 Chemikalien

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und der jeweiligen Bezugsfirmen findet sich in Tabelle 4.2. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: *Roth, Karlsruhe; Sigma, Steinheim; Merck, Darmstadt.*

Chemikalien	Bezugsquelle
Aqua ad injectabile	Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Buffer green	Eurogentec Bel S.A., Seraing, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Desoxynucleosidtriphosphate	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll, Typ 400	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Formamid	Sigma, Steinheim
Glycerol	Sigma, Steinheim
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris HCl	USB, Ohio, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Tabelle 4.2: Chemikalien und Herstellerangabe

4.1.3 Enzyme

Tabelle 4.3 zeigt eine Aufstellung der verwendeten Enzyme und ihre Bezugsquellen.

Enzym	Bezugsquelle
DNA-*Taq*-Polymerase	Bio Lab
Pronase E	Sigma
***NspB*II**	Amersham

Tabelle 4.3: Enzyme und ihre Bezugsquelle

4.1.4 Puffer und Lösungen

Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen, ihrer Zusammensetzungen und Konzentrationen:

Chemikalien	Stammkonzentrationen	g/1000 ml Aqua dest
Tris-HCl	10 mM	1,21
$MgCl_2$	5 mM	1,02
NaCl	10 mM	0,58

Tabelle 4.4: Red cell lysis buffer (RCLB), pH 7,6

Chemikalien	Stammkonzentrationen	g/1000 ml Aqua dest
NaCl	75 mM	4,39
Na_2EDTA	25 mM	8,41

Tabelle 4.5: SE-Puffer, pH 8

Chemikalien	Stammkonzentrationen	g/1000 ml Aqua dest
Tris-HCl	10 mM	1,21
Na_2EDTA	1 mM	0,34

Tabelle 4.6: TE-Puffer, pH 8

Chemikalien	Konzentration
Tris-HCl	0,04 M
Eisessig	2 %
EDTA	0,01 M

Tabelle 4.7: 1 x TAE-Puffer

Chemikalien	Konzentration
Tris-HCl	0,89 M
Borat	0,89 M
EDTA	0,02 M

Tabelle 4.8: 10 x TBE-Puffer, ph 8,0

Chemikalien	Konzentration
Bromphenolblau	0,25 %
Xylenzyanolblau	0,25 %
Ficoll, Typ 400	15 %

Tabelle 4.9: Gel-Ladungspuffer für Agarose-Gele

Chemikalien	Verhältnis
Formamid : EDTA (ph 8,0; 25 mM)	5 . 1

Tabelle 4.10: Gel-Ladungspuffer für Sequenzierung

Chemikalien	Konzentration
Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
EDTA	250 mM

Tabelle 4.11: Master-Mix

Chemikalien	Menge / Einzelprobe
SE-Puffer	5 ml
Pronase 10 mg/ml	25 µl
SDS 10 %	500 µl

Tabelle 4.12: Pronase-Mix

Puffer-Nr.	Tris-HCl (mM)	pH	$MgCl_2$ (mM)	KCl (mM)
1	100	8,3	15	250
2	100	8,3	15	750
3	100	8,3	35	250
4	100	8,3	35	750
5	100	8,8	15	250
6	100	8,8	15	750
7	100	8,8	35	250
8	100	8,8	35	750
9	100	9,2	15	250
10	100	9,2	15	750
11	100	9,2	35	250
12	100	9,2	35	750

Tabelle 4.13: 10 x Puffer für PCR-Optimierung

Chemikalien	Eingesetzte Menge pro 25 µl-Ansatz	Konzentrationen im PCR-Reaktionsmix
Formamid (100 %)	1,25 µl	5 %
DMSO (100 %)	1,25 µl	5 %
Glycerol (100 %)	3,75 µl	15 %
$[NH_4]_2SO_4$ (375 mM)	1,0 µl	15 mM
BSA (20 mg/ml)	1,5 µl	1,28 mg/ml

Tabelle 4.14: Lösungen zur weiteren PCR-Optimierung

Reagenz	Konzentration
Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
$MgCl_2$	100 mM
Dithiotreitol	10 mM

Tabelle 4.15: Puffer 10 x L für Enzym *NspB*II für DNA-Digestion

Chemikalien	Konzentration
Ethidiumbromid	10 mg/ml

Tabelle 4.16: Lösung zum Färben des Agarosegels

4.1.5 DNA-Längenstandard

Tabelle 4.17 beschreibt die verwendeten DNA-Längenstandards und ihre jeweiligen Fragmentlängen.

Längenstandard	Fragmentlängen
Low DNA Mass-Ladder (GIBCO)	100, 200, 400, 800, 1200, 2000 bp
123 bp Marker (GIBCO)	123, 246, 369, 492, 615, 738 – 4182 bp

Tabelle 4.17: DNA-Längenstandards und ihre Fragmentlängen

4.1.6 Oligonukleotide

In Tabelle 4.18 werden die verwendeten Primer und ihre Sequenzen genannt.

Primer	Sequenz	Tm
ob1-ex-F	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC/C CCC GCG AGG TGC ACA CTG-3'	66°C
ob1-ex-R	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT A/GG AGG AAG GAG CGC GCC-3'	62°C

Tabelle 4.18: Primer und ihre Sequenzen

An den mit / markierten Stellen liegt eine artifizielle Schnittstelle für ein Enzym vor, erst ab dieser Stelle binden die unterstrichenen Primersequenzen in Intronbereichen flankierend zum Exon 1 an das Leptingen. Die Primersequenzen wurden freundlicherweise von Dr. P. Froguel und Dr. J. Hager vom Institut Pasteur in Paris zur Verfügung gestellt.

Die Oligonukleotide wurden vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Universität Marburg von der Arbeitsgruppe Krause hergestellt.

4.1.7 Geräte

In Tabelle 4.19 werden die verwendeten Großgeräte und ihre Hersteller aufgeführt.

Geräte	Typenname	Hersteller
DNA-Thermozykler	GeneAmp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
DNA-Thermozykler	GeneAmp PCR-System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Elektrophorese-Kammer	Maxi Gel System	OWL Scientific
Kamera	GDS-System	Polaroid
Kühlzentrifuge	Megafuge 2.0 R	Heraeus, Hanau
Photometer	Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten		Finn, Eppendorf
Power Supply	E452	Consort, Turnhout, Belgien
Reinstwasseranlage	MilliQ plus	Millipore
Schüttelwasserbad	1083	GFL, Burgwedel
Sequenzierer	Cycle Sequenzer ABI 373	Perkin Elmer, Weiterstadt
Tischzentrifuge	Labofuge 400E	Heraeus, Hanau
UV-Lichtquelle	UC-TM-25	Hoefer, San Francisco, USA
Vortex	MINI Schüttler MS1	IKA Works, Staufen

Tabelle 4.19: Großgeräte und ihre Hersteller

4.2 Methoden

4.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA findet sich prinzipiell in jeder menschlichen Zelle. Hier wurde sie anhand eines modifizierten Protokolls der Aussalzungsmethode nach Miller et al. (1988) aus Leukozyten extrahiert.

4.2.1.1 Durchführung:

Von dem mit EDTA ungerinnbar gemachten Blut werden 10-20 ml mit 30 ml eiskaltem RCLB (s. Tab. 4.4) gemischt, wodurch die Zellen lysiert werden. Während einer 15 minütigen Inkubation auf Eis werden die Proben noch 3-4 mal durchgemischt und anschließend 10 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (3300 Umdrehungen pro Minute; Ausschwingrotor, Heraeus Megafuge) zentrifugiert und der Überstand anschließend abgegossen. Das Sediment, in dem sich die Zellkerne und Mitochondrien mit der DNA befinden, wird in etwas RCLB aufgenommen und dann auf 25 ml mit RCLB aufgefüllt, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Dann wird noch einmal wie zuvor zentrifugiert und das Sediment in 5,5 ml Pronase-Mix aufgenommen und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Pronase bewirkt eine Aufspaltung der Leukozyten und einen Verdau der DNA-assoziierten Proteine. Im Verlauf werden zu dieser Lösung 5 ml SE-Puffer hinzugegeben und für mindestens 10 min bei 55°C schüttelnd inkubiert. Um die Proteine herauszufällen werden sodann 2,5 ml 5 M NaCl-Lösung hinzugegeben und sofort für 15 Sekunden gevortext. Danach wird für 15 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand abgenommen, in dem sich nun die DNA befindet. Das 2,5-fache Volumen (auf 45 ml) Ethanol wird zu dem Überstand hinzugegeben und die Phasen werden gemischt, die DNA sollte jetzt an der Oberfläche schwimmen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette mit eingeschmolzener und umgebogener Spitze, die als Haken dient, kann die DNA herausgefischt werden, man schwenkt sie kurz in 70%igem Ethanol und nimmt sie anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer auf. Während einer Inkubation bei 4°C über Nacht oder für 1-2 Stunden bei 50 °C im Wasserbad wird die DNA gelöst.

Etwas anders wird bei vielen kleine DNA-Bruchstücken verfahren: Nach der Füllung wird die DNA 20 min bei Raumtemperatur mit maximaler Geschwindigkeit ein weiteres Mal zentrifugiert, wodurch sich die DNA auf dem Boden des Falcons absetzt. Nach Abgießen des Überstandes werden 1,5 ml Ethanol (70 %) zugegeben und alles in ein Eppendorf Cup überführt. Dies wird bei 14 000 x g zentrifugiert (Labofuge 400 E, Heraeus) und dann das Ethanol abgesaugt. Das Pellet trocknet einige Minuten an der Luft, bevor es in TE-Puffer gelöst wird [modifiziert nach Miller et al.; 1988].

4.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung:

Da die Menge und somit auch die Konzentration der DNA, die aus verschiedenen Blutproben gewonnen wird, sehr unterschiedlich sind, wird die Konzentration mit Hilfe eines Photometers (Pharmacia Biotech, GeneQuant II) bestimmt. Dazu wird die DNA 1:200 mit Aqua dest. verdünnt und die Extinktion dieser Lösung im Photometer (Filter 260 nm) bestimmt. Die Konzentration errechnet sich mit folgender Formel:

$$\text{DNA - Konzentration } (\mu g/ml) = \text{Verdünnung} \times 50\ \mu g/ml \times E_{260\ nm}.$$

Die Konzentration sollte sich zwischen 300 und 1000 µg/ml bewegen und das Verhältnis zwischen DNA und Protein sollte 1,5 nicht unterschreiten.
Ein Aliquot der DNA wird mit Hilfe dieses Ergebnisses auf eine Konzentration von 100 pmol verdünnt und bei -80° C tiefgefroren.

4.2.1.3 Mikrotiterplatten

Um die Pipettierarbeit leichter zu gestalten, werden aus 96 DNA-Proben Mikrotiterplatten hergestellt, wobei jeweils 24 µl Aqua dest. vorgelegt werden und von der DNA 6 µl hinzugegeben werden, so daß in den Vertiefungen nachher eine DNA-Lösung mit der Konzentration 20 pmol vorliegt. Die Mikrotiterplatten lassen sich über einen längeren Zeitraum bei -20°C lagern.

4.2.1.4 Anmerkung

Die für diese Arbeit erforderlichen DNA-Extraktionen habe ich nur zum Teil selbst durchgeführt. Bei einem Großteil der Proben konnte ich auf vorhandene Bestände der Klinischen Forschergruppe zurückgreifen.

4.2.2 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction = PCR) kann man bestimmte DNA-Sequenzen eines Ausgangsmaterials sehr schnell *in vitro* vervielfältigen. Seit ihrer Entwicklung durch B. Mullis und seine Mitarbeiter der Firma Cetus in Kalifornien [Saiki, 1985; Mullis, 1990] ist die PCR zu einer Routinemethode molekularbiologischer Labore geworden.

Dazu werden zunächst zwei kurze synthetische Oligonukleotide, Primer genannt, die komplementär an jeweils ein Ende der Zielsequenz binden, konstruiert. Wenn neben den Primern auch eine hitzestabile DNA-Polymerase und, als DNA-Vorstufen, auch die vier Desoxynucleosidtriphosphate (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) vorhanden sind, so kann am jeweiligen 3´OH-Ende die Synthese neuer DNA-Stränge gestartet werden. Die zwischen den Primern liegende Zielsequenz wird somit kopiert [nach Schimmel, 1990]. Nach etwa 30-35 Zyklen kann man somit zusätzlich zur Ausgangs-DNA ca. 2^{30}-2^{35} Kopien der zuvor ausgesuchten DNA-Sequenz erhalten. Das ist eine Menge, die man leicht mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese als Bande einer bestimmten Größe sichtbar machen kann.

Die einzelnen Schritte eines **PCR-Zyklus** sind:

1. Denaturierung der DNA: Die beiden komplementären DNA-Stränge werden durch Erhitzen denaturiert, wobei Temperaturen von ca. 93-95°C benötigt werden [Volkenandt et al., 1990]

2. Primer Annealing: In der annealing-Phase (Anlagerung) wird die Reaktion auf eine Temperatur abgekühlt, die es den Oligonukleotidprimern ermöglicht, sich an die DNA-Einzelstränge anzulagern. Die optimale Temperatur für diese Phase ermittelt man aus der Tm für die beiden Primer [Sambrook et al., 1989].

3. DNA-Synthese: Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird der DNA-Abschnitt zwischen den Primern entlang der beiden DNA-Einzelstränge komplementär synthetisiert (75 – 80 °C) [Volkenandt et al., 1990].

Im ersten Zyklus entstehen zwei neue DNA-Stränge, deren 5´-Ende vom Primer markiert wird, deren 3´Ende aber variabel ist. Im zweiten Zyklus dienen diese Stränge dann als Matrize für die Synthese komplementärer Stränge mit der gewünschten Länge. Dabei gibt der Primer die 5´-Enden vor; die 3´-Enden sind fixiert, da die Synthese nicht über das Ende des gegenüberliegenden Primers hinausgehen kann. Eine Wiederholung der Synthese ist durch erneutes Denaturieren usw. möglich und nach nur wenigen Zyklen überwiegen Produkte mit der gewünschten Länge [Schimmel, 1990; Strachan und Read, 1996].

Richtlinien zur Primerkonstruktion: Die Primer sollten ca. 20 Nukleotide lang sein, wobei keine tandemförmigen Wiederholungen von einem oder mehreren Nukleotiden vorkommen sollten. Der Prozentsatz an Guanin und Cytosin sollte in etwa gleich sein. Am 3´OH-Ende sollten die Primer nicht komplementär zueinander sein, da sonst die Gefahr der Dimerbildung besteht. Die Schmelztemperaturen (Tm) der Oligonukleotide sollten sich ähnelt. Die Tm kann wie folgt berechnet werden [Strachan und Read, 1996]:

$$Tm[°C] = 4\Sigma GC+2\Sigma AT$$

Die hitzestabilen **DNA-Polymerasen** hat man in Mikroorganismen (Archaebakterien) gefunden, die natürlicherweise in heißen Quellen leben. Sie sind die Voraussetzung für das Durchlaufen mehrerer Zyklen. Die sehr oft genutzte *Taq*-Polymerase gewinnt man beispielsweise aus *Thermus aquaticus*. Sie ist bis zu 94°C hitzestabil und hat eine optimale Arbeitstemperatur von 72°C [Gelfand et al., 1990], daher sollte die Synthesephase bei dieser Temperatur ablaufen.

Läuft die Reaktion mit 100 % Ausbeute ab, so kann man die Kopien der Zielsequenz mit folgender Formel bestimmen: [Strachan und Read, 1996]:

$$\text{Kopienzahl} = (2^n 2n) \times m$$

mit: n = Zyklenanzahl; 2n = Produkte undefinierter Länge im 1.+2.-Zyklus; m = Anzahl der eingesetzten Matrizenmoleküle

4.2.2.1 Vorteile und Nachteile der Polymerasekettenreaktion

Vorteile: Die PCR ist schnell und einfach durchzuführen. Da sie sehr empfindlich ist, kann man mit einer sehr geringen Menge Ausgangsmaterial gute Ergebnisse erzielen. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten, molekulare Krankheitsursachen zu untersuchen.

