

**Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters  
der Philipps-Universität Marburg**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt

Klinische Forschergruppe „Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation unter  
besonderer Berücksichtigung von Essstörungen und Adipositas“

Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

**GENETISCHE MECHANISMEN DER GEWICHTSREGULATION -  
UNTERSUCHUNG EINES KANDIDATENGENS:  
REZEPTOR 1 DES  
MELANIN-KONZENTRIERENDEN HORMONS**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. oec. troph.**

Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökötrophologie  
und Umweltmanagement  
der Justus Liebig Universität Gießen

**Dipl. oec. troph. Anne-Kathrin Wermter**

**1. Gutachterin: Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg**

Professur für Biochemie der Ernährung des Menschen  
Institut für Ernährungswissenschaft  
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotröphologie  
und Umweltmanagement  
der Justus Liebig Universität Gießen

**2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Hebebrand**

Klinische Forschergruppe „Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation unter  
besonderer Berücksichtigung von Essstörungen und Adipositas“  
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters  
der Philipps-Universität Marburg

**Disputation:** 9. Juli 2004

**Mitglieder der Prüfungskommission:**

Vorsitzender:	Herr Prof. Dr. C. Kunz
1. Gutachterin:	Frau Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg
2. Gutachterin:	Frau Dr. A. Hinney (in Vertretung für Prof. Dr. J. Hebebrand)
Prüfer:	Herr Prof. Dr. M. Krawinkel
Prüferin:	Frau Prof. Dr. M. Neuhäuser-Berthold

*In der Hoffnung, den Mond zu erreichen,  
vergisst der Mensch die Blumen,  
die zu seinen Füßen blühen.*

*Albert Schweitzer*

*für meine Kinder  
Janne Ole Andres und  
Elisa Maria Franziska und  
meinen Mann Stephan*

**INHALTSVERZEICHNIS**

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VII
VERZEICHNIS DER TABELLEN	X
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	XII
Zusammenfassung	1
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Adipositas</b>	<b>3</b>
1.1.1 Einteilung in Gewichtsklassen: Der Body Mass Index und die Altersperzentilen	3
1.1.2 Definition Adipositas	5
1.1.3 Prävalenz, Folgestörungen und Ursachen der Adipositas	5
<b>1.2 Genetische Determination des Körpergewichts</b>	<b>7</b>
1.2.1 Formalgenetische Befunde	7
1.2.2 Tiermodelle	8
1.2.2.1 Monogen rezessive und dominante Formen der Adipositas	8
1.2.2.2 Transgene Mausmodelle	9
1.2.2.3 Polygene Tiermodelle	10
1.2.3 Humane Befunde	10
1.2.3.1 Monogen rezessive Formen der humanen Adipositas	10
1.2.3.2 Monogen dominante Formen der humanen Adipositas	11
1.2.3.3 Syndromale Formen der Adipositas	12
<b>1.3 Ansätze zur Identifizierung von humanen Genen für die Gewichtsregulation</b>	<b>13</b>
1.3.1 Genom-Scan	13
1.3.2 Kandidatengenansatz	15
1.3.2.1 Assoziationstests	15
1.3.2.2 Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT)	15
1.3.2.3 Bestätigung der Assoziation in anderen Populationen	16
1.3.2.4 Funktionelle Studien	16
<b>1.4 Kontrolle der Nahrungsaufnahme durch das ZNS</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Kontrolle der Nahrungsaufnahme durch Signalstoffe aus peripheren Organen</b>	<b>18</b>

---

<b>1.6</b>	<b>Beteiligung des Melanin-konzentrierenden Hormon-Systems an der Regulation von Energieaufnahme und –verbrauch</b>	<b>21</b>
1.6.1	Hohe Konservierung des MCH bei Wirbeltieren und zentrale Expression	21
1.6.2	MCH und die Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase	23
1.6.2.1	Effekte des MCH bei Maus und Ratte	23
1.6.2.2	Transgene Mäuse	25
1.6.3	Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons (MCHR1)	26
1.6.3.1	Charakteristik und Liganden des MCHR1	26
1.6.3.2	Zentrale Expression des <i>MCHR1</i>	30
1.6.4	Identifizierung des MCHR2 und seine Charakterisierung	31
1.6.5	Beteiligung des MCHR1 an Energieaufnahme bzw. –verbrauch	32
1.6.5.1	MCHR1 bei Maus und Ratte	32
1.6.5.2	MCHR1 Knockout-Mäuse	32
<b>1.7</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial und Probandenkollektive</b>	<b>36</b>
2.1.1	Rekrutierung der Probanden	36
2.1.2	Studiengruppen	37
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>39</b>
2.2.1	Chemikalien	39
2.2.2	Puffer	40
2.2.2.1	Puffer für die Isolierung genomischer DNA	40
2.2.2.2	Puffer für die Gelelektrophorese	41
2.2.2.3	Puffer für die Detektion von DNA	41
2.2.2.4	Puffer für die denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC)	42
2.2.3	Zelllinien, cDNA, Plasmide und Vektoren	42
2.2.4	Oligonukleotide und Restriktionsenzyme	43
2.2.4.1	Primer für das Mutationsscreening	43
2.2.4.2	Primer für die Sequenzierung	44
2.2.4.3	Primer und Restriktionsenzyme für die Genotypisierung von SNPs	47
2.2.4.4	Primer für die Expressionsanalysen	49
2.2.4.5	Primer für die Promoterstudien	49
2.2.5	Geräte	49

---

<b>3 Methoden</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Präparation genomischer DNA</b>	<b>51</b>
3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut	51
3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA	52
3.1.3 Verdünnung der DNA	52
3.1.4 Herstellung von DNA-Mikrotiterplatten	53
<b>3.2 Amplifizierung von DNA</b>	<b>53</b>
3.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
3.2.2 Primerdesign	55
3.2.3 Optimierung der PCR	56
3.2.4 Standard PCR	58
3.2.4.1 Nested PCR	59
3.2.4.2 Touch-down PCR	59
3.2.5 Trennung des Vor- und Nach-PCR-Bereiches	59
3.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese	59
3.2.6.1 Herstellung von Agarose-Gelen	60
3.2.6.2 Durchführung der Gel-Elektrophorese	60
<b>3.3 Detektion unbekannter Sequenzvarianten</b>	<b>61</b>
3.3.1 Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)	61
3.3.1.1 Prinzip der SSCP	61
3.3.1.2 Durchführung der SSCP	62
3.3.1.3 Silberfärbung	63
3.3.2 Denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC)	65
3.3.2.1 Prinzip der dHPLC	65
3.3.2.2 Durchführung der dHPLC	67
3.3.3 Sequenzierung	68
3.3.3.1 Prinzip der Sequenzierung	68
3.3.3.2 Durchführung der automatischen Sequenzierung am LiCor 4200	68
3.3.3.3 Durchführung der automatischen Sequenzierung am ABI 377	70
<b>3.4 Mutationsverifizierung und Genotypisierung von SNPs</b>	<b>70</b>
3.4.1 PCR – Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP)	71
3.4.2 Allelspezifische Amplifikation (Tetra-Primer ARMS-PCR)	73
3.4.3 Hochdurchsatzgenotypisierung	74
<b>3.5 Expressionsanalysen</b>	<b>74</b>
<b>3.6 Promoter-Vorhersage</b>	<b>74</b>