Nachteile: Um die PCR anwenden zu können, muß man einen Teil der DNA-Sequenz schon charakterisiert haben, denn nur dann können passende Oligonukleotidprimer synthetisiert werden. Ein weiterer Nachteil ist, daß die PCR-Produkte mit etwa 20 kb nur eine geringe Länge aufweisen können. Wird die DNA *in vivo* repliziert, so kann sie - sollte es zum Einbau einer „falschen“ Aminosäure kommen - durch zelleigene Reparatursysteme repariert werden. Eine *in vitro*-Amplifikation, wie die PCR, verfügt nicht über solche Reparatursysteme [Strachan und Read, 1996].

4.2.2.2 PCR-Optimierung

Um möglichst spezifische Produkte zu erhalten, müssen optimale Bedingungen für die vorliegende DNA-Sequenz und die ausgewählten Primer ausgetestet werden. Neben den oben angesprochenen Richtlinien zur Primerkonstruktion und der benötigten *Taq*-Polymerase muß auch die Konzentration der Primer bedacht werden, denn wenn zu wenig Primer eingesetzt wird erhält man nur ein schwaches PCR-Produkt, wohingegen ein zu stark konzentrierter Primer die Spezifität der Reaktion verringern kann [Saiki et al., 1988]. Weiterhin müssen sowohl der optimale Amplifikationspuffer (s. Tab. 4.13) als auch die günstigsten Temperaturbedingungen gefunden werden. Dazu wurde zu Beginn der Untersuchungen eine PCR-Optimierung durchgeführt. Das heißt, daß die PCR-Ansätze zunächst mit je einem von 12 verschieden zusammengesetzten 10x Puffern (siehe Tabelle 4.13) und nur zwei verschiedenen DNAs angesetzt wurden.

Außerdem wurde die Temperatur der Annealing- und der Elongationsphase unterschiedlich gewählt, bis ein optimales Ergebnis vorlag. In Tabelle 4.20 wird das Pipettierschema für einen Reaktionsansatz zur PCR-Optimierung aufgeführt.

Reagenz	pro 50 µl Ansatz in µl	Konzentration
10 x Puffer	5	10 %
DNA aus Mikrotiterplatte	1	2 ng/µl
Primer-F und Primer-R	je 0,5	12,5 pmol/µl
Mastermix	1	2 %
dNTP	0,5	0,2 nmol/µl
***Taq*-Polymerase**	0,2	0,016 U/µl
aqua ad injectabile	ad 50,0	

Tabelle 4.20: Pipettierschema zur PCR-Optimierung

4.2.2.3 Trennung von Vor- und Nach-PCR-Bereich

Die Bereiche Vor-PCR und Nach-PCR wurden im Laborbereich räumlich voneinander getrennt, da die PCR eine äußerst empfindliche Methode ist, die für Verunreinigungen sehr anfällig ist. Im Vor-PCR-Bereich wurde die DNA extrahiert und die PCR-Reaktion pipettiert. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Reagenzien in kleine Portionen geteilt (aliquotiert) und zur Kontrolle wurde bei jeder PCR eine Wasserprobe mitgeführt.

Im Nach-PCR-Bereich befanden sich die Thermozykler, Geräte für den Enzym-Verdau und die Elektrophorese-Kammern. Mit dieser Trennung wurde versucht weitestmöglich zu verhindern, daß PCR-Produkte in den Vor-PCR-Bereich gelangen und dann unspezifische, falsch positive Amplifikate bilden konnten.

4.2.2.4 Optimierte PCR für 19A/G-Polymorphismus im Leptingen

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde für die Amplifikation des DNA-Ausschnittes folgendes Pipettierschema gewählt:

Reagenz	je 25 µl-Ansatz	Konzentration
DNA aus Mikrotiterplatte	2,5 µl	50 ng
5`-Primer	0,25 µl	0,25 µM
3`-Primer	0,25 µl	0,25 µM
Mastermix	0,5 µl	EDTA 250 nM
		Tris-HCl 20 mM
dNTP-Mix	0,25 µl	200 µM
DNA-*Taq*-Polymerase	0,1 µl	0,4 U
DMSO	1,3 µl	100 %
PCR 10 x Puffer Nr. 10	2,5 µl	Tris-HCl 100mM
		$MgCl_2$ 15 mM
		KCl 750 mM
Aqua ad injectabile	17,35 µl	ad 25 µl

Tabelle 4.21: PCR-Reaktionsmix für optimierte PCR

Für die Amplifikation des Primerpaares wurden folgende Bedingungen gewählt (Tabelle 4.22):

Phase	Zeit	Temperatur in °C	Zyklenzahl
AD	5 min	95	1 Zyklus
D	30 sec	95	
A	40 sec	62	35 Zyklen
S	30 sec	72	
ES	5 min	72	1 Zyklus
	∞	4	

Tabelle 4.23: Amplifikationszyklen für optimierte PCR

AD: Anfangsdenaturierung; D: Denaturierung; A: Annealing; S: Synthese; ES: Endsynthese

Die PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert, die *Taq*-Polymerase wurde als letztes hinzugegeben, um ein unspezifisches Starten der Reaktion zu verhindern.

4.2.3 DNA-Digestion

Diese Methode des Mutationsnachweises nutzt die Eigenschaft von Restriktionsenzymen die DNA an spezifischen Stellen zu erkennen und durch Hydrolysierung einer Phosphodiesterbindung zu schneiden. Ursprünglich sind Restriktionsendonukleasen in Bakterien dafür zuständig, daß eingedrungene artfremde DNA rasch zerstört wird. Es gibt mehrere tausend dieser Enzyme, die eine spezifische DNA-Zielsequenz erkennen. Mit Hilfe dieser Enzyme kann man z. B. Punktmutationen nachweisen, da eine Punktmutation eine Schnittstelle bilden oder vernichten kann. Wird nun eine DNA-Digestion mit einem Mutationsträger im Vergleich zu einem Wildtypträger durchgeführt, zeigen sich später bei der Trennung der DNA-Fragmente unterschiedliche Fragmentlängen. Dies wird als Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) bezeichnet [Gassen und Minol, 1996; Strachan und Read, 1996].

4.2.3.1 Restriktionsendonuklease *NspB*II und entstehende Fragmente

Durch den 19 A/G-Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens wird eine Schnittstelle für das Enzym *NspB*II erzeugtt. Das Enzym *NspB*II wird aus *Nostoc species B* gewonnen, liegt in einer Konzentration von 4 U/µl vor und erkennt folgende Zielsequenz:

5’	C(A/C)G↓C(T/G)C	3’
3’	G(C/A)C↓G(G/T)C	5’

Das Enzym schneidet das PCR-Produkt nicht, wenn Base 19 von Exon 1 ein Adenin ist. Das ist die publizierte Sequenz und wird im folgenden als Wildtyp bezeichnet. Es ist dann 1 langes Fragmente mit 240 bp zu erkennen. Ist Base 19 von Exon 1 ein Guanin,

so erfolgt eine Restriktion. Dies wird als Mutation bezeichnet und es entstehen 2 Fragmente mit 198 und 42 bp.

4.2.3.2 Restriktionsreaktion

Tabelle 4.24 zeigt die Zusammenstellung der Restriktionsreaktion die auf Eis pipettiert wird.

Reagenz	Menge in 15 µl
PCR-Produkt	10 µl
BSA	0,3 µl
***NspB*II**	0,125 µl (= 0,5 U)
Puffer (10xL)	3 µl
Aqua ad injectabile	ad 15 µl

Tabelle 4.24: Restriktionsreaktion

Nachdem das Reaktionsgemisch angestzt ist muß es bei einer für das entsprechende Enzym optimalen Arbeitstemperatur für eine Mindestzeit, welche ebenfalls enzymabhängig ist, inkubiert werden. Im Fall von *NspB*II wurde die Inkubation in einem Schüttelwasserbad bei 37°C über Nacht durchgeführt. Im Anschluß daran können die Fragmente mit der Agarosegelelektrophorese getrennt werden [Sambrook et al., 1989].

4.2.4 Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen wird das unterschiedliche Wanderungsverhalten von geladenen Molekülen im elektrischen Feld ausgenutzt. Dieses hängt unter anderem von der Größe der Fragmente sowie von der Agarose-Konzentration ab. Die Agarose bildet in ausgekühltem Zustand eine Matrix aus, deren Porengröße von der Agarose-Konzentration abhängt. Je größer die Konzentration ist, um so dichter ist die Matrix. So erfahren kleinere Makromoleküle eine bessere

Auftrennung als die größeren, da diese durch die Gelmatrix in ihrer Wanderung behindert werden. Die Konzentration des Agarosegels muß sich deshalb nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente richten [Sambrook et al., 1989].

4.2.4.1 Gelladungspuffer

Der Gelladungspuffer (s. Tabelle 4.9) dient dazu die DNA-Produkte zu „beschweren“ und damit in ihren Geltaschen zu halten. Außerdem dient er als optische Kontrolle zur Abschätzung der Laufweite im Gel. Xylen-Zyanol blau läuft ca. so schnell wie ein 200 bp-Fragment, Bromphenol blau etwa 2,2 mal schneller [Sambrook et al., 1989].

4.2.4.2 Agarose-Gel

In 200 ml 1 x TAE Puffer, der zum Kochen gebracht wird, wird die Agarose (5 g) gelöst, damit hat die Agarose eine Konzentration von 2,5 %. Nach dem Abkühlen wird 20 µl Ethidiumbromid dazu gegeben und die noch lauwarme Lösung in eine Gelkammer (20 cm x 25 cm) gegossen. Diese wurde zuvor abgedichtet und mit Kämmen, die anschließend die Aussparungen für die Proben darstellen, ausgestattet. Nach dem vollständigen Abkühlen des Gels, bei dem die Agarose polymerisiert, werden die Kämme und Begrenzungen entfernt und das Gel in die entsprechende Elektrophoresekammer gelegt. In der Kammer wird das Gel mit dem Laufpuffer 1 x TAE überschichtet.

Von dem PCR-Produkt werden je 15 µl mit 5 µl Gelladungspuffer gemischt und dann in die Geltaschen pipettiert. Um später die Fragmentlänge des PCR-Produktes bestimmen zu können, wird in eine flankierende Tasche 2 µl des DNA-Längenstandards pipettiert. Schließt man ein elektrisches Feld an die Kammer an, wandert das bei neutralem pH negativ geladene PCR-Fragment in Richtung Anode. Dabei können folgende Faktoren die Geschwindigkeit der DNA-Wanderung beeinflussen: die Molekülgröße, die Agarosekonzentration, die angelegte Spannung und die Konformation der DNA. Die Auftrennung der DNA erfolgt ca. 1 Stunde bei 150 Volt Spannung. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera photographiert. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, ist die DNA unter UV-Licht als rot-

orange fluoreszierende Bande zu erkennen. Das Ethidiumbromid reduziert die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA um 15 %.

4.2.5 Sequenzierung des PCR-Produktes

Die gegenwärtig angewendeten Sequenzierungsmethoden sind enzymatischer Natur und laufen ähnlich wie eine PCR ab, wobei allerdings in der Sequenzreaktion zusätzlich Didesoxynucleotide (ddNTPs) in einem bestimmten Verhältnis enthalten sind. Dies sind Analoga der normalen dNTPs, denen auch am 3'-Kohlenstoffatom eine Hydroxylgruppe fehlt, womit ihnen die Möglichkeit genommen wird, an dieser Stelle eine Phosphodiesterbindung auszubilden. Werden diese ddNTPs an die wachsende DNA-Kette angebaut, so wird hier die Synthese abgebrochen. Zudem wird zur Sequenzreaktion jeweils nur ein Primer (Forward oder Reverse) hinzugegeben.
Parallel werden vier basenspezifische Reaktionen durchgeführt, wobei jeder Ansatz eines der vier ddNTPs in geringer Konzentration enthält und natürlich die vier dNTPs, sowie Polymerase. Die durch die ddNTPs induzierten Kettenabbrüche erfolgen in statistischer Verteilung an einer der vielen Positionen, an denen das entsprechende Nukleotid vorkommt. Da die DNA in jedem Reaktionsansatz als Population identischer Moleküle (hier: PCR-Produkt) vorliegt, erzeugt jede der vier basenspezifischen Reaktionen eine Population von Fragmenten mit übereinstimmenden 5`-Enden (charakterisiert durch den Primer) und variablen 3`-Enden. Die entstandenen Fragmente werden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Identifizierung der unterschiedlich großen Fragmente werden in die Reaktionsprodukte markierte Gruppen eingebaut. Dies kann dadurch geschehen, daß man radioaktiv markierte Nukleotide oder Primer (z. B. mit ^{35}S oder ^{33}P) in die DNA einbaut. Dann muß das Gel nach der Elektrophorese getrocknet werden und auf einem Röntgenfilm exponiert werden. Nach einer geeigneten Expositionsdauer läßt sich durch die entstehenden schwarzen Banden die DNA-Sequenz einfach ablesen.
Eine Verbesserung dieser Methode war die Entwicklung automatisierter Systeme für die Sequenzierung fluoreszenzmarkierter DNA [Wilson et al., 1990]. Dabei basieren die unterschiedlichen Verfahren auf Primern oder ddNTPs, die mit einer fluoreszierenden chemischen Gruppe verknüpft sind. Während der Elektrophorese mißt ein Detektor an

einem bestimmten Punkt im Gel die Fluoreszenzsignale der vorbeiwandernden DNA und zeichnet sie auf. Weiterhin macht man sich zunutze, daß die vier ddNTPs mit je einem unterschiedlichen Fluorophor versehen sind, die in unterschiedlichen Wellenbereichen fluoreszieren. Unter diesen Voraussetzungen können nun die vier Reaktionen in einem Reaktionsgefäß ablaufen, und mit einer einzigen Gelspur in der Elektrophorese ausgewertet werden. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt in Form von Intensitätsprofilen für jedes der andersfarbigen Fluorophore.
Die zuletzt genannte Methode wird auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet (mit ABI 373 Genetic Analyzer; Perkin Elmer). Die dazu benötigten Geräte konnten im Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg (Leiter: Prof. Grzeschik) benutzt werden, die dort arbeitenden Wissenschaftler waren mir bei der Durchführung sehr behilflich.

4.2.5.1 Sequenzierung Exon 1 des Leptingens

Fällung des PCR-Produktes: 200 µl des PCR-Produktes werden mit 235 µl (allgemein: ca. 1,3fache Menge) Ammoniumsulfat (7,5 M) und mit 500 µl (allgemein: ca. 2,5 fache Menge) Ethanol (100 %) gemischt. Das Gemisch wird zunächst für 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (13000 Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet nochmals mit 200 µl Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugung des Überstandes wird das Pellet für 1 Stunde an der Luft getrocknet und dann in 30 µl Aqua dest. aufgenommen. 5 µl des gereinigten PCR-Produktes werden auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Durch visuellen Vergleich der Intensität der fluoreszierenden Banden mit der entsprechenden Bande eines mitgeführten DNA-Längenstandards (Low-DNA-Mass-Ladder) wird die Konzentration des PCR-Produktes ermittelt.

Sequenzierungsreaktion: Für die Sequenzierungsreaktion wird folgender Ansatz pipettiert (Tabelle 4.25):

Reagenz	Konzentration
PCR-Produkt	ca. 200 ng
Primer	3,2 pmol
Terminationsmix*	8,0 µl
Aqua bidest	ad 20,0 µl

Tabelle 4.25: Sequenzierungsreaktion

*Terminationsmix: ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequenzing; Ready Reaction Kit Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland

Um nahezu 100 % Sicherheit zu erhalten, werden von jedem zu sequenzierenden PCR-Fragment zwei Reaktionen angesetzt, wobei man einmal den Forward- und einmal den Reverse Primer einsetzt. Die resultierende Sequenz entspricht in einem Fall der Sequenz des kodierenden Stranges (5´→ 3´; Forward Primer) und im anderen Fall dem Gegenstrang (Reverse Primer). Die Bedingungen für die Sequenzreaktion werden in Tabelle 4.26 dargestellt, als Gerät wurde der Thermozykler GeneAmp 9600 eingesetzt.