<b>3.7 Funktionelle <i>in vitro</i> Studien</b>	<b>75</b>
3.7.1 Pharmakologische Studien	75
3.7.2 Promoter-Studien	76
<b>3.8 Statistik</b>	<b>77</b>
3.8.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	77
3.8.2 Assoziation	77
3.8.2.1 Durchführung einer statistischen Assoziationsanalyse	79
3.8.2.2 Teststatistiken	80
3.8.3 Kopplung	82
3.8.3.1 Durchführung von statistischen Kopplungsanalysen	83
3.8.3.2 Teststatistiken	83
3.8.4 Individuelle und epidemiologische Risikoberechnung	85
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>86</b>
<b>4.1 Kandidatengen <i>Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons</i></b>	<b>86</b>
<b>4.2 Mutationsscreening des <i>MCHR1</i></b>	<b>88</b>
4.2.1 Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des <i>MCHR1</i>	88
4.2.1.1 Nicht-konservative Missense-Varianten an konservierten Aminosäurepositionen zwischen verschiedenen Species	89
4.2.1.2 Eine nicht-konservative Missense-Variante an einer Aminosäureposition, die nicht zwischen verschiedenen Species konserviert ist	94
4.2.1.3 Eine konservative Missense-Variante an einer Aminosäureposition, die zwischen verschiedenen Species konserviert ist	96
4.2.1.4 Stumme Varianten	97
4.2.1.5 Polymorphismen	101
4.2.2 Mutationsscreening des Introns des <i>MCHR1</i> sowie eines Bereiches der 5' UTR	103
<b>4.3 Assoziationsstudie für die <i>MCHR1</i> SNPs rs133072 und rs133073</b>	<b>105</b>
<b>4.4 Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) für die <i>MCHR1</i> SNPs rs133072 und rs133073</b>	<b>107</b>
<b>4.5 Expressions-Analysen des <i>MCHR1</i></b>	<b>108</b>
<b>4.6 Identifizierung weiterer SNPs und Haplotypen sowie Durchführung von Haplotyp-basierenden TDTs</b>	<b>109</b>
4.6.1 Sequenzierung	109
4.6.2 Transmission-Disequilibrium-Tests für einzelne SNPs	110
4.6.3 Haplotypen und Haplotyp-TDTs	113

---

<b>4.7 Promoter-Vorhersage</b>	<b>114</b>
<b>4.8 Funktionelle <i>in vitro</i> Studien</b>	<b>114</b>
4.8.1 Inositolphosphat-Assay	114
4.8.2 cAMP-Assay	115
4.8.3 Oberflächen ELISA-Assay	116
4.8.4 Promoterstudie - Luziferase-Reportergen-Assay	116
<b>4.9 Schätzung des individuellen und epidemiologischen Risikos</b>	<b>117</b>
<b>4.10 Phänotyp-orientierte <i>post hoc</i> Tests</b>	<b>118</b>
4.10.1 Physische Aktivität	118
4.10.2 Prozentualer Körperfettgehalt	118
4.10.3 Prozentualer Fettanteil an der Gesamt-Energieaufnahme	119
<b>4.11 Assoziations- und Transmission-Disequilibrium-Tests in unabhängigen deutschen und ausländischen Studiengruppen</b>	<b>119</b>
<b>4.12 Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>125</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>126</b>
<b>5.1 Kandidatengen <i>Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons</i></b>	<b>126</b>
5.1.1 Struktur des <i>MCHR1</i>	126
5.1.2 Seltene Varianten	128
5.1.3 SNPs rs133072 und rs133073 im Exon 1 des <i>MCHR1</i>	130
5.1.4 Identifizierung von weiteren SNPs und zwei Haplotypen	131
5.1.5 Funktionelle Implikationen des SNP rs133072 und des mit Adipositas assoziierten Haplotyps	134
5.1.6 Phänotyp-orientierte <i>post hoc</i> Tests	136
5.1.7 Assoziations- und Transmission-Disequilibrium-Tests in unabhängigen deutschen und ausländischen Studiengruppen	137
<b>5.2 Beteiligung des SNP rs133072 und des <i>MCHR1</i> Haplotyps an der Entstehung der Adipositas</b>	<b>140</b>
<b>5.3 Auswahl der Studienkollektive</b>	<b>145</b>
<b>5.4 Methoden zur Mutationsdetektion</b>	<b>146</b>
5.4.1 PCR und PCR-basierte Methoden	146
5.4.2 Methoden zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten	148
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>150</b>

---

<b>7 Anhang</b>	<b>172</b>
<b>Genomische Struktur des <i>MCHR1</i> mit Sequenz-Varianten</b>	<b>172</b>
<b>PCR-Protokolle für Mutationsscreening</b>	<b>174</b>
<b>Genotypisierungsprotokolle</b>	<b>180</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>197</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>200</b>
<b>PATENTE</b>	<b>200</b>
<b>VORTRÄGE/POSTER</b>	<b>201</b>
<b>AUSZEICHNUNG</b>	<b>202</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>203</b>

## VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1-1: BMI-Perzentilen für Mädchen im Alter von 0-18 Jahren (nach Kromeyer-Hauschild et al. 2001)	4
Abb. 1-2: Chromosomale Regionen, für die Kopplungsstudien an Adipositas assoziierten Phänotypen vorgenommen wurden	14
Abb. 1-3: Kontrolle der Energiehomöostase durch die Neuronen des arkuaten Kerngebietes im Hypothalamus (nach Barsh und Schwartz 2002)	19
Abb. 1-4: Rolle des arkuaten Kerngebietes des Hypothalamus bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs (nach Schwartz et al. 2000)	20
Abb. 1-5: Struktur und Sequenz des MCH-Precursors und MCHs (nach Collins und Kym 2003)	22
Abb. 1-6: Modell der intrazellulären Signalwege, die an die Aktivierung des Rezeptors 1 des MCH in CHO-MCHR-Zellen gekoppelt sind (nach Hawes et al. 2000)	27
Abb. 1-7: Neuraler Regelkreis, der in die Energiehomöostase eingebunden ist (nach Schwartz und Gelling 2002)	33
Abb. 3-1: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
Abb. 3-2: SSCP-Gel mit aufgetrennten Fragmenten des zweiten Exons des <i>MCHR1</i>	64
Abb. 3-3: Bildung von Heteroduplices und Homoduplices nach Denaturierung und anschließendem Re-annealing der Doppelhelix (modifiziert nach Transgenomic; Cheshire, GB)	66
Abb. 3-4: Temperaturabhängige Auflösung von Homoduplices und Heteroduplices mit dHPLC (WAVE®); modifiziert nach Transgenomic (Cheshire, GB)	66
Abb. 3-5: Schematische Darstellung der Methode der Tetra-Primer ARMS-PCR (nach Ye et al. 2001)	73
Abb. 4-1: <i>MCHR1</i> bei Mensch und Maus. Mitte: Struktur des <i>MCHR1</i> mit drei potentiellen Kodons für den Translationsstart (Met <sup>1</sup> , Met <sup>6</sup> , Met <sup>70</sup> )	86
Abb. 4-2: <i>MCHR1</i> und 10 kb des 5' UTRs beim Menschen. Darstellung der für das Mutationsscreening verwendeten Methoden	87
Abb. 4-3: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante T305M (102247 C>T)	90
Abb. 4-4: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante T305M (102247 C>T)	90
Abb. 4-5: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante T305M (102247 C>T)	90
Abb. 4-6: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante R317Q (102283 G>A)	91
Abb. 4-7: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante R317Q (102283 G>A)	91
Abb. 4-8: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante R317Q (102283 G>A)	91
Abb. 4-9: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante P377S (102462 C>T)	92
Abb. 4-10: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante P377S (102462 C>T)	92

Abb. 4-11: dHPLC Analyse mittels WAVE (Transgenomic)	92
Abb. 4-12: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit den Varianten D28V (100202 A>T) und T411M (102565 C>T)	93
Abb. 4-13: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Varianten D28V (100202 A>T) und T411M (102565 C>T)	93
Abb. 4-14: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante D28V (100202 A>T)	94
Abb. 4-15: dHPLC Typisierung mittels WAVE (Transgenomic; Cheshire, GB)	94
Abb. 4-16: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante T25M (100193 C>T)	95
Abb. 4-17: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante T25M (100193 C>T)	95
Abb. 4-18: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante T25M (100193 C>T)	95
Abb. 4-19: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante R210H (101962 G>A)	96
Abb. 4-20: Sequenzanalyse der konservativen Missense-Variante R210H (101962 G>A)	96
Abb. 4-21: PCR-RFLP Typisierung der konservativen Missense-Variante R210H (101962 G>A)	96
Abb. 4-22: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 101966 C>T	97
Abb. 4-23: Sequenzanalyse der stummen Variante 101966 C>T	97
Abb. 4-24: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 101966 C>T	97
Abb. 4-25: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 102218 C>T	98
Abb. 4-26: Sequenzanalyse der stummen Variante 102218 C>T	98
Abb. 4-27: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 102218 C>T	98
Abb. 4-28: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 102491 G>A	99
Abb. 4-29: Sequenzanalyse der stummen Variante 102491 G>A	99
Abb. 4-30: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 102491 G>A	99
Abb. 4-31: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 102515 G>A	100
Abb. 4-32: Sequenzanalyse der stummen Variante 102515 G>A	100
Abb. 4-33: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 102515 G>A	100
Abb. 4-34: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit dem SNP rs133072 C>T	101
Abb. 4-35: Sequenzanalyse des SNP rs133072 G>A (D28N) im Exon 1 des <i>MCHR1</i>	101
Abb. 4-36: PCR-RFLP Typisierung des SNPs rs133072 G>A (D32N)	102
Abb. 4-37: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit dem SNP rs133073 C>T	102
Abb. 4-38: Sequenzanalyse des SNP rs133073 T>C im Exon 1 des <i>MCHR1</i>	103
Abb. 4-39: Tetra-Primer ARMS-PCR Typisierung des SNP rs133073 T>C	103
Abb. 4-40: dHPLC Typisierung mittels WAVE (Transgenomic; Cheshire, GB)	104
Abb. 4-41: Sequenzanalyse des SNP 001745619 (101341 G>T) im Intron	104
Abb. 4-42: PCR-RFLP Typisierung des SNP 001745619 (101341 G>T)	104

---

Abb. 4-43: <i>MCHR1</i> und die bei der Re-Sequenzierung von 13.379 bp einschließlich des <i>MCHR1</i> von 19 Individuen detektierten SNPs	109
Abb. 4-44: Funktionelle Analyse der <i>MCHR1</i> Varianten Asn <sup>32</sup> - <i>MCHR1</i> und Asp <sup>32</sup> - <i>MCHR1</i>	116
Abb. 4-45: Promoter Luziferase-Reportergen-Assay	117
Abb. 5-1: Exon 1 des <i>MCHR1</i> mit Darstellung des jeweiligen Kontextes der drei potentiellen Startkodons (Met <sup>1</sup> , Met <sup>6</sup> und Met <sup>70</sup> )	127
Abb. 5-2: Molekulares Modell des MCH/ <i>MCHR1</i> -Komplexes nach Macdonald et al. (2000)	130
Abb. 5-3: <i>MCHR1</i> -Locus und die Einteilung der SNPs entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den Haplotypen	132
Abb. 5-4: <i>MCHR1</i> Haplotypen und benachbarte Gene	133

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1-1:	BMI-Gewichtsklassen für Erwachsene (WHO 1998)	4
Tab. 1-2:	BMI-Altersperzentilen für verschiedene Gewichtsklassen (nach Hebebrand et al. 1994)	4
Tab. 1-3:	Monogene Formen der Adipositas im Mausmodell	9
Tab. 2-1:	Darstellung der Studiengruppen	37
Tab. 2-2:	Verwendete Chemikalien	39
Tab. 2-3:	Für die Expressionsstudien und funktionellen <i>in vitro</i> Studien verwendete Zelllinien, cDNA, Plasmide und Vektoren	42
Tab. 2-4:	Primer, Amplikon-Längen und Annealing-Temperaturen für die PCR-Reaktionen im initialen Mutationsscreening des <i>MCHR1</i>	43
Tab. 2-5:	Primerpaare für die Sequenzierung der Varianten in der kodierenden Region des <i>MCHR1</i>	44
Tab. 2-6:	Primerpaare für die genomische Sequenzierung des <i>MCHR1</i> -Locus mittels nested PCR	44
Tab. 2-7:	Primer, Amplikon-Längen, Annealing-Temperaturen und Restriktionsenzyme für PCR-RFLP zur SNP-Genotypisierung	47
Tab. 2-8:	Primer, Schmelz- und Annealing-Temperaturen sowie Amplikon-Längen für eine Tetra-Primer ARMS-PCR zur SNP-Genotypisierung	48
Tab. 2-9:	Primer für die Expressionsanalysen des <i>MCHR1</i> -Transkriptes	49
Tab. 2-10:	Primer für die Promoterstudien des <i>MCHR1</i>	49
Tab. 2-11:	Beschreibung der verwendeten Geräte	50
Tab. 3-1:	Zusammensetzung des Pronase-Reaktionsgemisches	52
Tab. 3-2:	SSCP-Bedingungen für das Mutationsscreening der kodierenden Region des <i>MCHR1</i>	63
Tab. 3-3:	Restriktionsenzyme zur Verifizierung der durch SSCP und dHPLC identifizierten Varianten im <i>MCHR1</i>	72
Tab. 3-4:	Schema einer Vierfeldertafel beim $\chi^2$ -Test	80
Tab. 3-5:	Schema einer Vierfeldertafel beim TDT	84
Tab. 4.1:	Seltene Varianten und die SNPs rs133072 und rs133073 im <i>MCHR1</i> bei 215 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 230 untergewichtigen Studenten	89
Tab. 4-2:	Assoziationsanalysen des SNP rs133072 (a) und rs133073 (b) in verschiedenen Studiengruppen	106
Tab. 4-3:	Initiale, konfirmatorische und <i>post hoc</i> Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) für die SNPs rs133072 und rs133073 in verschiedenen Studiengruppen	108
Tab. 4-4:	Genotypen für 20 SNPs bei 9 bzw. 10 adipösen Kindern und Jugendlichen, die homozygot für A oder G an SNP rs133072 sind	111

---

Tab. 4-5:	TDTs für 16 benachbarte SNPs bei 61 bzw. 525 Trios und für Haplotypen einschließlich der SNPs rs133072 und rs133073_____	112
Tab. 4-6:	Haplotypen aus 4 SNPs, die in 525 Trios (1050 Eltern) genotypisiert wurden____	113
Tab. 4-7:	Geschlechtsspezifische Haplotyp-TDTs_____	114
Tab. 4-8:	Funktionelle Charakterisierung des SNP rs133072 im Exon 1 des <i>MCHR1</i> _____	115
Tab. 4-9:	Bewegungsaktivität der adipösen Kinder und Jugendlichen mit den verschiedenen Genotypen am SNP rs133072_____	118
Tab. 4-10:	Genotyp- und Allelfrequenzen des SNP rs133072 in der Berliner Studiengruppe_	120
Tab. 4-11:	Genotyp- und Allelfrequenzen der SNPs rs133072 und rs133073 in der Stichprobe der KORAS2000 Studie (Augsburg, Deutschland)_____	121
Tab. 4-12:	Genotyp- und Allelfrequenzen der SNPs rs133072 und rs133073 in der Stichprobe der KORAS2000 Studie (Augsburg, Deutschland) unterteilt nach BMI-Perzentilen_____	122
Tab. 4-13:	Genotyp- und Allelfrequenzen des SNP rs133072 in der dänischen Studiengruppe_____	123
Tab. 4-14:	Genotyp- und Allelfrequenzen des SNP rs133072 in der französischen Studiengruppe_____	124

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Calcium-Ionen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A	Adenin
A	Alanin
Abb.	Abbildung
<i>ADSL</i>	<i>adenylosuccinate lyase</i> -Gen
AGRP	agouti related peptide
APUWA	steriles Aqua bidest für Injektionszwecke
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ARMS	allelspezifische Amplifikation (amplification refractory mutation system)
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATG	Startkodon (Alanin-Threonin-Glycin)
BAC	bacterial artificial chromosome
BLAST	Zusammenfassung von Programmen, die in Sequenz-Datenbanken nach Übereinstimmungen zu einer gesuchten Sequenz suchen
BMI	body mass index
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cystein / Cytosin
cAMP	Cyclisches Adenosin Monophosphat
CART	cocaine- and amphetamine-regulated transcript
CCK	cholecystokinin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CDS	kodierende Sequenz
CHO-Zellen	chinese hamster ovary Zellen
cM	CentiMorgan
CRH	corticotropin-releasing hormone
D	Aspartat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
<i>db</i>	<i>diabetes</i>
DIO	Diätinduzierte Adipositas (diet induced obesity)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat

---

E	Glutamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	auch bekannt unter MAPK
EST	expressed sequence tag
F	Phenylalanin
<i>FBN1</i>	<i>Fibrillin-1</i> -Gen
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
<i>fld</i>	<i>Fatty liver dystrophy</i>
FFQ	food frequency questionnaire
G	Glycin
G	Guanin
g	Gramm
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H	Histidin
h	Stunde
HEK-Zellen	human embryonic kidney
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits-Chromatographie (high pressure liquid chromatography)
HRR	Haplotype relative risk
HWG	Hardy-Weinberg Gleichgewicht
I	Isoleucin
i.c.v.	intracerebroventricular
IP	Inositol-Phosphat
K	Lysin
kb	Kilobase
L	Leucin
l	Liter
LHA	Lateraler Hypothalamus
LiCl	Lithium-Chlorid
LOD-Score	Maß für die Wahrscheinlichkeit der genetischen Kopplung zwischen zwei Loci
M	Methionin
M	molar
MALDI-Tof MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mb	Megabase
MC4R	Melanokortin-4-Rezeptor
MCH	Melanin-konzentrierendes Hormon
MCHR1	Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons
<i>MCHR1</i>	Gen für den <i>Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons</i>
Met	Methionin
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen
MGOP	MCHgene-overprinted peptides

min	Minuten
MIZIP	Zink-Finger-Protein
<i>MKL1</i>	<i>megakaryoblastic leukemia</i> -Gen
ml/mM	milliliter/millimolar
MLB	binominal lod score
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MT	Sequenzvariante
N	Asparagin
n	Stichprobenumfang
NEI	Neuropeptid Glutamat Isoleucin
ng	nanogramm
NGE	Neuropeptid Glycin Glutamat
nm	Nanometer
NPY	Neuropeptid Y
<i>ob</i>	<i>obese</i>
o. g.	oben genannt
<i>OLETF</i>	<i>otsuka long-evans tokushima fatty</i> rats
P	Prolin
p. a	per analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PKC	Protein-Kinase-C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat, 13-Acetat
<i>Pmcb</i>	<i>Pro-MCH</i> -Gen
pmol	Picomol (Stoffmenge)
POMC	Pro-opiomelanocortin
PPY	pancreatic polypeptide
PTX	Pertussis-Toxin
Pu	Purin
PYY	peptide YY
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
Q	Glutamin
QTL	quantitative trait locus
R	Arginin
R	Purin (Adenin oder Guanin)
RCLB	Red cell lysis buffer
RFLP	Restriktions Fragment Längenpolymorphismus (restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minutes)
RPMI 1640	Zellkultur-Medium
RT	Raumtemperatur (22 °C)

---

RT-PCR	reverse transcriptase PCR
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Werte	Standard-deviation-Scores
sec	Sekunde
SLC25A17	peroxisomales Membranprotein
SNAP74	MCHR1-Antagonist
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSCP	Einzelstrang-Konformationsanalyse (single-stranded conformation polymorphism analysis)
s. u.	siehe unter
T	Thymin
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TDT	Transmissions-Ungleichgewichts-Test (transmission-disequilibrium-test)
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEAA	Tri-ethyl-ammonium-acetat
TEMED	Tetra-methyl-ethylen-diamin
TMAC	Tetra-methyl-ammonium-chlorid
TRH	thyrotropin-releasing hormone
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSH	thyroid stimulating hormone
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
U	Unit
UTR	untranslated regions (5'UTR, 3'UTR)
UV	ultraviolettes Licht
V	Valin
V	Volt
VMH	Ventromedialer Hypothalamus
w/v	weight per volume
W	Tryptophan
Y	Pyrimidin (Thymin oder Cytosin)
Y	Tyrosin
ZNS	zentrales Nervensystem
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon

## Zusammenfassung

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich in den entwickelten Industrienationen Übergewicht und Adipositas sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern und Jugendlichen epidemisch ausgebreitet. Der Anteil vor allem der Kinder und Jugendlichen, die extrem adipös sind, nimmt weiterhin stetig zu. Da eine extreme Adipositas bei Kindern und Jugendlichen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch im Erwachsenenalter erhalten bleibt, sind nicht nur die zunehmend physischen und psychischen Beeinträchtigungen der heute übergewichtigen Kinder für die Zukunft vorprogrammiert. Auch die Kosten, die durch Adipositas verursachte Krankheiten entstehen, werden zukünftig ansteigen. Die präzise Einstellung des Körpergewichts auf einen genetisch ko-determinierten „Setpoint“ über längere Lebensperioden erfolgt durch ein komplexes Netzwerk von Regelkreisen, die die Energiehomöostase beeinflussen. Der weltweite Anstieg der Adipositasprävalenz begründet sich in einem veränderten Ernährungs- und Bewegungsverhalten auf der Grundlage einer bestehenden genetischen Prädisposition zu Adipositas.

Eine Bestrebung der Adipositasforschung ist es, Gene zu identifizieren, die entscheidend an der Regulation des Körperwichts, über die Beeinflussung des Ernährungs- und Bewegungsverhaltens sowie der Energiehomöostase, beteiligt sind. Eine genetische Variabilität dieser Gene bzw. von Sequenzen, die diese Gene regulieren, können zu einer genetischen Prädisposition zu Adipositas beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Kandidatengen *Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons (MCHR1)* untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Relevanz des MCHR1 für die Regulation der Energiehomöostase und der Gewichtsregulation zu analysieren. In diesem ersten bislang beschriebenen Mutationsscreen wurden 13.379 bp des MCHR1-Locus bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen mittels Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP), denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC) und Sequenzierung gescreent. Innerhalb der mutmaßlichen kodierenden Sequenz (CDS) wurden 11 seltene Varianten (Allel-Frequenz <1 %) sowie die SNPs rs133072 (G/A) und rs133073 (T/C) identifiziert. In den 5'- und 3'-Regionen wurden zusätzlich 18 SNPs identifiziert, wovon 8 zuvor noch nicht bekannt waren. Die beiden SNPs in der CDS wurden mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (PCR-RFLP), SSCP bzw. allelspezifischen Amplifikationen (Tetra-Primer ARMS-PCR) in umfangreichen und unabhängigen Studiengruppen mit deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen, über-, normal- und untergewichtigen erwachsenen Kontrollen genotypisiert. In weiterführenden Analysen konnten sowohl eine Assoziation des A-Allels des SNP rs133072 und C-Allels des SNP rs133073 mit

Adipositas als auch deren überzufällig häufigere Transmission von den Eltern an ihre Kinder festgestellt werden. Die Genotypisierung weiterer 14 SNPs aus dem re-sequenzierten Bereich des *MCHR1* und zusätzlich von 2 SNPs in etwa 12 bzw. 20 kb Entfernung 3' des *MCHR1* sowie 2 SNPs in etwa 25 bzw. 41 kb Entfernung 5' des *MCHR1* bei adipösen Kindern und Jugendlichen ergab für mehrere dieser SNPs eine Assoziation und ein Transmissions-Ungleichgewicht. Dieser mit Adipositas assoziierte Haplotyp des *MCHR1* umfasst das A-Allel des SNP rs133072, der mutmaßlich zu einer Missense-Mutation (D32N) am N-Terminus des 422 Aminosäuren-MCHR1 führt.

Die Bestimmung der Rezeptor induzierten Inositol-Phosphat-Bildung ergab, dass MCH in COS-7 Zellen, die Asn<sup>32</sup>-MCHR1 (entspricht dem mit Adipositas assoziierten A-Allel; EC<sub>50</sub>: 10,3 nM ± 9,0) transient exprimieren, im Vergleich zu Asp<sup>32</sup>-MCHR1 (EC<sub>50</sub>: 183,9 nM ± 33,2) ein leistungsfähigerer Agonist ist. In einem Promoter-Luziferase-Assay wurde eine Hochregulierung des mit Adipositas assoziierten *MCHR1* Haplotyps detektiert. Das relative Risiko, Adipositas zu entwickeln, ist für adipöse Individuen mit einem BMI ≥ 90. Perzentile mit 1,51 für heterozygote und 1,95 für homozygote Träger des A-Allels (Asn<sup>32</sup>) gering. Das attributable Risiko des A-Allels für Adipositas ist dagegen aufgrund der hohen Frequenz des SNP rs133072 mit 24 % hoch.