Phase	Zeit	Temperatur in °C	Zyklenzahl
AD	3 min	96	1 Zyklus
D	10 sec	96	25 Zyklen
S	4 min	60	
E	∞	4	

Tabelle 4.26: Sequenzierungszyklen

AD: Anfangsdenaturierung; D: Denaturierung; S: Synthese; E: Endtemperatur

Ein separater Annealingschritt kann hier entfallen, da die Annealingtemperatur der Primer über 60°C liegt.

Reinigung und Fällung der Sequenzierprodukte: Um die Sequenzierungsprodukte von nicht eingebauten, überschüssigen ddNTPs und dNTPs zu reinigen gibt man 80 µl Aqua bidest. zu den Produkten. Durch Zugabe von 10 µl Natriumazetat (3M; pH 4,6)

und 50 µl Ethanol (95%) wird die DNA gefällt. Mit dem Vortex wird die Probe zunächst gut durchmischt und dann für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach 15-30 Minuten Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wird der Überstand abpipettiert und das Pellet ein zweites Mal mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und abpipettiert. Zuletzt wird das Pellet im Vakuum getrocknet.

4.2.5.2 Auftrennung der Sequenzierprodukte

Sequenzgel: Das Gel für die Sequenzierung wird aus den folgenden Reagenzien (Tabelle 4.27) hergestellt.

Reagenz	Menge
Harnstoff	30 g
Hydrolink Long Ranger 50 %	7,2 ml
Aqua dest.	25,3 ml
10 x TBE	6 ml

Tabelle 4.27: Sequenzgel

Die Reagenzien werden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert, damit der Harnstoff sich löst. Sind keine Harnstoffkristalle mehr zu sehen, wird die Lösung durch einen Faltenfilter gegeben. Die Lösung wird nach Abkühlen mit 300 µl frischem 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 24 µl TEMED versetzt um die Polymerisation zu starten. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,3 mm gegossen, zum Schluß wird ein Kamm mit Klammern befestigt. Das Gel muß mindestens 1 Stunde auspolymerisieren.

Auftrennung: Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, sollte die Elektrophorese zunächst 1 Stunde ohne Proben laufen, um das Gel gleichmäßig zu temperieren. Die Einstellung erfolgt entsprechend der fluoreszenzmarkierten Dye Terminatoren auf Filterset A.

Die Proben werden mit 3-4 µl Gelladungspuffer für Sequenzierung versetzt (siehe Tabelle 4.10) und vor dem Auftragen für 5 min bei 90°C denaturiert. Dann läuft das Gel für 18 Stunden bei 2500 V, 25 mA und 37 W.

4.2.6 Statistik

4.2.6.1 Assoziation

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer Eßstörung bzw. Adipositas und einem Markergenotyp vorliegt. Die Grundlagen zu Assoziationsuntersuchungen und ihre Probleme sind bereits in Kapitel 2.6.6 (Assoziation, Kopplung, Kopplungsungleichgewicht) beschrieben worden. Der Assoziatinsansatz wurde trotz der angesprochenen Probleme untersucht, da für den TDT die Probandenrekrutierung (Proband plus beide Eltern) sehr aufwendig ist und die Fallzahlen damit geringer bleiben.

Die Berechnung der Assoziationstests erfolgte mit dem Pearson-χ^2-Test [Sachs, 1999].

4.2.6.2 Der TDT-Test [Spielman et al.; 1993]

Zunächst sollen noch einmal kurz die Grundlagen des TDT aufgeführt werden:

- nur die heterozygoten Eltern gehen in die Berechnung ein.
- es werden die Häufigkeiten verglichen, mit denen das Allel unter den weitergegebenen oder nicht weitergegebenen ist, der TDT mißt ein Transmissions-Ungleichgewicht.
- die Eltern fungieren als interne Kontrollen, daher tritt keine Stratifikation auf.

Auch hier stellt man sich zunächst eine Vierfeldertafel auf (Tabelle 4.29):

		nicht transmittiert	
		Allel A	**nicht Allel A**
transmittiert	**Allel A**	**a**	**b**
	nicht Allel A	**c**	**d**

Tabelle 4.29: Vierfeldertafel für TDT

Ob eine signifikante Assoziation vorliegt kann dann mit dem χ^2-Test überprüft werden:

$$\chi^2 = \frac{(b-c)^2}{b+c}$$

Das Signifikanzniveau wird vor dem Test festgelegt. Bei p-Werten unter 0,05 spricht man von einem signifikanten Ergebnis.

Der TDT hat viele Vorteile, wie bereits zuvor beschrieben wurde. Allerdings sollte man auch die Nachteile nicht außer Acht lassen:

- Der Test ist arbeits- und zeitaufwendiger als die üblichen Fall-Kontroll-Studien, da aus jeder Familie drei Mitglieder (der Proband und seine Eltern) typisiert werden müssen.
- Die Eltern müssen zur Verfügung stehen, was bei einer erst im hohen Alter ausbrechenden Krankheit, die man untersuchen möchte, schwierig sein kann.
- Der Test kann Assoziation, die durch ein Kopplungsungleichgewicht verursacht wird, nicht von solcher trennen, bei denen der Marker selber funktionelle Relevanz hat.
- Der TDT benötigt bei einem Polymorphismus mit sehr niedriger Frequenz (< 10 %) sehr hohe Fallzahlen, um aussagekräftig werden zu können.

4.2.6.3 Bonferroni-Korrektur

Bei Assoziationsstudien besteht bei jedem Test ein eigenes Risiko für ein falsch positives Ergebnis. Um Fehler zu vermeiden, muß man eine Bonferroni-Korrektur durchführen [Sachs, 1999]. Der Grenzwert für die Signifikanz wird dabei bei $p \leq 0{,}05/n$ festgelegt und nicht wie üblich bei $p \leq 0{,}05$. Dabei ist n die Zahl der unabhängigen möglichen Assoziationen, die geprüft werden [Spielman et al., 1993; Strachan und Read, 1996].

4.2.6.4 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Von einem mutanten Allel (**a**), welches im homozygoten Zustand eine schwere Krankheit bedingt, die wiederum das betroffene Individuum an der Fortpflanzung hindert, würde man annehmen, daß es im Laufe der Zeit aus der Population verschwindet. Dies ist jedoch nicht der Fall, es kommt vielmehr zu einem Gleichgewicht, wobei die aus einer Population durch schwere Erkrankung bei Homozygoten **aa** ausscheidenden Allele **a** durch neue Mutationen ersetzt werden. Die Häufigkeit der drei Phänotypen ergibt sich aus folgender Formel [Knippers, 1995]:

$$(p + q)^2 = 1$$

p = Häufigkeit für Allel **A**
q = Häufigkeit für Allel **a**

Diese Regel kann man zur Kontrolle heranziehen, um festzusellen ob in einer Studie grobe systematische Fehler aufgetreten sind.

5 Ergebnisse

Es wurde ein Polymorphismus im 1. Exon des Leptingens (Position +19 [A→G]) mittels DNA-Digestion auf eine Assoziation mit unterschiedlichen Phänotypen (Adipositas, Anorexia Nervosa, Untergewicht) untersucht. Dazu wurden die Allelfrequenzen in den ausgesuchten Kollektiven bestimmt und die Allelweitergabe von Eltern an ihre Kinder mittels TDT ermittelt. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsschritte werden im folgenden dargestellt.

5.1 Untersuchung des Polymorphismus der Position +19 mittels DNA-Digestion

5.1.1 PCR-Optimierung

Die Ergebnisse der PCR-Optimierung sind in den Tabellen 4.21 und 4.22 dargestellt. Die Überprüfung der PCR-Reaktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.2.4.2) mit einem 2,5 %igen Agarosegel.

5.1.2 DNA-Digestion

Zur Durchführung der DNA-Digestion wurde das Restriktionsenzym *NspB*II eingesetzt, da der Basenaustausch an der Position +19 in der Erkennungssequenz dieses Enzyms liegt. An dieser Position wird Adenin durch Guanin ersetzt. Dies erzeugt eine Schnittstelle für das Enzym *NspB*II, so daß das Enzym das mutierte Allel schneidet und das Wildtypallel nicht. Um optimale Bedingungen für das Enzym zu schaffen wurde der Puffer 10 x L (siehe Tabelle 4.15) eingesetzt und die Digestions-Reaktion bei 37°C über Nacht inkubiert. Für die Darstellung der aufgetrennten Fragmente erwies sich ein 2,5 %iges Agarosegel als optimal.

5.1.3 Gelelektrophorese

Abbildung 5.1 zeigt ein Agarosegel mit den aufgetrennten und mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmenten des Polymorphismus an der Position +19 im 1. Exon des Leptingens. An den Seiten ist jeweils einmal ein Längenstandard mitgeführt, um die Größe der entstandenen Fragmente abschätzen zu können (Low DNA Mass Ladder, GIBCO). Um unspezifische Amplifikate auszuschließen, ist in Position 10 außerdem eine Wasserprobe mitgelaufen.

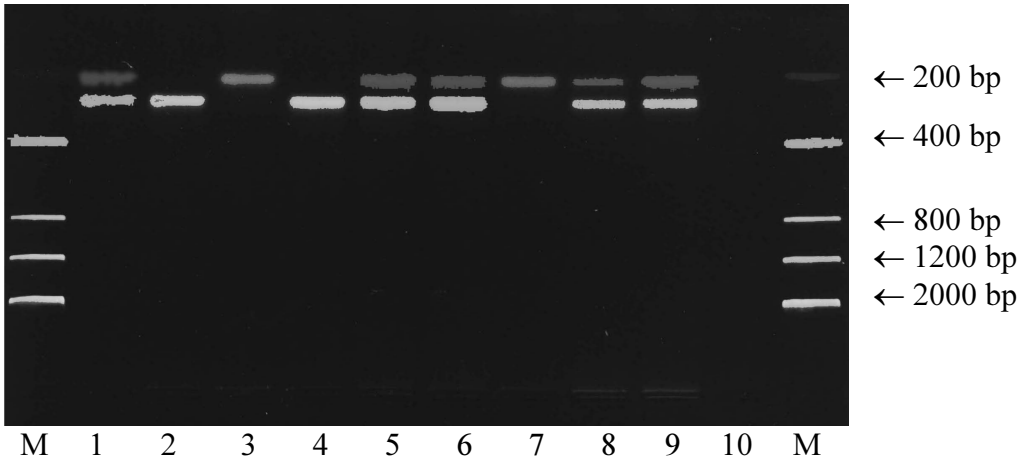

Abbildung 5.1: Gelelektrophorese zur Detektion des 19A/G-Polymorphismus in Exon 1 des Leptingens (Bild nachträglich digital kontrastverstärkt)

M	Low DNA Mass Ladder	
1	Heterozygoter Proband	Familien-
2	Homozygote Mutter für das G-Allel	trio
3	Homozygoter Vater für das A-Allel	
4	Homozygoter Proband für das G-Allel	Familien-
5	Heterozygote Mutter	trio
6	Heterozygoter Vater	
7	Homozygoter Proband für das A-Allel	Familien-
8	Heterozygote Mutter	trio
9	Heterozygoter Vater	
10	Wasserprobe zum Ausschluß von Verunreinigungen	

5.1.4 Genotypen der Probanden

In Abbildung 5.2 wird die Verteilung der Genotypen aller untersuchten Probanden dargestellt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Verteilungen der einzelnen Untergruppen aufgeführt (Tabelle 5.1). Die Frequenz der Genotypen ist in Klammern angegeben. Die Verteilung der Genotypen folgt der Regel nach Hardy-Weinberg [$(p+q)^2 = 1$].

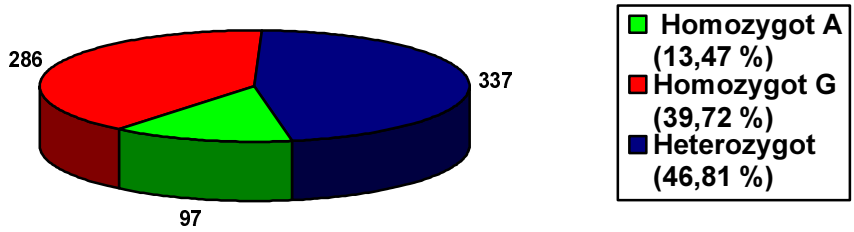

Abbildung 5.2: Absolute und prozentuale Verteilung der Genotypen des 19A/G-Polymorphismus des Leptingens im Gesamtkollektiv

Subgruppe	Anzahl	Homozygot für A (%)	Heterozygot (%)	Homozygot für G (%)
Adipöse Kinder	435	59 (13,56)	205 (47,13)	171 (39,31)
übergewichtige Kontrollen	51	8 (15,69)	24 (47,06)	19 (37,25)
insgesamt	486	67 (13,79)	229 (47,12)	190 (39,09)
Untergewichtige Probanden	126	18 (14,29)	56 (44,44)	52 (41,27)
Patientinnen mit Anorexia nervosa	108	12 (11,11)	52 (48,15)	44 (40,74)

Tabelle 5.1: Genotypverteilungen des 19A/G-Polymorphismus im Leptingen

5.1.3 Verteilung der Allele des 19A/G-Polymorphismus im Leptingen

In Tabelle 5.2 sind die absoluten Häufigkeiten und Frequenzen der Allele an Position +19 des Leptingens dargestellt.

	A	$\hat{p}_A$	G	$\hat{p}_G$
alle untersuchten Probanden	**531**	**0,369**	**909**	**0,631**
Adipöse Kinder	**323**	**0,371**	**547**	**0,629**
Adipöse Kontrollen	**40**	**0,392**	**62**	**0,608**
Adipöse insgesamt	**363**	**0,374**	**609**	**0,626**
Untergewichtige Probanden	**92**	**0,365**	**160**	**0,635**
Anorexia nervosa Patienten	**76**	**0,352**	**140**	**0,648**

Tabelle 5.2: Allelfrequenzen des 19A/G-Polymorphismus des Leptingens in den untersuchten Kollektiven

$\hat{p}_X$ ist die ermittelte Wahrscheinlichkeit für das Allel X

Aus den Assoziationsansätzen ergeben sich beim Vergleich der Subgruppen unter Anwendung des Pearson-χ^2-Test (korrigiert nach Yates) die folgenden p-Werte (Tabelle 5.3):

Pearson-χ^2-Test	Adipöse	Untergewichtige
Patientinnen mit AN	**0,5518**	**0,7662**
Untergewichtige	**0,8063**	**X**

Tabelle 5.3: p-Werte bei Anwendung des χ^2-Test nach Pearson (modifiziert nach Yates)

Vergleicht man die adipösen Kinder mit den adipösen Kontrollen, so ergibt sich ein p-Wert von **p = 0,6798**.
Diese p-Werte sind nominale p-Werte, die man an dieser Stelle einer Bonferroni-Korrektur unterziehen müßte. Da aber alle p-Werte > 0,05 sind, und somit schon jetzt kein signifikantes Ergebnis vorliegt, erübrigt sich die Korrektur. Dies trifft auch für die folgenden Ergebnisse zu. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, daß der Polymorphismus wahrscheinlich nicht mit einem der untersuchten Phänotypen assoziiert ist.

Vergleicht man die adipösen mit den untergewichtigen Probanden, so kann man die Fallzahl berechnen, die notwendig wäre, um bei einer Power von 80% und einem Signifikanzniveau von 5% den in dieser Studie untersuchten Effekt feststellen zu können wenn er tatsächlich existieren würde. Diese Zahl beträgt n = 175700. Unter dem Begriff „Fallzahl“ ist dabei die Anzahl der benötigten Allele zu verstehen. Somit wären also insgesamt 87850 Probanden zu rekrutieren. (Die Fallzahlberechnungen wurden durchgeführt mit Hilfe von Formeln, die in vielen Computerprogrammen zur Fallzahlberechnung implementiert sind [Hartung, 1991].)

5.1.4 Der TDT-Test

5.1.4.1 Adipöse Probanden

In Tabelle 5.4 ist die Vierfeldertafel dargestellt, die sich aus der Untersuchung von 149 Familientrios (adipöser Proband und dessen leibliche Eltern) ergibt. In Klammern angegeben finden sich die Frequenzen.

		nicht transmittiert	
		Allel A	**Allel G**
transmittiert	**Allel A**	**42 (0,141)**	**81 (0,272)**
	Allel G	**65 (0,218)**	**110 (0,369)**

Tabelle 5.4: Alleltransmission des 19A/G-Polymorphismus bei adipösen Probanden, in Klammern angegeben die jeweiligen Frequenzen bei 149 Familientrios

Der χ^2-Test ergibt einen **p-Wert** von **0,2143**. Da $p > 0,05$ ist, liegt kein Ungleichgewicht in der Verteilung der Allele vor. Der TDT bestätigt damit das Ergebnis des Assoziationstests.