Zwei weitere deutsche Studiengruppen, die am SNP rs133072 genotypisiert worden sind, um die initialen Befunde zu bestätigen, zeigten einen Trend zu einer Assoziation mit Adipositas. Bei der Genotypisierung des SNP rs133072 in dänischen, französischen und amerikanischen Studiengruppen konnten die Assoziation bzw. das Transmissions-Ungleichgewicht nicht bestätigt werden. Aus den vorliegenden Daten kann hypothetisch geschlussfolgert werden, dass die Assoziation und das Transmissions-Ungleichgewicht des *MCHR1* Haplotyps mit Adipositas nur für die frühmanifeste Adipositas unter der Annahme eines besonderen genetischen und/oder Umwelt-Hintergrundes zutreffend ist.

# 1 Einleitung

Die Prävalenz für Adipositas bei Kindern ist in den vergangenen Jahrzehnten weltweit stark angestiegen. Die extreme Adipositas ist zum Hauptgesundheitsproblem bei Kindern in den entwickelten Industrienationen aber auch in anderen Regionen der Welt geworden. Adipositas zieht eine Reihe von Folgeerkrankungen nach sich und geht mit erhöhter Morbidität und Mortalität einher. Übergewicht im Kindesalter kann Krankheiten des Atmungs- und Herz-Kreislauf-Systems, des endokrinen und renalen Systems, des Halte- und Stützapparates, des Gastrointestinaltraktes sowie Störungen auf psychosozialer Ebene verursachen (Übersicht Ebbeling et al. 2002).

Das Körpergewicht des Menschen ist ein komplex regulierter Phänotyp. Die Energiehomöostase - Balance zwischen Energieaufnahme und -verbrauch - ist beim Menschen über längere Lebensperioden bemerkenswert präzise und gewährleistet bei den meisten Menschen ein weitgehend stabiles Körpergewicht. Eine länger fortbestehende Störung dieses Gleichgewichts führt jedoch entweder zu Adipositas oder Untergewicht.

Die Energiehomöostase wird durch Faktoren wie z. B. Hunger und Sättigung über ein komplexes Netzwerk von hypothalamischen Neuropeptiden sowie peripheren Molekülen reguliert. Hierbei zirkulieren im Blut Mediatoren (z. B. Leptin), die den Körperfettgehalt widerspiegeln. In Magen, Darm und Pankreas finden sich weitere periphere Moleküle (z. B. Ghrelin, CCK, PYY und PPY), die u. a. in Abhängigkeit von dem Füllungszustand des Gastrointestinaltraktes bzw. der Verdauungstätigkeit wirksam werden. Die neuronalen, hormonellen und metabolischen Signale aus der Peripherie werden über hypothalamische neuronale Rezeptoren weitergeleitet und rufen damit entsprechende kurzfristige metabolische Antworten und Verhaltensänderungen, wie die Nahrungsaufnahme hervor (Übersicht Barsh und Schwartz 2002).

## 1.1 Adipositas

### 1.1.1 Einteilung in Gewichtsklassen: Der Body Mass Index und die Altersperzentilen

Das Körpergewicht kann nicht als isolierte Größe betrachtet werden. Es ist altersabhängigen Schwankungen unterworfen sowie u. a. abhängig von der Körpergröße und dem Geschlecht. In der modernen Epidemiologie wird der Body-Maß-Index (BMI) als Maß für das relative Gewicht, das körperhöhenbereinigt ist, angenommen. Er ist definiert als:  $BMI = \text{Körpergewicht (kg)} / \text{Körpergröße (m)}^2$ . Der BMI weist eine hohe Korrelation mit dem Körpergewicht, jedoch eine sehr

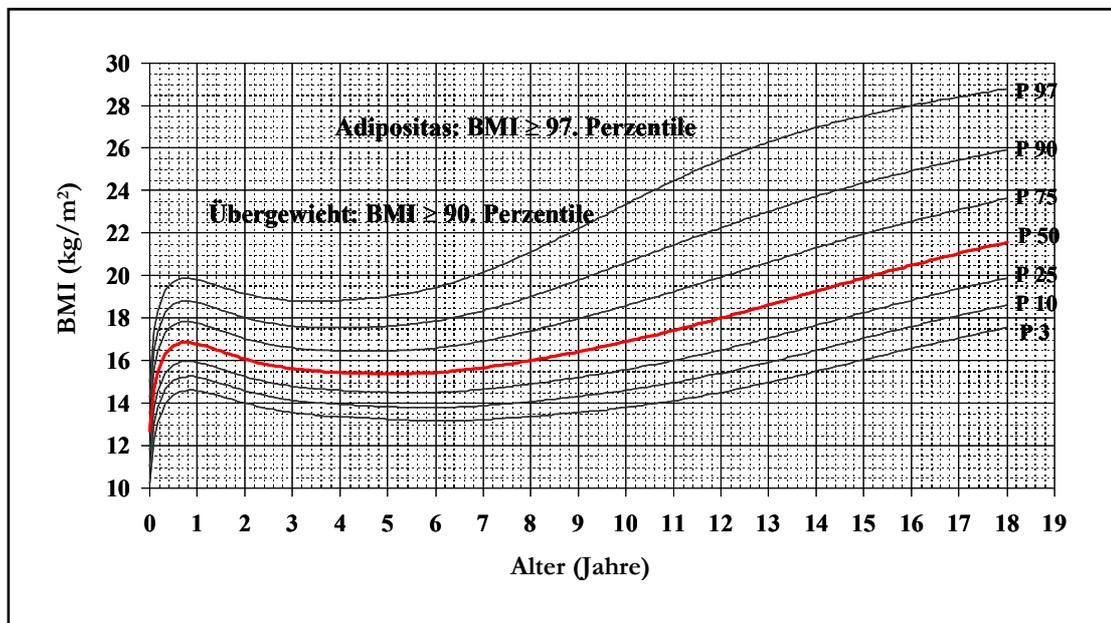
niedrige Korrelation mit der Körpergröße auf (Watson et al. 1979). Der BMI korreliert hoch mit der Fettmasse (Dietz und Robinson 1998; Killeen et al. 1978; Deurenberg et al. 1991). Somit kann der BMI als ein einfach zu bestimmendes und relativ zuverlässiges Maß zur Abschätzung der Fettmasse bei übergewichtigen und adipösen Probanden herangezogen werden (Hebebrand et al. 1994). Die verschiedenen Gewichtsklassen werden entsprechend den BMI-Werten definiert (siehe Tab. 1-1).

**Tab. 1-1: BMI-Gewichtsklassen für Erwachsene (WHO 1998)**

Gewichtskategorie	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht/ Präadipositas	25,0 – 29,9
Adipositas/ Schweregrad I	30,0 – 34,9
Adipositas/ Schweregrad II	35,0 – 39,9
Adipositas Schweregrad III	≥ 40,0

**Tab. 1-2: BMI-Altersperzentilen für verschiedene Gewichtsklassen (nach Hebebrand et al. 1994)**

Gewichtsklasse	Perzentile
Untergewicht	≤ 15.
Adipositas	85. – 94,9.
extreme Adipositas	≥ 95.



**Abb. 1-1: BMI-Perzentilen für Mädchen im Alter von 0-18 Jahren (nach Kromeyer-Hauschild et al. 2001).**

Jedoch ist die Einteilung in Gewichtsklassen ohne Berücksichtigung des Alters wenig sinnvoll. Besonders im Kindes- und Jugendalter unterliegen die Anteile des Körperfetts und der fettfreien Masse und damit der BMI altersabhängigen Schwankungen (Gray et al. 1989). Ebenso bleiben bei der Verwendung des BMI geschlechtsspezifische und kulturelle Unterschiede unberücksichtigt. Aus diesem Grund wurden geschlechtsabhängige BMI-Altersperzentilenkurven für verschiedene Populationen ermittelt (s. Abb. 1-1). Diese ermöglichen es, den errechneten BMI eines jeden Menschen in Bezug zur jeweiligen geschlechtsspezifischen Alterspopulation zu setzen (s. Tab. 1-2; Hebebrand et al. 1994).