Zur Berechnung der Fallzahlen n, die nötig wären, um bei einer Power von 80% und einem Signifikanzniveau von 5% den beobachteten Unterschied im Verhältnis von transmittierten zu nicht-transmittierten A-Allelen signifikant nachweisen zu können, wenn dieser tatsächlich wahr ist, wird im folgenden die asymptomatische Version des zweiseitigen McNemar Tests verwendet. Unter dem Begriff „Fallzahl“ ist die Anzahl der insgesamt benötigten heterozygoten Eltern zu verstehen.

Die benötigte Fallzahl ist n = 1315 (heterozygote Elternteile).

5.1.4.2 Patientinnen mit Anorexia nervosa

In Tabelle 5.5 ist die Vierfeldertafel dargestellt, die sich aus der Untersuchung von 58 Familientrios (Patientin mit Anorexia nervosa und deren leibliche Eltern) ergibt.

		nicht transmittiert	
		Allel A	**Allel G**
transmittiert	**Allel A**	**16 (0,138)**	**20 (0,172)**
	Allel G	**32 (0,276)**	**48 (0,414)**

Tabelle 5.5: Alleltransmission des 19A/G-Polymorphismus bei Patientinnen mit Anorexia nervosa, in Klammern angegeben die jeweiligen Frequenzen, bei 58 Familientrios

Der χ^2-Test ergibt einen **p-Wert** von **0,1263**. Da dies > 0,05 ist, liegt ebenfalls kein Transmissionsungleichgewicht vor. Der TDT bestätigt auch hier die Ergebnisse der Assoziationsuntersuchung.

Die Fallzahl, die nötig wäre, um bei einer Power von 80% und einem Signifikanzniveau von 5% den beobachteten Unterschied signifikant nachweisen zu können, ist n = 321 (heterozygote Elternteile).

5.2 Sequenzierung

Um die Richtigkeit der Untersuchungen zu verdeutlichen wurde von drei Probanden das vervielfältigte PCR-Segment sequenziert, also in seiner Basenfolge dargestellt (siehe Abbildung 5; Seite 72). Bei den Proben handelt es sich um die PCR-Produkte eines heterozygoten Probanden (Abbildung 5.6a+b), eines homozygoten Variationsträgers (Abbildung 5.6c+d) und eines homozygoten Probanden für das Wildtyp-Allel (Abbildung 6e+f). Es wurden die Sequenzen jeweils zweimal dargestellt, einmal mit dem Forward-Primer und einmal mit dem Reverse-Primer (ob1-ex-F und ob1-ex-R). Die mit einem roten Kreis markierten Basen stellen die untersuchte Position +19 des 1. Exon des Leptingens dar. Bei Abbildung 5.6a und 5.6d kann man an der markierten Stelle im Unterschied zu den anderen Sequenzen sehen, daß es zwei verschiedenfarbige

Peaks, also zwei verschiedene Signale gibt, was durch die Heterozygotie des Probanden an dieser Stelle bedingt ist.

Ausgesucht für die Sequenzierung wurde die DNA eines heterozygoten Probanden und die DNA seiner beiden Eltern, wobei die Mutter monozygot für das G-Allel ist (Variation) und der Vater monozygot für das A-Allel (Wildtyp). Die Ergebnisse der Sequenzierung stimmen mit den Ergebnissen der PCR-Amplifikation mit nachfolgendem Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung überein.

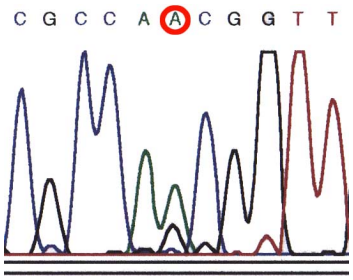

Abbildung 5.6a

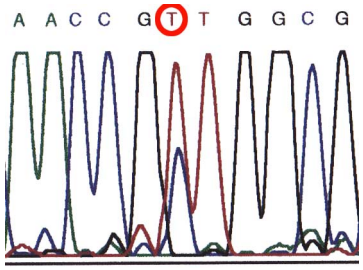

Abbildung 5.6b

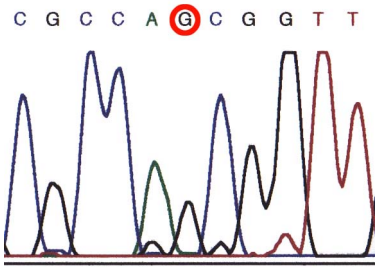

Abbildung 5.6c

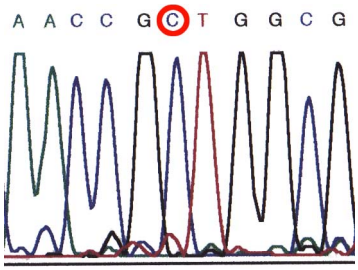

Abbildung 5.6d

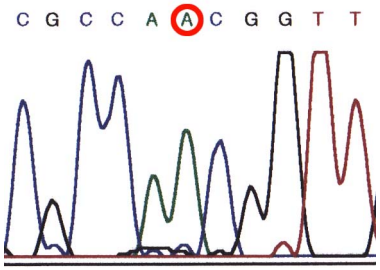

Abbildung 5.6e

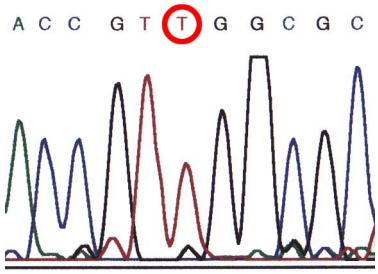

Abbildung 5.6f

Abbildung 5.6: Darstellung der Sequenzausschnitte der PCR-Produkte drei verschiedener Probanden

Jede Sequenz ist zweimal dargestellt, jeweils mit Forward-Primer (Abb. 6a+c+e) und Reverse-Primer (Abb. 6b+d+f): a und b zeigen die Sequenz des heterozygoten Probanden (man beachte die zwei verschiedenfarbigen Peaks unter der markierten Base); c und d zeigen die Sequenz des homozygoten Variationsträgers (G-Allel); e und f die des homozygoten Wildtyps (A-Allel).

6 Diskussion

Adipositas mit ihren Begleiterscheinungen stellt mittlerweile die häufigste Stoffwechsel- und Ernährungsstörung in den westlichen Industrienationen dar; in der Bevölkerung Europas ist eine steigende Prävalenz für Übergewicht zu beobachten [Barth et al., 1997; Kuskowska-Wolk et al., 1993]. Dies ist einerseits durch veränderte Umwelteinflüsse bedingt, aber molekulargenetische Untersuchungen der letzten Jahre deuten auch darauf hin, daß genetische Faktoren an der Entwicklung beteiligt sind (siehe Kapitel 2.2). Daß es bisher noch kaum langfristig erfolgversprechende Therapiemethoden gibt [Paumgartner et al., 1999], zeigt, wie wichtig es ist die molekularen Mechanismen in der Pathogenese der Adipositas zu erforschen. Ähnliches gilt für die Entstehung einer Anorexia nervosa.

Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien haben ergeben, daß genetische Komponenten einen wichtigen Einfluß auf die Gewichtsentwicklung haben (siehe Abschnitt 2.2). Schon 1953 wurde von Kennedy eine sogenannte *„Lipostase-Theorie“* postuliert. Demnach soll in Abhängigkeit von der Masse des Fettgewebes ein löslicher Sättigungsfaktor - vom Fettgewebe produziert - ins Blut abgegeben werden, der Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch reguliert. Gestützt wurde diese Theorie durch Parabiose-Experimente, wobei die Blutkreisläufe von übergewichtigen (*obese*-Mäuse) und schlanken Mäusen gekoppelt wurden. Bei erstgenannten führte dies zu einer deutlichen Gewichtsabnahme. Die Klonierung des Leptingens bei Maus und Mensch, sowie die Charakterisierung seines Genproduktes Leptin brachte die Adipositas-Forschung einen großen Schritt näher an den Beweis der *„Lipostase-Theorie“* heran. Leptin ist solch ein Signalstoff, der vor allem in Fettzellen produziert und in die Blutbahn sezerniert wird. Seine Wirkung wird über Rezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen übertragen. Kopplungsanalysen deuten darauf hin, daß Mutationen im Bereich des Leptingens mit Adipositas gekoppelt sind. Es erscheint daher sinnvoll, Mutationen in diesem Gen auf ein gehäuftes Auftreten bei adipösen Probanden oder auch Patientinnen mit Anorexia nervosa zu untersuchen.

Hier wurde ein Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens untersucht. Dieser Polymorphismus, der zuerst von Hager et al. [1998] beschrieben wurde, liegt an der Position +19. An dieser Stelle erfolgt ein Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Da

das erste Exon nicht transkribiert wird, ändert sich durch diesen Austausch die Aminosäuresequenz des Proteins Leptin nicht. Dennoch kann dieser Polymorphismus Auswirkungen auf die Transkriptionseinleitung haben und könnte somit für die Entstehung von Adipositas oder Anorexia nervosa verantwortlich sein. Gegenstand dieser Arbeit war es, die Allelverteilungen des Polymorphismus zu bestimmen. Die Allele wurden dabei in einem Kollektiv von extrem adipösen Kindern, bei Patientinnen mit Anorexia nervosa, bei sehr untergewichtigen StudentInnen und bei übergewichtigen StudentInnen, die als Kontrolle dienten, bestimmt. Zudem wurde ein TDT durchgeführt, um ein Transmissionsungleichgewicht herauszufinden. Ein solches Ungleichgewicht könnte eine funktionelle Relevanz des untersuchten Polymorphismus für einen der untersuchten Phänotypen bedeuten.

6.1 Methodendiskussion

6.1.1 PCR

Um den interessierenden DNA-Bereich, in dem die hier untersuchte Mutation liegt, amplifizieren zu können, wurde als Methode die PCR gewählt. Diese ist ein sehr schnelles, empfindliches und einfach durchzuführendes Verfahren der DNA-Amplifizierung. Daher ist sie sehr beliebt und weit verbreitet. Innerhalb weniger Stunden kann man DNA vervielfältigen. Ein Nachteil ist, daß bei Verwendung von Polymerasen, hier der *Taq*-Polymerase, das vervielfältigte DNA-Stück eine gewisse Fehlerquote aufweist, da die *Taq*-Polymerase keine korrigierenden Exonukleasen enthält. Diese sind in natürlichen Zellen vorhanden und verhindern so den Einbau von falschen Basen. Somit können bei der PCR einzelne DNA-Stränge des PCR-Produkts falsche Basen enthalten. Diese sind jedoch zufällig über die DNA verteilt, so daß man den Einbau einer falschen Base in einem oder mehreren Strängen im Vergleich zu der großen Anzahl „korrekter“ Stränge vernachlässigen kann [Strachan und Read, 1996].
Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß durch Verunreinigung (Hautzellen, Haarzellen, unsaubere Arbeitsplatte oder –geräte) unspezifische Amplifikate gebildet werden. Sauberes und ordentliches Arbeiten ist daher unabdingbar. Um Verunreinigungen an verwendeten Geräten und Materialien zu vermeiden, wurden die Materialien, die es zuließen im Autoklaven sterilisiert. Die verwendeten Reagenzien

und Lösungen wurden auf Vorrat zubereitet und in kleinen Mengen (Aliquots) aufbewahrt. Damit wurde das Kontaminationsrisiko möglichst gering gehalten. Auch aus diesem Grund wurde die DNA bei der Vorbereitung des PCR-Ansatzes immer erst zum Schluß hinzugefügt. Auf die Trennung der einzelnen Arbeitsbereiche wurde bereits zuvor eingegangen (siehe 4.2.2.3). Zur weiteren Kontrolle, ob sich unspezifische Amplifikate gebildet hatten, wurde jeweils eine Wasserprobe mit angesetzt. Diese durfte kein Amplifikat enhalten, ansonsten wurde der gesamte PCR-Ansatz wiederholt.

6.1.2 DNA-Digestion

Um die Allelverteilung des Polymorphismus nachzuweisen wurde die Methode der DNA-Digestion gewählt. Das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment hat eine Größe von 240 bp. Da aufgrund der A/G-Mutation eine Schnittstelle für das Enzym *NspB*II entsteht, können nach Digestion mit diesem Enzym zwei Allele nachgewiesen werden. Das Fragment mit dem A-Allel wird durch das Enzym nicht geschnitten und ist somit weiterhin 240 bp groß, das Fragment mit dem G-Allel wird durch das Enzym geschnitten und es entstehen 2 Fragmente der Größe 198 bp und 42 bp (siehe Abschnitt 4.2.3). Da das Enzym *NspB*II nur eine spezifische Erkennungssequenz schneidet, ist die DNA-Digestion eine sehr genaue Methode, um Allelverteilungen zu untersuchen. Dabei muß natürlich darauf geachtet werden, daß die Erkennungssequenz von *NspB*II nur im Bereich der Mutation vorkommt und nicht ein zweites Mal in dem untersuchten Fragment. Daher wurden die Primer so ausgesucht, daß die Erkennungssequenz nur einmal vorkommt. Zur weiteren Kontrolle lief bei der Gelelektrophorese jeweils ein Längenstandard mit. Damit konnte die Größe der Fragmente abgelesen werden.

6.1.3 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wurden die aufzutrennenden Proben jeweils mit einem Gel-Ladungspuffer versehen. Dieser diente einerseits dazu, die Proben in den Taschen zu halten, andererseits ermöglichte er eine optische Kontrolle, wie weit die Proben in dem Gel schon gelaufen waren. So konnte kontrolliert werden, ob das kürzere Fragment (198

bp) nicht schon „aus dem Gel herausgelaufen“ war und man bei der Auswertung nur die längeren Fragmente berücksichtigte. Um Fehler bei der Auswertung der Gelelektrophorese zu vermeiden bzw. zu vermindern, wurde die Auswertung jeweils unabhängig voneinander von zwei Personen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte zudem direkt unter der UV-Lampe um durch Unreinheiten auf dem Thermopapier des Druckers nicht beeinträchtigt zu werden. Auch die Eingabe der Daten in den Computer wurde immer von zwei Personen überprüft. Ergaben sich Unstimmigkeiten, führte dies dazu, daß die betroffenen Proben erneut untersucht wurden.

6.1.4 Statistische Auswertung

Ein Einfluß des 19A/G-Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens auf die untersuchten Phänotypen Untergewicht, Übergewicht und Anorexia nervosa konnte mit Hilfe der Assoziationsansätze nicht nachgewiesen werden. Es ergab sich kein p-Wert kleiner als 0,05, also kein signifikantes Ergebnis (siehe Abschnitt 5.1.3).

Wie bereits ausführlich beschrieben gibt es drei Gründe für eine Assoziation zwischen einem Allel und einem bestimmten Phänotyp: das Allel hat tatsächlich einen direkten Einfluß auf den Phänotyp, die Assoziation wird vorgetäuscht, weil die Menschen mit und ohne den Phänotyp aus genetisch unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen kommen, oder das Allel ist an einen anderen – relevanten – Polymorphismus gekoppelt.