### 1.1.2 Definition Adipositas

Unter Adipositas versteht man einen, aufgrund einer positiven Energiebilanz entstandenen überdurchschnittlichen Anteil der Fettmasse an der Gesamtkörpermasse (Gesamtkörpergewicht = Fettmasse + fettfreie Masse) eines Individuums. Für die Einteilung der Adipositas in verschiedene Schweregrade und damit die Abschätzung der gesundheitlichen Gefährdung wird der BMI verwendet (s. u. 1.1.1). Adipositas liegt bei einem BMI > 30 bzw. > 85. Perzentile und extreme Adipositas bei einem BMI  $\geq$  40 bzw.  $\geq$  95. Perzentile vor (Hebebrand et al. 1994; WHO 1998). Im Kindes- und Jugendalter werden gemäß den Richtlinien der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter die 90. und 97. BMI-Perzentile zur Definition dieser beiden Gewichtsklassen herangezogen (Kromeyer-Hauschild et al. 2001; <http://www.a-g-a.de>; <http://www.mybmi.de>). Eine genauere Quantifizierung des Ausprägungsgrades insbesondere der extremen Adipositas kann durch die Verwendung der Standard-deviation-Scores (SDS-Werte) erzielt werden. BMI-SDS-Werte drücken aus, wie stark die Standardabweichung eines individuellen BMI von dem bevölkerungsbezogenen Durchschnitt abweicht (Cole und Green 1992).

### 1.1.3 Prävalenz, Folgestörungen und Ursachen der Adipositas

Von 1988 bis 1994 waren in den USA 20 % der Kinder im Alter von 12 bis 17 Jahren übergewichtig (> 85. Perzentile des BMI) und 8 % bis 17 % adipös (> 95. Perzentile des BMI). Unter den 6- bis 12-jährigen Kindern waren mehr als 10 % übergewichtig. Für Großbritannien wurde im Jahr 1996 eine ähnliche Verteilung festgestellt (Übersicht Segal und Sanchez 2001). Die Prävalenzraten der kindlichen Adipositas stiegen in den USA über einen Zeitraum von 25 Jahren um das 2,3- bis 3,3-fache, in England über 10 Jahre um das 2,0- bis 2,8-fache (Übersicht Ebbeling et al. 2002). In Deutschland war die säkulare Gewichtszunahme bei Schulanfängern (Herpertz-Dahlmann et al. 2003), bei stationär behandelten adipösen Kindern und Jugendlichen (Barth et al. 1997) und bei gemusterten 19-Jährigen (Jaeger et al. 2001) jeweils im obersten Gewichtsbereich besonders ausgeprägt.

Jugendliche mit extremer Adipositas ( $\geq 180\%$  vom Idealgewicht) sind überwiegend auch als Erwachsene adipös. Etwa 50-60% aller extrem adipösen Erwachsenen ( $\geq 180\%$  vom Idealgewicht) waren bereits als Kinder adipös (Strauss 1999). Die Wahrscheinlichkeit für das Fortbestehen der Adipositas ist abhängig vom Eintrittsalter des Übergewichts. Bei Übergewicht im Alter von  $< 3$  Jahren ist kaum eine Aussage über den BMI im Erwachsenenalter möglich. Bei den Kindern bis zu einem Alter von 5 Jahren erlaubt der elterliche BMI eine bessere Vorhersage als der kindliche BMI. So hat ein dünnes Kind im Alter von  $< 5$  Jahren ein  $> 13$ -faches Risiko, adipös zu werden, wenn beide Eltern adipös sind. Im Gegensatz dazu hat ein 10- bis 14-jähriges adipöses Kind ein 22,3-fach erhöhtes Risiko einer Adipositas im Erwachsenenalter, auch wenn beide Eltern dünn sind (Whitaker et al. 1997; Übersicht Yanovski 2001).

Das gesundheitliche Risiko durch Übergewicht steigt ab einem BMI von  $25 \text{ kg/m}^2$  leicht, ab einem BMI  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  stark bzw. ab einem BMI  $\geq 40 \text{ kg/m}^2$  deutlich an (WHO 1998). Aufgrund des weltweiten Anstiegs der Zahl der übergewichtigen Kinder, Jugendlichen und Erwachsenen verbunden mit den gesundheitlichen Komplikationen muss von epidemischen Ausmaßen gesprochen werden. Derzeit trägt Adipositas zu 300.000 Todesfällen pro Jahr in den USA bei und die Kosten, die durch Adipositas verursachte Krankheiten bei Erwachsenen entstanden, erreichten 60 Milliarden \$/pro Jahr (Übersicht Segal und Sanchez 2001).

Besonders bei extrem adipösen männlichen Jugendlichen, ergibt sich als Folge der Adipositas eine erhöhte Mortalitätsrate, wobei insbesondere Hypertonie, kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ II zu nennen sind. Dieses erhöhte gesundheitliche Risiko der frühmanifesten Adipositas bleibt auch unabhängig vom Fortbestehen der Adipositas im Erwachsenenalter erhalten (Must et al. 1992). Die erhöhte Beanspruchung der Gelenke im Rahmen einer Adipositas zieht häufig orthopädische Komplikationen nach sich. Psychiatrische Störungen sind bei Jugendlichen mit extremer Adipositas ausgesprochen häufig (Britz et al. 2000).

Adipositas ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, die aus dem Zusammenspiel von Umwelt- und genetischen Faktoren resultiert. Der weltweite Anstieg der Adipositasprävalenz im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter in den vergangenen Jahrzehnten kann unter anderem auf den stark veränderten Lebensstil, wie die verminderte körperliche Aktivität, veränderte Nahrungszusammensetzung, zunehmende Energiedichte der Nahrung, die zunehmend größeren Mahlzeitenportionen etc. zurückgeführt werden (Übersicht Segal und Sanchez 2001; Übersicht Ebbeling et al. 2002).

Auch genetische Faktoren haben einen starken Einfluss auf die individuelle Prädisposition, Adipositas zu entwickeln. Aus evolutionsbiologischer Sicht war ursprünglich eine genetische Disposition für Adipositas vermutlich von Vorteil, da sie Menschen in Perioden mit

Nahrungsmangel bessere Überlebenschancen verschaffen konnte. Dadurch konnten sich die entsprechenden „sparsamen“ Genotypen ausbreiten. Erst in den letzten Jahrzehnten wirkte sich aufgrund der dauerhaften Verfügbarkeit hochkalorischer Nahrung und dem verringerten Bewegungsverhalten in den westlichen Industrienationen die Veranlagung zur Adipositas für den Menschen nachteilig aus („thrifty genotype hypothesis“; Neel 1962). Die in den letzten 30 Jahren zunehmende psychosoziale Stigmatisierung adipöser Individuen hat mutmaßlich zu einer selektiven Partnerwahl („assortative mating“) geführt. Bei einer polygenen Vererbung der Adipositas könnte dies eine quantitativ höhere Belastung der Nachkommen mit prädisponierenden Allelen nach sich ziehen und damit den Ausprägungsgrad insbesondere der extremen Adipositas von Generation zu Generation ansteigen lassen (Hebebrand et al. 2000). Somit könnten Lebensstilveränderungen auf dem Hintergrund der genetischen Prädisposition für Adipositas eine Erklärung für die epidemische Ausbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen sein.

Aufgrund einer longitudinal untersuchten Zwillingsstichprobe wird vermutet, dass die genetischen Faktoren, die im Alter von 20 Jahren den BMI beeinflussen, nur zu 30 % mit denen überlappen, die im Alter von 48 bzw. 63 Jahren von Bedeutung sind. Im Alter von 48 bzw. 63 Jahren sind weitgehend die gleichen Gene relevant (Fabsitz et al. 1992).