Bei einer Assoziationsuntersuchung, bei der die Allelverteilungen der „Fälle“ mit denen von Kontrollen verglichen werden (Fall-Kontroll-Studie) ergibt sich immer das Problem der Stratifikation: Die „Fälle“ könnten einer anderen genetischen Gruppe der Bevölkerung entstammen und an sich schon eine andere Häufigkeit für das untersuchte Allel aufweisen als die Kontrollgruppe. Dies ist bei den hier untersuchten Kollektiven eher unwahrscheinlich, da alle Probanden in den verschiedenen Gruppen jeweils aus verschiedenen Teilen Deutschlands stammen. Ganz ausschließen läßt sich das Problem der Stratifikation jedoch nicht, da die Kollektive sich hinsichtlich sozialer Schichtzugehörigkeit, Bildungsstand und Alter unterscheiden.
Um dieses Problem zu umgehen wurde auch ein TDT durchgeführt. Wie bereits beschrieben wird dabei das Problem der Stratifikation umgangen, da nur Trios,

bestehend aus betroffenem Proband und seinen Eltern, untersucht werden. Informativ sind dabei nur solche Elternteile, die für das getestete Allel heterozygot sind. Bestimmt wird, wie oft das betroffene Allel von einem heterozygoten Elternteil an das Kind vererbt wird. Ein Transmissionsungleichgewicht liegt dann vor, wenn ein Allel häufiger (oder seltener) an das betroffene Kind weitergegeben wird, als der Zufall es erklärt. Wenn dies so ist, könnte das bedeuten, daß das Allel gekoppelt und assoziiert ist mit dem untersuchten Phänotyp, was wiederum bedeutet, daß es einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und dem untersuchten Allel gibt. Bei dieser Untersuchung ergab der TDT jedoch weder beim Phänotyp Adipositas noch bei der Anorexia nervosa ein Transmissionsungleichgewicht, was die Ergebnisse der Assoziationsuntersuchung bestätigt. Die Auswertbarkeit des TDT wird allerdings durch seine besondere Struktur teilweise erheblich eingeschränkt, da es oft zu einer drastischen Senkung der Fallzahlen kommt.

Bezüglich der Fallzahlen könnte man noch diskutieren, daß diese in der Untersuchung im Allgemeinen zu gering sind. Bei den Assoziationsansätzen scheint diese Fehlerquelle keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen, da mehr als 100 Probanden in jedem Kollektiv untersucht wurden. Beim TDT ergibt sich da eher ein Problem, da zumindest bei der Anorexia nervosa die Fallzahlen mit 58 untersuchten Familientrios relativ gering ist.

Grobe methodische Fehler können weitgehend ausgeschlossen werden, da die gefundenen Genotypfrequenzen den in der Literatur veröffentlichten Daten ähneln und auch der Regel von Hardy-Weinberg folgen.

6.2 Ergebnisdiskussion

Bezüglich der vorangestellten Hypothese (siehe Kapitel 3) läßt sich aufgrund der Untersuchungen die folgende Aussage treffen:

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation des 19A/G-Polymorphismus zu einem der untersuchten Phänotypen und kein Transmissionsungleichgewicht von Allelen des 19A/G-Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens nachgewiesen werden. Daher ist es eher unwahrscheinlich, daß er sich auf das Körpergewicht auswirkt.

Die Vermutung, daß der Polymorphismus keinen Einfluß nimmt auf die Ausprägung des Körpergewichts, wird auch durch die enorm hohen Fallzahlen bestätigt, die nötig wären, um bei einer Power von 80% und dem Signifikanzniveau von 5% die in dieser Studie beobachteten Effekte signifikannt nachweisen zu können, wenn sie tatsächlich existieren würden. Diese Fallzahlen betragen bei der Assoziationsuntersuchung 175700 (Allele) und beim TDT 321 (heterozygote Elternteile) im Falle der Anorexia nervosa und 1315 (heterozygote Elternteile) im Falle der Adipositas, bei Betrachtung des Verhältnisses von transmittierten zu nicht-transmittierten A-Allelen.

Die Allelfrequenzen ähneln denen, die Hager et al. [1998] bei adipösen (BMI 47,4 ± 7,0 kg/m²) Probanden und schlanken Kontrollen (BMI < 27 kg/m²) fanden (s. Tab. 6.1). Dies könnte daran liegen, daß beide Studien einen ähnlichen ethnischen Hintergrund haben – bei beiden Kohorten handelte es sich um West-Europäer – und daß der Polymorphismus keinen Einfluß auf den Gewichtsphänotyp hat.

Die Assoziationstests konnten keinen Alleleffekt nachweisen. Daher spielt der Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens vermutlich keine Rolle bei der Ausprägung der drei untersuchten Phänotypen. Allerdings kann ein Effekt auf Grund der gefundenen Ergebnisse aber auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Allelfrequenzen in der normalen Kontrollgruppe bei Hager et al., 1998			Allelfrequenzen aller Gewichtsgruppen in dieser Studie		
A	35,6 %	(77)	**A**	36,9 %	(531)
G	64,4 %	(139)	**G**	63,1 %	(909)

Tabelle 6.1: Vergleich der Allelfrequenzen der Studie von Hager et al. [1998] und dieser Studie (Fallzahlen)

Auch wenn der hier untersuchte Polymorphismus anscheinend keine Rolle spielt, ist nicht ausgeschlossen, daß das Leptingen und Leptin eine Rolle bei der Kontrolle von Nahrungsaufnahme und Entstehung von verschiedenen Gewichtsextremen spielen könnte.

6.3 Erweiterte Diskussion

Die bisher in Bezug auf das Leptingen wohl wichtigsten gefundenen Polymorphismen sind die in Abschnitt 2.6.9 beschriebenen Mutationen [Montague et al., 1997; Strobel et al., 1998; Ozata et al., 1999]. Dabei handelt es sich um eine Deletion, also den Wegfall, eines Guanins in Kodon 133 bzw. um einen Arg-105-Trp-Austausch, die jeweils im homozygoten Zustand für extremes Übergewicht verantwortlich sind. Bei zahlreichen systematischen Mutationsanalysen des Leptingens konnten nur einige seltene Variationen identifiziert werden, denen bisher kein Einfluß auf den Regelkreis von Leptin nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 2.6.8). Allerdings handelt es sich bei den in Abschnitt 2.6.9 beschriebenen Mutationen im Leptingen des Menschen, die zu erheblicher Adipositas führen, um sehr seltene Genvarianten, wie z. B. in der Klinischen Forschergruppe gezeigt werden konnte [Hinney et al., 1997b+1998]. Sie können also nicht das häufige Auftreten von Adipositas in der Allgemeinbevölkerung erklären. Gleiches gilt für die von Clément et al., [1998] identifizierte Mutation im Leptinrezeptorgen. Die Mutation, ein G- zu A-Austauch, liegt in Exon 16 und führt

dazu, daß eine abnormale mRNA produziert wird, in der das 16. Exon fehlt, was wiederum zu einer fehlenden transmembranen und intrazellulären Domäne führt. Probanden, die homozygot für diese Mutation sind, zeigen eine früh einsetzende Adipositas (BMI im Alter von 19 Jahren 65,5 kg/m²). Desweiteren bleibt bei ihnen die Pubertät aus und die Sekretion von Wachstumshormonen und thyreotropen Hormonen ist reduziert, so daß eine Signalübertragung von Leptin nicht mehr möglich ist. Die Patientinnen wiesen kompensatorisch erhöhte Leptinspiegel auf. Im Gegensatz dazu hatten die Patienten mit den Mutationen im Leptingen durchweg erniedrigte Leptinspiegel.

In der Allgemeinbevölkerung ist Adipositas entsprechend der erhöhten Fettmasse meist mit hohen Leptinspiegeln vergesellschaftet (siehe Abschnitt 2.6.2), dementsprechend müßten adipöse Menschen weniger hungrig sein, was jedoch nicht der Fall ist. Erklärt wird dies damit, daß bei den meisten Personen mit Adipositas eine Leptinresistenz vorliegt. Es scheint einleuchtend anzunehmen, daß der Defekt im Leptinrezeptor oder Veränderungen in nachgeschalteten Regelkreisen für diese Art der Adipositas verantwortlich sind. Allerdings sind auch Mutationen im Leptinrezeptorgen äußerst selten (s. o.), so daß auch hier keine Erklärung für die erhöhten Leptinspiegel bei adipösen Menschen gefunden werden kann.

Mittlerweile konnten weitere Mutationen in Kandidatengenen gefunden werden, die für Adipositas verantwortlich sein könnten. So gelang es z. B. Krude et al. [1998] Mutationen im Pro-opiomelanicortin (POMC)-Gen nachzuweisen, deren Träger durch eine früh einsetzende Adipositas aufgefallen waren. Weiterhin ist belegt, daß eine Wechselwirkung zwischen Leptin und POMC sehr wahrscheinlich ist, da Leptinrezeptoren auf POMC-produzierenden Neuronen im Hypothalamus nachgewiesen werden konnten [Cheung et al., 1997].

Wie schon in Abschnitt 2.6.5 ausführlich beschrieben ist auch NPY ein weiterer Faktor, der mit Leptin in Wechselwirkung steht.

Insgesamt verdeutlichen diese Befunde, daß die Regulation des Körpergewichts einem sehr komplexen Mechanismus unterliegt, der bisher nur in Ansätzen verstanden ist. Adipositas ist eine Stoffwechselstörung, die durch den Einfluß vieler Gene bedingt ist. Nachdem die Gabe von rekombinantem Leptin bei Mäusen zur Gewichtsabnahme führte, ist es nur verständlich, daß Hoffnung bestand, dies könnte beim Menschen auch der Fall sein. Betrachtet man jedoch die hohen Leptinspiegel bei den meisten adipösen Patienten, so scheint es eher unwahrscheinlich, daß weitere Leptingaben zur

Gewichtsreduktion führen könnten. Erste klinische Versuche zur Leptin-Therapie sind bereits in Abschnitt 2.6.9 beschrieben, wo dem älteren der von Montague et al. [1997] identifizierten Kinder mit monogen bedingtem Leptin-Mangel rekombinantes Leptin verabreicht wurde [Farooqi et al., 1999]. Dabei wurde ein recht gutes Ergebnis erzielt - allerdings darf nicht vergessen werden, daß es sich hierbei um ein Kind mit Leptin-**Mangel** handelt.

Erste Ergebnisse von Phase I und Phase II Studien zur Leptin-Therapie bei adipösen Patienten ohne Defekt im Leptingen führten in Kombination mit Diät zu sehr unterschiedlichen, aber dennoch signifikanten Gewichtsabnahmen [Christos et al., 1999]. Dennoch bleibt abzuwarten, welche Ergebnisse die Phasen III und IV dieser Studie bringen werden.

6.4 Zusammenfassung

Das obese-Gen und sein Genprodukt Leptin spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Körpergewichts, wie in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnte. Der genaue, sehr komplexe Wirkmechanismus bleibt aber weiterhin unbekannt. Zwar gibt es einzelne deutlich mit Übergewicht assoziierte Mutationen, aber im allgemeinen bleibt die Vererbung der Phänotypen Übergewicht und Anorexia Nervosa noch im Dunklen.

7 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist vor allem in den westlichen Industriestaaten die Prävalenz für Adipositas (Übergewicht) gestiegen, wie epidemiologische Studien zeigen. Zu einem großen Problem wird dies auch deshalb, weil es bisher keine effektive Langzeittherapie der Adipositas gibt. Eine Erforschung der ursächlichen Faktoren ist daher zur Lösung dieses Problems erforderlich.

Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien weisen deutlich darauf hin, daß es neben Umwelteinflüssen auch eine Beteiligung genetischer Faktoren an der Ausprägung des Körpergewichts gibt. Dies gilt sowohl für Übergewicht, aber auch für Untergewicht und Anorexia nervosa.

Aus verschiedenen Tiermodellen monogen bedingter Adipositas haben sich verschiedene Kandidatengene für die Gewichtsregulation des Menschen ergeben. Seit der Klonierung eines dieser Kandidatengene im Jahre 1994 – das Leptingen - haben zahlreiche Forschergruppen neue Erkenntnisse über die Gewichtsregulation zusammengetragen. Dazu zählen außer anderen die Identifizierung des Genproduktes Leptin und dessen Rezeptoren. Verschiedene Kopplungsuntersuchungen deuten darauf hin, daß das Leptingen an der Entstehung von Adipositas beteiligt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Transmissionsungleichgewicht der verschiedenen Allele eines Polymorphismus im ersten Exon des Leptingens nachzuweisen bzw. auszuschließen, oder eine Assoziation eines der Allele mit einem bestimmten Körpergewichtsphänotyp zu bestätigen oder auszuschließen.

Bei dem Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin an der Position +19, der zum ersten Mal von Hager et al. [1998] beschrieben wurde. Durch diesen Austausch wird eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NspB*II erzeugt, womit sich der Polymorphismus mittels Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus gut nachweisen läßt. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde zuvor der interessierende Bereich der aus Leukozyten extrahierten DNA vervielfältigt. Das untersuchte Kollektiv setzte sich zusammen aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, aus übergewichtigen und untergewichtigen StudentInnen,

sowie Patientinnen mit Anorexia nervosa. Weiterhin wurden zum Teil die Eltern der adipösen Kinder sowie der Patientinnen mit Anorexia nervosa genotypisiert. Obwohl das erste Exon des Leptingens nicht transkribiert wird, wurde der Polymorphismus dennoch untersucht, da Mutationen in diesem Bereich Auswirkungen auf die Transkription haben könnten.

Um eine mögliche Assoziation des Polymorphismus zu den verschiedenen Gewichtsphänotypen feststellen zu können, wurden die Allelverteilungen der verschiedenen Kollektive verglichen (Fall-Kontrollstudie). Da man hierbei Stratifikationsprobleme nicht ausschließen kann, wurde zusätzlich ein *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) durchgeführt.

Der Vergleich der Allelverteilungen bei adipösen und untergewichtigen Probanden zeigte keinen signifikanten Unterschied. Es ergaben sich keine p-Werte $< 0{,}05$. Dabei glichen die in vorliegender Arbeit gefundenen Allelfrequenzen denen, die bereits früher für andere Studienkollektive beschrieben wurden [Hager et al., 1998].

Auch der TDT-Test ergab keine signifikanten Ergebnisse, weder bei den adipösen Probanden, noch bei den Patientinnen mit Anorexia nervosa. Die p-Werte lagen hier jeweils in Bereichen $> 0{,}2$, es ergab sich somit kein Transmissionsungleichgewicht.

Der hier untersuchte Polymorphismus des Leptingens ist somit höchstwahrscheinlich nicht an der Entstehung von Über-, Untergewicht oder Anorexia nervosa beteiligt.

Mittlerweile konnten jedoch einige monogen bedingte Formen der Adipositas beim Menschen identifiziert werden, denen Mutationen im Leptingen, aber auch im Leptinrezeptorgen zugrunde liegen. Bekannt sind auch monogene Formen in anderen Genen, wie z. B. dem POMC-Gen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die Untersuchungen der letzten Jahre deutlich geworden ist, daß die Gewichtsregulation beim Menschen einem komplexen Regelkreis unterliegt. In diesen Regelkreis nehmen zahlreiche - Umwelt- wie auch genetische - Faktoren Einfluß. Daher kann die Ursache für Abweichungen vom Normalgewicht, wie sie Adipositas und Anorexia Nervosa darstellen, in der Umwelt, in verschiedenen Genveränderungen oder auch einer Kombination aus diesen beiden Faktoren liegen.

8 Abkürzungsverzeichnis

σ	Standardabweichung
°C	Grad Celsius
µ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AN	Anorexia nervosa
anx	Anorexie
APA	American Psychiatric Assosiation
APS; $[NH_4]_2SO_4$	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
A^y	Agouti
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
C	Cytosin
C/EBP	CAT-enhancer-binding protein
ca.	circa
Cl	Chlor
cM	Centimorgan
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
db	Diabetes
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E_{260nm}	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamintetraaccetat
et al.	und Mitarbeiter
evtl.	eventuell
F	Forward-Primer

f	weibliches Geschlecht
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	Guanin
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCl	Salzsäure
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
ICD-10	internationaler Diagnoseschlüssel, Version 10
K	Kalium
kb	Kilobasen
kcal	Kilokalorien
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
M	molare Lösung
m	männlich
	milli
m²	Quadratmeter
MCH	Melatonin concentrating hormon
$MgCl_2$	Magnesium-Chlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mod.	modifiziert
mol	$6{,}023 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	messenger-RNA
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPY	Neuropeptid Y
***NspB*II**	Nostoc spezies B (Bakterium)

o. g.	oben genannte
ob	obese
Ob-1-ex-F und R	Primer Forward und Reverse für Exon 1
***Ob*-R**	obese-Rezeptor
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
pmol	picomol
R	Reverse-Primer
RCLB	Red cell lysis buffer
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Sodium-EDTA
sec	Sekunde
T	Thymin
TAE	Tris-HCl, Eisessig, EDTA
TBE	Tris-HCl, Borat, EDTA
TDT	Transmission disequilibrium test
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tub	tubby
U	Units
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

- **Ahima, R. S.,** Prabakaran D, Mantzoros C et al.: Role of Leptin in the neuroendocrine response to fasting. NATURE (1996); 382: 250-252
- **American Psychiatric Assoziation:** Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen; Übersetzt nach der 4. Auflage des „Diagnostic and statistical manual of Mental Disorders“ der American Psychiatric Assoziation; Deutsche Bearbeitung: Saß, H.; Wittchen, H.-U.; Zaudig, M.; HOGREFE-VERLAG FÜR PSYCHOLOGIE; GÖTTINGEN, BERN, TORONTO, SEATTLE (1994)
- **Banks, W. A**.; Kastin, A. J.; Huang, W.; Jaspan, J. B.; Maness, L. M. : Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. PEPTIDES (1996); 17: 305-311
- **Barash, I. A.;** Cheung, C. C.; Weigle, D. S.; Ren, H.; Kabigting, E. B.; Kuijper, J. L.; Clifton, D. K.; Steiner, R. A.: Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. ENDOCRINOLOGY (1996); 137: 3144-3147
- **Barth, N.**; Ziegler, A.; Himmelmann, G. W.; Coners, H.; Wabitsch, M.; Henninghausen, K.; Mayer, H.; Remschmidt, H.; Schäfer, H.; Hebebrand, J.: Significant weight gains in a clinical sample of obese children and adolescents between 1983 and 1995. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1997); 21: 122-126
- **Baumann, H.;** Morella, K. K.; White, D. W.: The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA (1996); 93: 8374-8378
- **Bennett, B. D.;** Solar, G. P.; Yuyn, J. Q.; Mathias, J.; Thomas, G. R.; Matthews, W.: A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. CURRENT BIOLOGY (1996); 6: 1170-1180
- **Billington, C. J.;** Briggs, J. E.; Grace, M.; Levine, A. S.: Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (1991); 260: R321-327
- **Böddeker, I.;** Ziegler, A.: Assoziations-und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT (2000); 125: 810-815

- **Boden, G.;** Chen, X.; Mozzoli, M.; Ryan, I.: Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1996); 81: 3419-3423
- **Bornstein, S. R.**: Is leptin a stress related peptide?. NATURE MEDICINE (1997); 3: 937
- **Bouchard, C.**; Tremblay, A.; Despres, J.-P.; Nadeau, A.; Lupien, P. J.; Theriault, G.; Dussault, J. Moorjani, S.; Pinault, S.; Fournier, G.: The response to long-term overfeeding in identical twins. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1990); 322: 1477-1482
- **Brabant, G.;** Horn, R.; Mayr, B.; von zur Mühlen, A.; Honegger, J.; Buchfelder, M.: Serum leptin levels following hypothalamic surgery. HORMONE AND METABOLIC RESEARCH (1996); 28: 728-731
- **Bray, G.**; York, D.: Hypothalamic and genetic obesity in experimental animal: an autonomic and endocrine hypothesis. PHYSIOLOGICAL REVIEW (1979); 59: 719-809
- **Bray, M. S.;** Boerwinkle, E.; Hanis, C. L.: OB gene not linked to human obesity in Mexican American affected sib pairs from Starr County, Texas. HUMAN GENETICS (1996); 98: 590-595
- **Burton, B. T.;** Foster, W.R.; Hirsch, J.; Van Itallie, T.B.: Health implications of obesity: an NIH consensus development conference. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1985); 9: 155-170
- **Campfield, L. A**.; Smith, F. J.; Guisez, Y.; Devos, R.; Burn, P.: Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. SCIENCE (1995); 269: 546-549
- **Carlsson, B.**; Lindell, K.; Gabrielsson, B.; Karlsson, C.; Bjarnason, R.; Westphal, O.; Karlsson, U.; Sjöström, L.; Carlsson, L. M. S.: Obese (ob) gene defects are rare in human obesity. OBESITY RESEARCH (1997); 5: 30-35
- **Caro, J. F.;** Kolaczynski, J. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Opentanova, I.; Goldman, W. H.; Lynn, R. B.; Zhang, P-L.; Sinha, M. K.; Considine, R. V.: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. THE LANCET (1996); 348: 159-161

- **Casey, V. A.;** Dwyer, J. T.; Coleman, K. A.; Valadin, I.: Body mass index from childhood to middle age: a 50-year-follow-up. AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION (1992); 56: 8-14
- **Cason, J.;** Ainley, C. C.; Wolstencroft, R. A.; Norton, K. R.; Thompson, R. P.: Cell-mediated immunity in anorexia nervosa. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (1986); 64: 370-375
- **Chandra, R. K.**: Cell-mediated immunity in genetically obese (C57BL/6J ob/ob) mice. AMERCAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION (1980); 33: 13-16
- **Chehab, F. F.;** Lim, M. E.; Lu, R.: Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. NATURE GENETICS (1996); 12; 318-320
- **Chen, H.**; Charlat, O.; Tartaglia, L. A.: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. CELL (1996); 84: 491-495
- **Cheung, C.**; Clifton, D.; Steiner, R.: Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. ENDOCRINOLOGY (1997); 138: 4489-4492
- **Christos, S.**; Mantzoros, M. D.: The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. ANNALS OF INTERNAL MEDICINE (1999); 130: 671-680
- **Chua, S. C.;** Chung, W. K.; Wu-Peng, X. S.; Zhang, Y.; Liu, S.-M.; Tartaglia, L.; Leibel, R. L.: Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. SCIENCE (1996); 271: 994-996
- **Clément, K.;** Garne, C.; Hager, J.; Philippi, A.; LeDuc, C.; Carey, A.; Harris, T. J. R.; Jury, C.; Cardon, L. R.; Basdevant, A.; Demenais, F.; Guy-Grand, B.; North, M.; Froguel, P.: Indication for linkage of the human ob gene region with extreme obesity. DIABETES (1996); 45: 687-690
- **Clément, K.;** Vaisse, C.; Lahlou, N.; Cabrol, S.; Pelloux, V.; Cassuto, D.; Gourmelen, M.; Dina, C.; Chambaz, J.; Lacorte, J – M.; Basdevant, A.; Bougnères, P.; Lebouc, Y.; Froguel, P.; Guy-Grand, B.: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. NATURE (1998); 392: 398-401
- **Cohen, B.;** Novick, D.; Rubinstein, M.: Modulation of insulin activities by leptin. SCIENCE (1996); 274: 1185-1188

- **Coleman, D. L.**: Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. DIABETOLOGIA (1978); 14: 141-148
- **Coners, H.**; Himmelmann, G. W.; Hebebrand, J.; Heseker, H.; Remschmidt, H.; Schäfer, H.: Perzentilenkurven für den body-mass index zur Gewichtsbeurteilung bei Kindern und Jugendlichen ab einem Alter von zehn Jahren. KINDERARZT (1996); 8: 1002-1007
- **Considine, R. V.;** Considine, E. L.; Williams, C. J.; Nyce, M. R.; Magosin, S. A.; Bauer, T. L.; Rosato, E. L.; Colberg, J.; Caro, J.F.: Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (1995); 95: 2986-2988
- **Considine, R. V**.; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, A.; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Marco, C. C.; McKee, L. J.; Bauer, T. L.; Caro, J. F.: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weigt and obese humans. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1996a); 334: 292-295
- **Considine, R. V.;** Considine, E. L.; Williams, C. J.; Nyce, M. R.; Zhang, P.; Opentanova, I.; Ohannesian, J. P.; Kolaczynski, J. W.; Bauer, T. L.; Moore, J. H.; Caro, J. F.: Mutation screening and identification of a sequence variation in the human ob gene coding region. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (1996b); 220: 735-739
- **Cumin, F**.; Baum, H-P.; Levens, N.: Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1996); 20: 1120-1126
- **Cusin, I.;** Sainsbury, A.; Doyle, P.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Jeanrenaud, B.: The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. DIABETES (1995); 44: 1467-1470
- **Duggirala, R.;** Stern, M. P.; Mitchell, B. D.; Reinhart, L. J.; Shipman, P. A.; Uresandi, O. C.; Chung, W. K.; Leibel, R. L.; Hales, C. N.; O'Connell, P.; Blangero, J.: Quantitative variation in obesity-related traits and insulin precursors linked to the ob gene region on human chromosome 7. AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS (1996); 59: 694-703
- **Dunbar, J. C.;** Hu, Y.; Lu, H.: Intracerebroventricular Leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. DIABETES (1997); 46: 2040-2043

- **Echwald, S. M.**; Rasmussen, S. B.; Sörensen, T. I. A.; Andersen, T.; Tybjærg-Hansen, A.; Clausen, J. O.; Hansen, L.; Hansen, T.; Pedersen, O.: Identification of two novel missense mutations in the human ob gene. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1997a); 21: 321-326
- **Echwald, S. M.;** Sorensen, T. D.; Sorensen, T. I. A.; Tybjaerg-Hansen, A.; Andersen, T.; Chung, W. K.; Leibel, R. L.; Pedersen, O.: Amino acid variants in the human leptin receptor: lack of association to juvenile onset obesity. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (1997B); 233: 248-252
- **Elbers, J. M. H.;** Asscheman, H.; Seidell, J. C.; Frölich, M.; Meinders, A. E.; Gooren, L. J. G.: Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1997); 82: 3267-3270
- **Ellrot, T.**; Pudel, V.: Moderne Adipositastherapie, über Gewicht und seine Therapie. AKTUELLE ERNÄHRUNGS-MEDIZIN (1996); 21: 73-80
- **Emillson, V.**; Liu, Y. L.; Cawthorne, M. A.; Morton, N. M.; Davenport, M.: Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. DIABETES (1997); 46: 313-316
- **Erickson, J. C.;** Hollopeter, G.; Palmiter, R. D.: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. SCIENCE (1996); 274: 1704-1707
- **Esler, M.;** Vaz, M.; Collier, G.; Nestel, P.; Jennings, G.; Kaye, D.; Seals, D.; Lambert, G. : Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys. LANCET (1998); 351: 897
- **Farooqi, I. S.**; Jebb, S. A.; Langmack, G.; Lawrence, E.; Cheetham, C. H.; Hughes, I. A.; McCamish, M. A.; O´Rahilly, S.: Effects of recombinant Leptin therapy in a child with congenital Leptin deficiency. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1999); 341: 879-884
- **Fernandes, G.**; Handwerger, B. S.; Yunis, E. J.; Brown, D. M.: Immune response in the mutant diabetic C57BL/Ks-dt+ mouse. Discrepancies between in vitro and in vivo immunological assays. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (1978); 61: 243-250

- **Fichter, M. M.**: Magersucht und Bulimia. Empirische Untersuchungen zur Epidemiologie, Symptomatologie, Nosologie und zum Verlauf. SPRINGER VERLAG; BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK, TOKYO (1985)
- **Friedman, J. M.;** Leibel, R. L.; Bahary, N.; Siegel, D. A.; Truett, G.: Genetic analysis of complex disorders: molecular mapping of obesity genes in mice and humans. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES (1991a); 630: 100-115
- **Friedman, J. M.;** Leibel, R. L.; Siegel, D.; Walsh, J.; Bahary, N.: Molecular mapping of the mouse ob mutation. GENOMICS (1991b); 11: 1054-1062
- **Füeßl, H. S.;** Middeke, M. R. F.: Anamnese und klinische Untersuchung. DUALE REIHE; HIPPOKRATES-VERLAG; STUTTGART (1998)
- **Gassen, H. G**.; Minol, K.: Gentechnik. UTB FÜR WISSENSCHAFT; GUSTAV FISCHER VERLAG; JENA, STUTTGART; 4. AUFLAGE (1996)
- **Gelfand, D. H**.; White, T. J.: Thermostable DNA Polymerases. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninky, J. J.; White, T. J. (eds.): PCR Protocols. ACADEMIC PRESS; SAN DIEGO (1990): 129-141
- **Golden, P. L.**; Maccagan, T. J.; Pardrige, W. M.: Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATIONS (1997); 99: 14-18
- **Gong, D-W.;** Bi, S.; Pratley, R. E.; Weintraub, B. D.: Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1995); 271: 3971-3974
- **Gotoda, T**.; Manning, B. S.; Goldstone, A. P.; Imrie, H.; Evans, A. L.; Strosberg, A. D.; McKeigue, P. M.; Scott, J.; Aitman, T. J.: Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white british male population. HUMAN MOLECULAR GENETICS (1997); 6: 869-876
- **Gray, D. S.**: Diagnosis and prevalence of obesity. THE MEDICAL CLINICS OF NORTH AMERICA (1989); 73: 1-13
- **Green, E. D**.; Maffei, M.; Braden, V. V.; Proenca, R.; DeSilva, U.; Zhang, Y.; Chua Jr., S. C.; Leibel, R. L.; Weissenbach, J.; Friedmann, J. M.: The human obese [ob] gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. GENOME RESEARCH (1995); 5: 5-12

- **Hager, J.;** Clément, K.; Francke, S.; Dina, C.; Raison, J.; Lahlou, N.; Rich, N.; Pelloux, V.; Basdevant, A.; Guy-Grand, B.; North, M.; Froguel; P.: A polymorphism in the 5' untranslated region of the human ob gene is associated with low leptin levels. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1998); 22: 200-205
- **Halaas, J. L.;** Gajiwala, K. S.; Maffei, M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T; Rabinowitz, D.; Lallone, R. L.; Burley, S. K.; Friedman, J. M.: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. SCIENCE (1995); 269: 543-546
- **Hamilton, B. S**.; Paglia, D.; Kwan, A. Y. M.; Deitel, M.: Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. NATURE MEDICINE (1995); 1: 953-956
- **Hartung**: Statistik. Lehr-und Handbuch der angewandten Statistik; 8. Auflage. OLDENBOURG-VERLAG; MÜNCHEN (1991)
- **He, Y.;** Chen, H.; Quon, M. J.; Reitmans, M.: The mouse obese gene. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1995); 270: 28887-28891
- **Hebebrand, J.;** Heseker, H.; Himmelmann, W.; Schäfer, H.; Remschmidt, H.: Altersperzentilen für den Body-Mass-Index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich Übersicht zu relevanten Einflußfaktoren. AKTUELLE ERNÄHRUNGS-MEDIZIN (1994); 19: 259-256
- **Hebebrand, J.** Hinney, A.; Klug, J.: Neue molekularbiologische Befunde zur Regulation des Körpergewichts. BIOSPEKTRUM (1995a); 3: 30-32
- **Hebebrand, J.;** Herpertz.Dahlmann, B.; Remschmidt, H.: Anorexia nervosa: Aspekte moderner Gewichtsforschung. THERAPIEWOCHE NEUROLOGIE PSYCHIATRIE (1995b); 28: 1663-1668
- **Hebebrand, J**.; van der Heyden, J.; Devos, R.; Köpp, W.; Herpertz, S.; Remschmidt, H.; Herzog, W.: Plasma concentrations of obese protein in anorexia nervosa. THE LANCET (1995c); 346: 1624-1625
- **Hebebrand, J**.; Coners, H.; Barth, N.; Remschmidt, H.: Genetik der Eßstörungen. PSYCHO (1996a); 22: 188-197
- **Hebebrand, J**.; Himmelmann, G. W.; Coners, H.; Barth, N.; Heseker, H.; Wewetzer, C.; Herpertz-Dahlmann, B. M.; Schäfer, H.; Remschmidt, H.: Zur Problematik des „Zielgewichts“ bei der Behandlung der Anorexia nervosa. ZEITSCHRIFT FÜR KINDER- UND JUGENDPSYCHIATRIE (1996b); 24: 92-104