## 1.2 Genetische Determination des Körpergewichts

### 1.2.1 Formalgenetische Befunde

Die Varianz des Körpergewichts kann als ein komplexer multifaktorieller Phänotyp aufgefasst werden. Dieser wird durch das Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen determiniert. Zu den Umwelteinflüssen zählen u. a. Verhaltensweisen, kulturelle Faktoren und sozioökonomische Faktoren (Übersicht Hebebrand und Renschmidt 1995).

#### *Ergebnisse der Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien*

Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien legen eine Beeinflussung des Phänotyps Körpergewicht und damit der Adipositas durch genetische Faktoren nahe (Übersicht Bouchard und Perusse 1993; Übersicht Hebebrand et al. 1998; Übersicht Maes et al. 1997). Die Heritabilitäts-schätzungen unterscheiden sich jedoch zwischen diesen Ansätzen des Studiendesigns. Aus Zwillingsstudien ergibt sich die Schätzung, dass genetische Faktoren 60-90 % der Varianz des BMI erklären (Übersicht Maes et al. 1997). Stunkard et al. (1990) zeigten in einer Zwillingsstudie mit gemeinsam und getrennt aufgewachsenen eineiigen Zwillingen, dass gemeinsam erlebte Umwelteinflüsse nur einen sehr geringen Einfluss auf den BMI ausübten,

Umwelteinflüsse jedoch, die getrennt erfahren wurden, beeinflussten den BMI deutlich. Unabhängig davon, ob die Zwillingspaare getrennt oder zusammen aufwuchsen, betrug die Intrapaar-Korrelation des BMI etwa 0,7 (Stunkard et al. 1990). Ebenso zeigten Adoptionsstudien, dass das gemeinsame Aufwachsen von Adoptivkindern und ihren Adoptiveltern keinen bzw. nur einen geringen Effekt auf das Körpergewicht hatte und damit genetische Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Varianz des BMI haben (Stunkard et al. 1986). Auch in Familienstudien wurde gezeigt, dass der elterliche BMI mit dem der Kinder korrelierte (Übersicht Bouchard und Perusse 1993; Übersicht Hebebrand und Renschmidt 1995). Teilweise konnten höhere Mutter-Kind-Korrelationen als Vater-Kind-Korrelationen gefunden werden. Die Geschwister-Korrelationen für den BMI lagen im Allgemeinen geringfügig über den Eltern-Kind-Korrelationen (Übersichten Hebebrand et al. 1998, 2001).

## 1.2.2 Tiermodelle

### 1.2.2.1 Monogen rezessive und dominante Formen der Adipositas

In monogenen Mausmodellen werden verschiedene Mutationen in jeweils einem Gen als Ursache für eine massive Adipositas angesehen. Diese Tiermodelle bieten wichtige Einsichten in die komplexen endokrinen und metabolischen Regulationsmechanismen des Körpergewichts, obwohl sie nur bei einem vergleichsweise geringen Anteil der Tiere den Phänotyp erklären. Es gibt bislang eine dominant-vererbte (*Agouti*-Maus) und acht autosomal rezessiv vererbte Formen der Adipositas (*diabetes db*-Maus, *fatty liver dystrophy fld*-Maus, *fat*-Maus, *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty OLETF*-Ratte, *little*-Maus, *obese ob*-Maus, *tubby tub*-Maus und *Mabogany*-Maus; s. Tab. 1-3). Das *obese*- bzw. *ob*-Gen kodiert für Leptin, ein Hormon, welches über die Bindung an den Leptin-Rezeptor die Nahrungsaufnahme durch Hemmung des Appetits negativ reguliert. Zwei unterschiedliche Mutationen im Exon bzw. Intron des *ob*-Gens verhindern die Bildung des biologisch aktiven Leptins und führen somit zur Ausbildung eines extrem adipösen Phänotyps (Zhang et al. 1994).

Tab. 1-3: Monogene Formen der Adipositas im Mausmodell

Maus-Modell	Maus			Mensch			Referenzen
	Chr	Gen	Erbgang	Chr	Gen	Genprodukt	
<i>Diabetes (db)</i>	4	Lepr	rezessiv	1p31	LEPR	Leptin-Rezeptor	Chen et al. 1996; Tartaglia et al. 1995
<i>Fatty liver dystrophy (fld)</i>	12	Lpin1	rezessiv	2p21	LPIN1	Lipin	Peterfy et al. 2001
<i>Fat (fat)</i>	8	Cpe	rezessiv	4q32	CPE	Carboxy-peptidase E	Naggert et al. 1995
<i>OLETF</i>	5	Cckar	rezessiv	4p15.2-p15.1	CCKAR	Cholecystokinin-Rezeptor A	Funakoshi et al. 1993; Schwartz et al. 1999
<i>Little</i>	11	Gh	rezessiv	17q24.1	GH	Growth hormone	Donahue und Beamer 1993
<i>Obese (ob)</i>	6	Lep	rezessiv	7q31.3	LEP	Leptin	Zhang et al. 1994
<i>Tubby (tub)</i>	7	Tub	rezessiv	11p15.5	TUB	Insulin-signaling protein	Kleyn et al. 1996; Noben-Trauth et al. 1996 ; Kapeller et al. 1999
<i>Mahogany (mg)</i>	2	Atrn	rezessiv	20p13	ATRIN	Attractin	Nagle et al. 1999; Gunn et al. 1999
<i>Agouti Yellow (Ay)</i>	2	Ay	dominant	20q11.2-q12	ASIP	Agouti signaling protein	Bultmann et al. 1992; Wilson et al. 1995

Quelle: Übersicht Chagnon et al. 2003

### 1.2.2.2 Transgene Mausmodelle

In transgenen Mäusen wurden im Gegensatz zu den o. g. durch Spontanmutationen entstandenen, monogenen Mausmodellen bekannte zentral oder peripher exprimierte Gene gezielt ausgeschaltet (Knockout-Mäuse) oder hochreguliert. Ziel ist es hierbei, durch Beobachtung der physiologischen Auswirkungen der Blockierung, Hypothesen zur Funktion des betreffenden Gens, z. B. an der Gewichtsregulation, bestätigen zu können. Es gibt mehrere verschiedene transgene Mausmodelle für den Phänotyp Adipositas.

Die Melanokortin-4-Rezeptor defiziente Maus (MC4R) ist adipös. Sie ist Beispiel für eine Knockout-Maus eines Gens, das für einen hypothalamischen Rezeptor kodiert, welcher ein anorexigenes Neuropeptid - das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH) - bindet (Huszar et al. 1997). Die erwachsenen homozygoten männlichen Mutationsträger waren durchschnittlich 50 % schwerer als die Wildtyp-Kontrollen. Die erwachsenen homozygoten weiblichen Tiere waren sogar doppelt so schwer wie die Kontroll-Tiere. Heterozygote weibliche MC4R-Mutationsträger lagen mit der Ausprägung des Körpergewichts zwischen den Wildtyp-Formen und den homozygot MC4R defizienten Mäusen.

Bei der Ausschaltung des *MCHR1*, das für einen Rezeptor kodiert, welcher ein orexigenes Neuropeptid – das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH) - bindet, war ein signifikanter Gewichtsverlust und ein verminderter Körperfettgehalt zu beobachten. Hierbei war der Effekt bei den männlichen *Mchr1<sup>-/-</sup>* Mäusen stärker ausgeprägt (Chen et al. 2002; s. u. 1.6.5.2).

### 1.2.2.3 Polygene Tiermodelle

Polygene Tiermodelle können Einsichten in die Physiologie des Menschen geben, da Adipositas selten durch Mutationen in einem einzigen Gen sondern eher durch Mutationen in mehreren Genen verursacht wird, demnach einen polygen verursachten Phänotyp darstellt. Mittels chromosomaler Kartierung von „quantitative trait loci“ (QTL) können chromosomale Regionen – Loci mit messbarem, wenn auch geringem Einfluss auf die Merkmalsausprägung – festgestellt und kartiert werden. Ein gewisser prozentualer Anteil der phänotypischen Varianz (Fettgehalt, Gewicht, BMI etc.) kann mit dem entsprechenden QTL erklärt werden. Mit polygenen Tiermodellen können somit auch Gene identifiziert werden, die eher einen geringen aber wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung des Phänotyps Adipositas ausüben. Es sind bislang 168 QTLs beim Tier bekannt, die mit Körpergewicht oder Körperfettgehalt gekoppelt sind (Übersicht Chagnon et al. 2003). Durch die Identifizierung der den QTL entsprechenden homologen Regionen beim Menschen sind Regionen im humanen Genom bekannt, in denen ein oder mehrere Gene lokalisiert sein können, die zur Ausprägung des Phänotyps Adipositas beitragen.