- **Hebebrand, J.;** Himmelmann, G. W.; Herzog,W.; Herpertz-Dahlmann, B. M.; Steinhausen, H.-C.; Amstein,M.; Seidel, R.; Deter, H.-C.; Remschmidt, H.; Schäfer, H.: Prediction of low body weight at long-term follow-up in acute anorexia nervosa by low body weight at referral. AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY (1997); 154: 566-569
- **Hebebrand, J**.; Remschmidt, H.: Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. MEDIZINISCHE KLINIK (1995a); 90: 403-410
- **Hebebrand, J.;** Remschmidt, H.: Genetische Aspekte der Adipositas. ADIPOSITAS (1995b); 9: 20-24
- **Hebebrand, J.;** Remschmidt, H.: Anorexia nervosa viewed as an extreme weight condition: genetic implications. HUMAN GENETICS (1995c); 95: 1-11
- **Heimann, M. L.;** Ahima, R. S.; Craft, L. S.; Schoner, B.; Stephens, T. W.; Flierl, J. S.: Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. ENDOCRINOLOGY (1997); 138: 3859-3863
- **Henninghausen, K.;** Rischmuller, B.; Heseker, H.; Remschmidt, H.; Hebebrand, J.: Low body mass indices in adolescents with obsessiv-compulsive disorders. ACTA PSYCHIATRICA SCANDINAVIA (1999); 99: 267-273
- **Hinney, A.;** Barth, N.; Ziegler, A.; von Prittwitz, S.; Hamann, A.; Henninghausen, K.; Lentes, K-U.; Heils, A.; Rosenkranz, K., Roth, H.; Coners, H.; Mayer, H.; Herzog, W.; Siegfried, W.; Lehmkuhl, G.; Poustka, F.; Schmidt, M. H.; Schäfer, H.; Grzeschik, K-H.; Pirke, K. M.; Lesch, K. P.; Remschmidt, H.; Hebebrandt, J.: Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distribution in relationship to body weight and in anorexia nervosa. LIFE SCIENCES (1997a); 61: PL295-303
- **Hinney, A.;** Bornscheuer, A.; Depenbusch, M.; Mierke, B.; Tölle, A.; Mayer, H.; Siegfried, W.; Remschmidt, H.; Hebebrand, J.: Abscence of leptin deficiency mutation in extremely obese German children and adolescentes. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY AND RELATED METABOLIC DISORDERS (1997b); 21: 1190
- **Hinney, A.;** Rosenkranz, K.; Roth, H.; Hebebrand, J.: Gene, in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. ADIPOSITAS (1997c); 13: 6-12

- **Hinney, A.;** Bornscheuer, A.; Depenbusch, M.; Mierke, B.; Tölle, A.; Middeke, K.; Ziegler, A.; Roth, H.; Gerber, G.; Zamzow, K.; Ballauff, A.; Hamann, A.; Mayer, H.; Siegfried, W.; Lehmkuhl, G.; Poustka, F.; Schmidt, M., H.; Hermann, H.; Herpertz-Dahlmann, B. M.; Fichter, M.; Remschmidt, H.; Hebebrand, J.: No evidence for involvement of the leptin gene in anorxia nervosa, bulimia nervosa, underweight or early onset extreme obesity: identification of two novel mutations in the coding sequence and a novel polymorphism in the leptin gene linked upstream region. MOLECULAR PSYCHIATRY (1998); 3: 539-543
- **Holland, A. J.;** Hal, A.; Murray, R.; Russell, G. F. M.; Crisp, A. H.: Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. BRITISH JOURNAL OF PSYCHIATRY (1984); 145: 414-419
- **Holland, A. J.;** Sicotte, N.; Treasure, J.: Anorexia nervosa: evidence for a genetic basis. JOURNAL OF PSYCHOSOMATIC RESEARCH (1988); 32: 561-571
- **Houseknecht, K. L.;** Mantzoros, C. S.; Kuliawat, R.; Hadro, E.; Flierl, J. S.; Kahn, B. B.: Evidence for Leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. DIABETES (1996); 45: 1638-1643
- **Ingalls, A. M.;** Dickie, M. M.; Snell, G. D.: Obese, a new mutation in the house mouse. THE JOURNAL OF HEREDITY (1950); 41: 317-318
- **Isse, N.;** Ogawa, Y.; Tamura, N.; Masuzaki, H., Mori, K.; Okazaki, T.; Satoh, N.; Shigemoto, M.; Yoshimasa,Y.; Nishi, S.; Hosoda, K.; Inazawa. J.; Nakao, K.: Sructural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1995); 270: 27728-27733
- **Jacob, R. J.;** Dziura, J.; Medwick, M. B.; Leone, P.; Caprio, S.; During, M.; Shulman, G. I.; Sherwin, R. S.: The effect of leptin is enhanced by microinjection into the ventromedial hypothalamus. DIABETES (1997); 46: 150-152
- **Karvonen, M. K.;** Pesonen, U.; Heinonen, P.; Laakso, M.; Rissanen, A.; Naukkarinen, H.; Valve, R.; Uusitupa, M. I. J.; Koulu, M.: Identification of new sequence variants in the leptin gene. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1998); 83: 3239-3242
- **Kennedy, G. C.:** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON (1953); B140: 578-592

- **Kieffer, T. J**.; Heller, R. S.; Habener, J. F.: Leptin receptors expression on pancreatic beta-cells. BIOCHEMICAL BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION (1996); 224: 522-527
- **Knippers, R.:** Molekulare Genetik; 6. Auflage. THIEME VERLAG; STUTTGART, NEW YORK (1995)
- **Koistinen, H. A.;** Koivisto, V. A.; Andersson, S.; Karonen, S.-L.; Kontula, K.; Oksanen, L. Teramo, K. A.: Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1997); 82: 3328-3330
- **Kolaczynski, J. W.;** Considine, R. V.; Ohannesian, J.; Marco, C.; Opentanova, I.; Nyce, M. R.; Myint, M.; Caro, J. F.: Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans. DIABETES (1996a); 45: 1511-1515
- **Kolaczynski, J. W**.; Ohannesian, J. P.; Considine, R. V.; Marco, C. C.; Caro, J. F.: Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1996b); 81: 4162-4165
- **Kolacynski, J. W.;** Nyce, M. R.; Considine, R. V.; Boden, G.; Nolan, J. J.; Henry, R.; Mudaliar, S. R.; Olefsky, J.; Caro, J. F.: Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. DIABETES (1996c); 45: 699-701
- **Köpp, W.;** Blum, W. F.; von Prittwitz, S.; Ziegler, A; Lubbert, H.; Emons, G.; Herzog, W.; Herperts, S.; Deter, H. C.; Remschmidt, H.; Hebebrand, J.: Low leptin levels predict amenorrhea in underweight and eating disordered females. MOLECULAR PSYCHIATRY (1997); 2: 335-340
- **Krude, H**.; Biebermann, H.; Luck, W.; Horn, R.; Brabant, G.; Gruters, A.: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutation in humans. NATURE GENETICS (1998); 19: 155-157
- **Kuskowska-Wolk, A.**; Bergström, R.: Trends in body-mass index and prevalence of obesity in swedish men 1980-1989. JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY AND COMMUNITY HEALTH (1993); 47: 103-108
- **Lander, E. S**.; Schork, N. J.: Genetic dissection of complex traits. SCIENCE (1994); 265: 2037-2048

- **Lee, G. H.;** Proenca, R.; Montez, J. M., Carroll, K. M.; Darvishzadeh, J. G.; Lee, J. I.; Friedman, J. M.: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. NATURE (1996); 379: 632-635
- **Lentes, K.U**.; Hinney, A.; Ziegler , A.; Rosenkranz, K.; Wurmser, H.; Barth, N.; Jacob, K.; Coners, H.; Mayer, K.; Grzeschik, K.-H.; Schäfer, H.; Remschmidt, H.; Pierke, K. M.; Hebebrand, J.: Evaluation of a Cys23Ser mutation within the human 5-HT_{2c} receptor gene: No evidence for an association of the mutant allele within obesity or underweight in children, adolescent and young adults. LIFE SCIENCE (1997); 61: 9-16
- **Li, W.-D.;** Reed, D. R.; Lee, J. H.; Xu, W.; Kilker, R. L.; Sodam, B. R.; Price, R. A.: Sequence variants in the 5´flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. ANNALS OF HUMAN GENETICS. (1999); 63: 227-234
- **Licino, J.;** Mantzoros, C.; Negrao, A. B.; Cizza, G.; Wong, M. L.; Bongiorno, P. B.; Chrousos, G. P.; Karp, B.; Allen, C.; Flier, J. S.; Gold, P. W.: Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. NATURE MEDICINE (1997); 3: 575-579
- **Loffreda, S.;** Yang, S. Q.; Lin, H. Z.; Karp, C. L.; Brengman, M. L.; Wang, D. J.; Klein, A. S.; Burkley, G. B.; Bao, C.; Noble, D. W.; Lane, M. D.; Diehl, A. M.: Leptin regualtes proinflammatory immune response. THE FASEB JOURNAL (1998); 12: 57-65
- **Lönnqvist, F.;** Arner, P.; Nordfors, L.; Schalling, M.: Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. NATURE MEDICINE (1995); 1: 950-953
- **Lord, G. M.;** Matarese, G.;Howard, J. K.; Baker, R.J.; Bloom, S. R.; Lechler, R. I.: Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. NATURE (1998); 394: 897-901
- **Luheshi, G. N.;** Gardner, J. D.; Rushforth, D. A.; Loudon, A. S.; Rothwell, N. J.: Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA (1999); 96: 7047-7052

- **Mac Dougald, O. A.**; Hwan, C. S.; Fan, H.; Lane, M. D.: Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and LT3-L1 adipocytes. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SIENCES OF THE USA (1995); 92: 9034-9037
- **Madej, T.**; Boguski, M. S.; Bryant, S. H.: Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. FEBS LETTERS (1995); 373: 13-18
- **Maffei, M.;** Halaas, J.; Ravussin, E.; Pratley, R. E.; Lee, G. H.; Zhang, Y.; Fei, H.; Kim, S.; Lallone, R.; Ranganathan, S.; Kern, P. A.; Friedman, J. M.: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. NATURE MEDICINE (1995); 1: 1155-1161
- **Maffei, M.;** Stoffel, M.; Barone, M.; Moon, B.; Dammermann, M.; Ravussin, E.; Bogardus, C.; Ludwig, D. S.; Flier, J. S.; Talley, M.; Auerbach, S.; Friedman, J. M.: Absence of mutations in the human ob gene in obese / diabetic subjects. DIABETES (1996); 45: 679-682
- **Malmström, R.;** Taskinen, M. R.; Karonen, S. L.; Yki-Jarvinen, H.: Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. DIABETOLOGIA (1996); 39: 993-996
- **Mammès, O.;** Betoulle, D.; Aubert, R.; Giraud, V.; Tuzet, S.; Petiet, A.; Colas-Linhart, N.; Fumeron, F.: Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene. DIABETES (1998), 47: 487-489
- **Mantzoros, C. S.;** Flier, J. S.; Rogol, A. D.: A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1997); 82: 1066-1070
- **Masuzaki, H.;** Ogawa, Y.; Sagawa, N.; Hosoda, K.; Matsumoto, T.; Mise, H.; Nishimura, H.; Yoshimasa, Y.; Tanaka, I.; Mori, T.; Nakao, K.: Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. NATURE MEDICINE (1997); 3: 1029-1033
- **Mathiak, K.;** Gowin, W.; Hebebrand, J.; Ziegler, A.; Blum, W. F.; Felsenberg, D.; Lübbert, H. Köpp, W.: Serum leptin levels, body fat deposition, and weight in females with Anorexia or bulimia nervosa. HORMONE AND METABOLIC RESEARCH COMMUNICATIONS (1999); 31: 274-277

- **Matkovic, V.;** Ilich, J. Z.; Skugor, M.; Badenhop, N. E.; Goel, P.; Clairmont, A.; Klisovic, D.; Nahhas, R. W.; Landoll, J. D.: Leptin is inversely related to age at menarche in human females. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1997); 82: 3239-3245
- **Mercer, J. G.;** Hoggard, N.; Williams, L. M.; Lawrence, C. B.; Hannah, L. T.; Morgan, P. J.; Trayhurn, P.: Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY (1996); 8: 7337-35
- **Metropolitan Life Insurance Company:** New weight standards for men and for women. STATISTICAL BULLETIN (1959); 40: 1-4
- **Mikhail, A. A.**; Beck, E. X.; Shafer, A.; Barut, B:; Gbur, J. S.; Zupancic, T. J.; Schweitzer, A. C.; Cioffi, J. A.; Lacaud, G.; Ouyang, B.; Keller, G.; Snodgrass, H. R.: Leptin stimualtes fetal and adult erythroid and myeloid development. BLOOD (1997); 89: 1507-1512
- **Miller, S. A.;** Dykes, D. D.; Polesky, H. F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. NUCLEIC ACIDS RESEARCH (1988); 21: 1407-1414
- **Miller, S. G.;** De Vos, P.; Guerre-Millo, M.; Wong, K.; Herman , T.; Staels, B.; Briggs, M. R.; Auwex, J.: The adipocyte specific transcription factor C/EBPα modulates human ob gene expression. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA (1996); 93: 5507-5511
- **Mistry, A. M.;** Swick, A. G.; Romsos, D. R.: Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and *ob/ob* mice. JOURNAL OF NUTRITION (1997); 127: 2065-2072
- **Mizuno, T. M.**; Kleopoulos, S. P.; Bergen, H. T.; Roberts, J. L.; Priest, C. A.; Mobbs, C. V.: Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. DIABETES (1998); 47: 294-297
- **Montague, C. T.;** Farooqi, I. S.; Whitehead, J. P.; Soos, M. A.; Rau, H.; Wareham, N. J.; Sewter, C. P.; Digby, J. E.; Mohammed, S. N.; Hurst, J. A.; Cheetham, C. H.; Early, A. R.; Barnett, A. H.; Prins, J. B.; O'Rahilly, S.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. NATURE (1997); 387: 903-908

- **Moon, B. C**. and Friedman, J. F.: The molecular basis of the obese mutation in ob^{2J} mice. GENOMICS (1997); 42: 152-156
- **Mounzih, K.;** Lu, R.; Chehab, F. F.: Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. ENDOCRINOLOGY (1997); 138: 1190-1193
- **Müller, G.;** Ertl, J.; Gerl, M.; Preibisch, G.: Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1997); 272: 10585-10593
- **Mullis, K. B.**: The unusual origin of the polymerase chain reaction. SCIENTIFIC AMERICA (1990); 262: 56-61, 64-65
- **Niki, T.;** Mori, H.; Tamori, Y.; Kishimoto-Hashiramoto, M.; Ueno, H.; Araki, S.; Masugi, J.; Sawant, N.; Majithia, H. R.; Rais, N.; Hashiramoto, M.; Taniguchi, H.; Kasuga, M.: Molecular screening in japanese an asian indian NIDDM patients associated with obesity. DIABETES (1996); 45: 675-678
- **Norman, R. A.;** Leibel, R. L.; Chung, W.K.; Power-Kehoe, L.; Chua Jr., S. C.; Knowler, W. C.; Thompson, D. B.; Bogardus, C.; Ravussin, E.: Absence of linkage of obesity and energy metabolism to markers flanking homologues of rodent obesity genes in Pima Indians. DIABETES (1996); 45: 1229-1232
- **Oksanen, L.;** Öhman, M.; Heiman, M.; Kaiulainen, K., Kaprio, J.; Mustajoki, P.; Koivisto, V.; Koskenvuo, M.; Jänne, O. A.; Peltonen, L.; Kontula, K.: Markers for the gene ob and serum leptin levels in human morbid obesity. HUMAN GENETICS (1997a); 99: 559-564
- **Oksanen, L.;** Kainulainen, K.; Heiman, M.; Mustajoki, P.; Kauppinen-Mäkelin, R.; Kontula, K.: Novel polymorphism of the human ob gene promoter in lean and morbidly obese subjects. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1997b); 21: 489-494
- **Ostlund Jr.,** R. E.; Yang, J. W.; Klein, S.; Gingerich, R.: Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1996); 81: 3909–3913

- **Ozata, M.;** Ozdemir, I. C.; Licino, J.: Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1999); 84: 3686-3695
- **Passarge E.:** Taschenatlas der Genetik. THIEME VERLAG; STUTTGART, NEW YORK(1994)
- **Paumgartner, G.**; Brandt, T.; Greten, H.; Koch, K. M.; Lode, H.; van de Loo, J.; Schattenkirchner, M.; Seeger, W.; Steinbeck, G.; Ziegler, R.: Therapie innerer Krankheiten (9. Auflage). SPRINGER VERLAG BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK, BARCELONA, HONGKONG, LONDON, MAILAND, PARIS, SINGAPUR, TOKIO (1999)
- **Pelleymounter, M. A.;** Cullen, M. J.; Baker, M. B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F.: Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. SCIENCE (1995); 269: 540-543
- **Pérusse, L.;** Trmblay, C.; Leblanc, C.; Bouchard, C.: Genetic and environmental influences on level of habitual physical activity and exercise participation. AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY (1989); 129: 1012-1022
- **Poehlman, E. T.;** Tremblay, A.; Despres, J. P.; Tremblay, A.; Fontaine, E.; Pérusse, C.; Theriault, G.; Bouchard, C.: Genotype-controlled changes in body composition and fat morphology following overfeeding in twins. AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION (1986); 43: 723-731
- **Poskitt, E. M. E**.: Which children are at risk of obesity? NUTRITION RSEARCH (1993); 13: 83-93
- **Qu, D.;** Ludwig, D. S.; Gammeltoft, S.; Piper, M.; Pelleymounter, M. A.; Cullen, M. J.; Mathes, W. F.; Przypek, R.; Kanarek, R.; Maratos-Flier, E.: A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. NATURE (1996); 380: 243-247
- **Reed, D. R.;** Ding, Y.; Xu, W.; Cather, C.; Green, E. D.; Price, R. A.: Extreme obesity may be linked to markers flanking the human ob gene. DIABETES (1996), 45: 691-694

- **Rohner-Jeanrenaud, F.;** Jeanrenaud, B.: Obesity, leptin and the brain. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1996); 334: 324-325
- **Rolland-Cachera, M. F.;** Beleiste, F.; Deheeger, M.; Guilloud-Bataille, M.; Pequignot, F.; Sempé, M.: IN: Björntrop, P.; Rössner, S. (Eds.): Obesity in Europe, '88. JOHN LIBBEY, LONDON, PARIS; 1988
- **Rolland-Cachera, M. F**.: Body composition during adolescence: methods, limitations and determinants. HORMONE RESEARCH (1993); 39: 25-40
- **Rosenbaum, M.;** Nicolson, M.; Hirsch, J.; Heymsfield, S. B.; Kallagher, D.; Chu, F.; Leibel, R. L.: Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1996); 81: 3424-3427
- **Rosenkranz, K;** Hinney, A.; von Prittwitz, S.; Barth, N.; Ziegler, A.; Mayer, H.; Siegfried, W.; Lehmkuhl, G.; Poustka, F.; Schmidt, M.; Schäfer, H.; Remschmidt, H.; Hebebrand, J.: Screening for mutations in the neuropeptide YY5 receptor gene in cohorts belonging to different weight extremes. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY AND RELATED METABOLIC DISORDERS (1998); 22: 157-163
- **Roth, H.;** Hinney, A.; Ziegler, A.; Barth, N.; Gerber, G.; Stein, K.; Brömel. T.; Mayer, H.; Siegfried, W.; Schäfer, H., Remschmidt, H.; Grzeschik, K.-H.; Hebebrand, J.: Further support for linkage of extreme obesity to the obese gene in a study group of children and adolescentes. EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND DIABETES (1997); 105: 341-344
- **Ryan, A. S**.; Elahi, D.: The effects of acute hyperglycemia and hyperinsulinemia on plasma leptin levels: its relationships with body fat, visceral adiposity, and age in women. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1996); 81: 4433-4438
- **Saad, M. F.**; Khan, A.; Sharma, A.; Michael, R.; Riad-Gabriel, M. G.; Jinagouda, S. D.; Boyadijan, R.; Steil, G. M.: Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM (1998); 83: 453-459
- **Sachs, L.**: Angewandte Statistik. SPRINGER-VERLAG, BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK, BARCELONA, HONGKONG, LONDON, MAILAND, PARIS, SINGAPUR, TOKYO; 9. AUFLAGE (1999)

- **Saiki, R. K.**; Chang, C. A.; Levenson, C. H.; Warren, T. C.; Boehm, C. D.; Kazazian, H. H.; Ehrlich, H. A.: Diagnosis of sickle cell anemia and β-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1988); 319: 537
- **Saiki, R. K.**; Scharf, S:; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Ehrlich, H. A.; Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. SCIENCE (1985); 230: 1350-1354
- **Saladin, R.;** de Vos, P.; Guerre-Millo, M.; Leturque, A. Girard, J.; Staels, B.; Auwerx, J.: Transient increase in obese gene expression after food intake or insulinadministration. NATURE (1995); 377: 527-529
- **Sambrook, J.;** Fritsch, E. F.; Maniatis, T.: Molecular Cloning – A laboratory manual – 2nd Edition. GOLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS (1989)
- **Schepanek, H.**: Genetic determinants in anorexia nervosa: results of studies in twins. In: Herzog, W.; Deter, H. C.; Vandereycken, W.; (eds.): The course of eating disorders. SPRINGER VERLAG; BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK, (1992)
- **Schimmel, U.**: PCR – Die Fußangeln einer Technik und die Wege zur Perfektionierung. SONDERDRUCK AUS BIOTEC; (1990)
- **Seidell, J. C.**; Verschuren, W. M. M.; Kromhout, D.: Prevalence and trend of obesity in the Netherlands 1987-1991. INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY (1995); 19: 924-925
- **Señaris, R.;** Garcia-Caballero, T.; Casabiell, X.; Gallego, R.; Castro, R.; Considine, R. V.; Dieguez, C.; Casanueva, F. F.: Synthesis of Leptin in human placenta. ENDOCRINOLOGY (1997); 138: 4501-4504
- **Shigemoto, M.;** Nishi, S.; Ogawa, Y.; Isse, N.; Matsuoka, N.; Tanaka, T.; Azuma, N.; Masuzaki, H.; Nishimura, H.; Yoshimasa, Y.; Hosoda, K.; Nakao, K.: Molecualr screening of both the promoter and protein coding regions in the human ob gene in Japanese obese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY (1997); 137: 511-513

- **Shintani, M.;** Ikegami, H.; Yamoto, E.; Kawaguchi, Y.; Fujisawa, T.; Nakagawa, Y.; Hamada, Y.; Ueda, H.; Miki, T.; Ogihara, T.: A novel microsatellite polymorphism in the human ob gene: a highly polymorphic marker for linkage analysis. DIABETOLOGIA (1996); 39: 1398-1401
- **Silbernagl, S.;** Lang, F.: Taschenatlas der Pathophysiologie. THIEME VERLAG; STUTTGART, NEW YORK (1998)
- **Sinha, M. K.;** Ohannesian, J. P.; Heiman, M. K.; Kriauciunas, A.; Stephens, T. W.; Magosin, S.; Marco, C.; Caro, J. F.: Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (1996); 97: 1344-1347
- **Son, J. H.;** Baker, H.; Park, D. H.; Joh, T. H.: Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons in a lethal neurodevelopment mouse mutant, Anorexia (anx). MOLECULAR BRAIN RESEARCH (1994); 25: 129-134
- **Spielman, R. S**.; McGinnis, R. E.; Ewens, W. J.: Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS (1993); 52: 506-516
- **Stephens, T. W.;** Basinski, M.; Bristow, P. K.; Bue-Valleskey, J. M.; Burgett, S. G.; Craft, L.; Hale, J.; Hoffmann, J.; Hsiung, H. M.; Kriauciunas, A.; MacKellar, W.; Rosteck Jr., P. R.; Schoner, B.; Smith, D.; Tinsley, F. C.; Zhng, X-Y.; Heiman, M.: The role of neuropeotide Y in the antiobesity action of the obese gene product. NATURE (1995); 377: 530-532
- **Stirling, B.;** Cox, N. J.; Bell, G. I.; Hanis, C. L.; Spielman, R. S.; Concannon, P.: Identification of microsatellite markers near the human ob gene and linkage studies in NIDDM-affected sib pairs. DIABETES (1995); 44; 999-1001
- **Strachan, T.;** Read, A. P.: Molekulare Humangenetik. SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG GMBH, HEIDELBERG, BERLIN, OXFORD, (1996)
- **Strobel, A.;** Issad, T.; Camoin, L.; Ozata, M.; Strosberg, D. A.: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. NATURE GENETICS (1998); 18: 213-215
- **Stunkard, A. J.;** Sørensen, T. I. A.; Hanis, C.; Teasdale, T. W.; Chakaraborty, R.; Schull, W. J.; Schulsinger, F.: An adoption study of human obesity. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1986); 314: 193-198

- **Stunkard, A. J.;** Harris, J. R.; Pedersen, N. L.; McClean, G. E.: The body-mass-index of twins who have been reared apart. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (1990); 322: 1483-1487
- **Swerdloff, R. S**.; Batt, R. A.; Bray, G. A.: Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. ENDOCRINOLOGY (1976); 98: 1359-1364
- **Tanizawa, Y.;** Okuya, S.; Ishihara, H.; Asano, T.; Yada, T.; Oka, Y.: Direct stimulation of basal insulin secretion by physiological concentrations of Leptin in pancreatic β cells. ENDOCRINOLOGY (1997); 138: 4513-4516
- **Tartaglia, L. A.;** Dembski, M.; Wenig, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G. J.; Campfield, L. A.; Clark, F. T.; Deeds, J.; Muir, C.; Sanker, S.; Moriarty, A.; Moore, K. J.; Smutko, J. S.; Mays, G. G.; Woolf, E. A.; Monroe, C. A.; Tepper, R. I.: Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-R. CELL (1995); 83: 1263-1271
- **Thompson, D. B.**; Ravussin, E.; Bennett, P. H.; Bogardus, C.: Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. HUMAN MOLECULAR GENETICS (1997); 6: 675-679
- **Trayhurn, P.;** Thomas, M. E. A.; Duncan, J. S.; Rayner. D. V.: Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. FEBS LETTERS (1995a); 488-490
- **Trayhurn, P.;** Duncan, J. S.; Rayner, D. V.: Acute cold induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. BIOCHEMICAL JOURNAL (1995b); 311: 729-733
- **Utriainen, T.;** Malström, R.; Makimattila, S.; Yki-Jarvinen, H.: Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. DIABETES (1996); 45: 1364-1366
- **Verploegen, S. A. B. W.;** Plaetinck, G.; Devos, R.; van der Heyden, J.; Guisez, Y.: A human leptin mutant induces weight gain in normal mice. FEBS LETTERS (1997); 405: 237-240
- **Volkenandt, M.**; Löhr, M.; Dicker, A. P.: Genamplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion. DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT (1990); 115: 670-676

- **Wabitsch, M.;** Jensen, P. B.; Blum, W. F.; Christoffersen, C. T.; Englaro, P.; Heinze, E.; Rascher, W.; Teller, W.; Tornqvist, H.; Hauner, H.: Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. DIABETES (1996); 45: 1435-1438
- **Wang, Q.;** Bing, C.; Al-Barazanji, K.; Mossakowaska, D. E.; Wang. X-M.; McBay, D. L.; Neville, W. A.; Taddayon, M.; Pickavance, L.; Dryden, S.; Thomas. M. E. A.; McHale, M. T.; Gloyer, I. S.; Wilson, S.; Buckingham, R.; Arch, J. R. S.; Trayhurn, P.; Williams, Gl: Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. DIABETES (1997); 46: 335-341
- **Watson; J. D.;** Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M.: Rekombinierte DNA; 2. Auflage. SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG GMBH; HEIDELBERG, BERLIN, OXFORD (1993)
- **Weigle, D. S.;** Bukowski, T. R.; Foster, D. C.; Holderman, S.; Kramer, J. M.; Lasser, G.; Lofton-Day, C. E.; Prunkard, D. E.; Raymond, C.; Kuijper, J. L.: Recombinant *ob* protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (1995); 96: 2065-2070
- **Wilson, R.** K.; Chen, C.; Avdalovic, N.; Burns, J.; Hood, JC.: Development of an automated procedure for fluorescenz DNA sequencing. GENOMICS (1990); 6: 626-634
- **Wolf, G.**: Neuropeptides responding to leptin. NUTRITIONAL REVIEW (1997); 55: 85-88
- **World Health Organization**: Preventing and managing the global epidemic. WHO, GENEVA (1998)
- **World Health Organization**: The ICD-10 Classification of mental and behavioral disorders – clinical description and diagnostic guidelines. WHO, GENEVA (1992)
- **Yu, W. H.;** Kimura, M.; Walczewska, A.; Karanth, S.; McCann, S. M.: Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA (1997); 94: 1023-1028
- **Yuen, B. H.;** Mincey, E. K.: Human chorionic gonadotropin, prolactin, estriol, and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations in cord blood of premature and term newborn infants: relationship to the sex of the neonate. AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (1987); 156: 396-400

- **Yura, S.;** Ogawa, Y.; Sagawa, N.; Masuzaki, H.; Itoh, H.; Ebihara, K.; Aizawa-Abe, M.; Fujii, S.; Nakao, K.: Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (2000); 105: 749-755
- **Zarjevski, N.;** Cusin, J.; Vettor, R.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Jeanrenaud, B.: Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. ENDOCRINOLOGY (1993); 133: 1753-1758
- **Zhang, Y.;** Proenca, R.; Maffei, M., Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M.: Positional cloning of the mouse obese gene and ist human homologue. NATURE (1994); 372: 425-432

10 Akademische Lehrer

In der folgenden Liste sind meine akademischen Lehrer aufgeführt, denen ich an dieser Stelle für Ihren Beitrag zu meiner Ausbildung herzlich danken möchte.

In Marburg:

- Arnold
- Aumüller
- Barth
- Basler
- Baum
- Beato
- Berger
- Bolm
- Daut
- Engel
- Eschenbach
- Feuser
- Fruhstorfer
- Fuhrmann
- Ganz
- Geus
- Göke
- Görg
- Gotzen
- Gressner
- Griss
- Grzeschik
- Habermehl
- Happle
- Hasilik
- Hebebrand
- Heubel
- Hilgermann
- Joseph
- Kälble
- Kern
- Kleine
- Klenk
- Klose
- Koolman
- Kraus
- Kretschmer
- Krieg
- Kroll
- Kuhn
- Kummer
- Kuni
- Lang
- Lange
- Legrum
- Lennartz
- Leppek
- Maisch
- Mannheim
- Moll
- Moosdorf
- Mueller
- Neubauer
- Oertel
- Peter
- Radsak
- Remschmidt
- Röhm
- Rothmund
- Schachtschabel
- Schäfer
- Schmidt
- Schüffel
- Schulz
- Seifart
- Seitz
- Seyberth
- Slenczka
- Steiniger
- Stinner
- Sturm
- Thomas
- Vohland
- Voigt
- Weihe
- Werner
- Westermann
- Wichert

In Köln:

- Brockmann
- Kienzle
- Saborowski
- Wolff

In Teneriffa (Spanien):

- Alarcó
- Furelos Toral
- Hernandez
- Perez Palma

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Remschmidt und Herrn Prof. Dr. J. Hebebrand möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit, sowie für ihre hilfreiche Unterstützung herzlich danken.

Weiterer Dank gilt Frau Dr. Anke Hinney für ihre ausdauernde und kompetente Beratung während der gesamten Dauer meiner Untersuchungen, durch die ich fachlich viel gelernt habe.

Frau G. Gerber und Frau Dipl. Biol. K. Rosenkranz danke ich für die gute Einarbeitung in die Labortätigkeit, sowie ihre ausdauernden Hilfestellungen und die freundliche Atmosphäre im Labor.

Bei Herrn Dr. Roth bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und die Hilfe beim Sequenzieren.

Bei Herrn PD Dr. Ziegler und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Unterstützung in der Datenauswertung und die Unterweisungen in Biomathematik bedanken.

Dank an Jennifer Schneider, Hannah Hermann und Tobias Löhr für die nette und kooperative Zusammenarbeit im Labor.

Ein großes Dankeschön an meine Eltern und meinen Bruder mit seiner Familie für ihre ständige Unterstützung vor und während meines Studiums. Für die Hilfe bei Computerproblemen danke ich herzlich Klaus, für ein immer offenes Ohr vielen Dank an Tim.

Außerordentlich möchte ich mich auch bei den beteiligten Patientinnen und Patienten bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dank auch an die Deutsche Forschergemeinschaft, die diese Untersuchungen finanziell unterstützt hat.