## **1.2.3 Humane Befunde**

### 1.2.3.1 Monogen rezessive Formen der humanen Adipositas

Auch beim Menschen sind seltene autosomal-rezessive Formen der Adipositas bekannt. Dazu zählen bestimmte seltene Mutationen in den *Leptin*-, *Leptin-Rezeptor*-, *Prohormon-Convertase-I*-, *Pro-opiomelanocortin*- und *Sim1*-Genen (Jackson et al. 1997; Montague et al. 1997; Krude et al. 1998; Strobel et al. 1998; Clément et al. 1998; Ozata et al. 1999; Holder et al. 2000; Übersicht Chagnon et al. 2003). Allen 5 Formen ist gemeinsam, dass neben der durch Hyperphagie hervorgerufenen frühmanifesten Adipositas andere klinische, meist endokrinologische Symptome zu beobachten waren (Übersicht Hebebrand et al. 1998). In einer pakistanischen Familie wurde bei Cousine und Cousin, deren Eltern blutsverwandt waren, sowie bei einem dritten Kind pakistanischer Herkunft eine homozygote Basenpaar-Deletion in der kodierenden Region des *Leptin*-Gens identifiziert (Montague et al. 1997; Farooqi et al. 1999, 2002). Diese Mutation führt zu einer Verschiebung des DNA-Leserasters und damit zu einem

funktionslosen Hormon, das nicht in die Blutbahn gelangt und damit nicht an den Leptin-Rezeptor binden kann. Da das in den Adipozyten gebildete Leptin über den Leptin-Rezeptor im Hypothalamus den Appetit hemmt, fehlten bei den drei pakistanischen Kindern mit dem defekten Leptin die appetithemmenden Signale. Eine ausgeprägte Hyperphagie führte bei den homozygoten Trägern dieser Mutation zur Ausbildung einer frühmanifesten extremen Adipositas. Die heterozygoten Eltern des Cousins und der Cousine waren phänotypisch unauffällig. Die drei morbid adipösen Kinder wurden mit einer täglichen subkutanen Gabe von rekombinant hergestelltem Leptin bis zu 4 Jahren lang mit anhaltend positiven Effekten auf den Appetit, die Fettmasse, die Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie erfolgreich therapiert (Montague et al. 1997; Farooqi et al. 1999, 2002). In der kodierenden Region des *Leptin*-Gens wurde eine weitere Mutation bekannt, die ebenso zur Ausprägung der Adipositas führte (Strobel et al. 1998; Ozata et al. 1999). Eine Mutation in dem *Leptin-Rezeptor*-Gen (Clément et al. 1998), drei Mutationen im *Pro-opiomelanocortin*-Gen (Krude et al. 1998; Übersicht Krude und Grüters 2000), eine Mutation im *Prohormon-Convertase-I*-Gen (Jackson et al. 1997) als auch ein Bruch im *Sim1*-Gen aufgrund einer Translokation (Holder et al. 2000) führten zur Ausprägung einer frühmanifesten extremen Adipositas. Diese Mutationen sind sehr selten und erklären damit nicht die Genese der allgemeinen, sich epidemisch ausbreitenden Adipositas.

#### 1.2.3.2 Monogen dominante Formen der humanen Adipositas

Im humanen *Melanokortin-4-Rezeptor*-Gen wurden bislang fünf Frameshift- und Nonsense-Mutationen beschrieben, die zu einer Haploinsuffizienz des MC4R führen. Es wird von einem Hauptgeneffekt und damit von einer autosomal dominant vererbten Form der Adipositas beim Menschen ausgegangen (Vaisse et al. 1998, 2000; Yeo et al. 1998; Hinney et al. 1999; Farooqi et al. 2000; Jacobson et al. 2002). Bei 1.681 adipösen Individuen, deren *MC4R* vollständig gescreent wurde, beträgt die Häufigkeit dieser 5 Mutationen 0,65 %, während keine davon bei normalgewichtigen Personen gefunden werden konnte (Hinney et al. 2003). Träger dieser Haploinsuffizienz-Mutationen haben eine oft extreme Adipositas, weisen jedoch im Gegensatz zu den oben beschriebenen Trägern rezessiver Formen der Adipositasmutationen keine weiteren klinischen und endokrinologischen Auffälligkeiten auf.

Weltweit konnten bereits über 40 Missense-Mutationen in dem *Melanokortin-4-Rezeptor*-Gen identifiziert werden, die als funktionell relevant eingestuft wurden, da sie in pharmakologischen Assays zu einem völligen oder partiellen Funktionsverlust führten (Gu et al. 1999; Ho G und MacKenzie RG 1999; Farooqi et al. 2000, 2003; Vaisse et al. 2000; Kobayashi et al. 2002; Hinney et al. 2003). Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass diese Missense-Mutationen Adipositas verursachen. Jedoch wurden nicht nur adipöse sondern auch einige

normalgewichtige Träger einiger Missense-Mutationen im *MC4R*-Gen beschrieben (Vaisse et al. 2000; Gu et al. 1999; Sina et al. 1999; Farooqi et al. 2000; Dubern et al. 2001). Schätzungsweise haben bis zu 2 % der extrem adipösen Kinder und Jugendlichen relevante Mutationen im *MC4R*-Gen (Hinney et al. 1999). Deshalb kann nur ein kleiner Anteil der (extremen) Adipositas-Fälle durch die bislang bekannten monogenen Formen der Adipositas erklärt werden.

Aufgrund der Seltenheit der einzelnen Missense-Mutationen, die in funktionellen Studien zu einer eingeschränkten Funktion des MC4R führten, wurden sie in einer signifikant ausfallenden Assoziationsanalyse zusammengefasst. In einem signifikanten Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT, Spielman et al. 1993) für alle Mutationen mit eingeschränkter Funktion wurde eine Transmissionsrate von 81,8 % (9 Transmissionen und 2 Nicht-Transmissionen) ermittelt (Hinney et al. 2003).

Bei einem Vergleich der BMI-Werte der etwa 80 Träger/innen funktionell relevanter *MC4R*-Mutationen aus 19 Familien mit denen von Wildtyp-Trägern aus denselben Familien, wurde ein etwa 15 kg höheres durchschnittliches Körpergewicht der erwachsenen Mutationsträger im Vergleich zu den Wildtyp-Trägern ermittelt (Dempfle et al. eingereicht).

In funktionellen *in vitro* Studien unterschied sich der MC4R mit dem Missense-SNP V103I nicht von dem Wildtyp-Rezeptor (Hinney et al. 2003). Deshalb wurde dieser Polymorphismus hinsichtlich der Gewichtsregulation bislang als irrelevant angesehen. Das 103I-Allel wurde bei 13 (1,61 %) adipösen Probanden sowie bei 8 (2,45 %) unter- bzw. normalgewichtigen Kontrollen identifiziert (Hinney et al. 2003).

### 1.2.3.3 Syndromale Formen der Adipositas

Als syndromale Formen der humanen Adipositas mit erst teilweise aufgeklärten, seltenen Chromosomenaberrationen oder Mutationen in einzelnen Genen gelten z. B. das Prader-Willi-Syndrom (Turleau et al. 1988; Übersicht Villa et al. 1995; Jay et al. 1997; Ming et al. 2000; Kuslich et al. 1999; Ohta et al. 1999; de los Santos et al. 2000; Hebebrand et al. 2001; Wirth et al. 2001; Robinson et al. 1991) und das Bardet-Biedl-Syndrom (Bruford et al. 1997; Kwitek-Black et al. 1993; Sheffield et al. 1994; Carmi et al. 1995; Young et al. 1999; Slavotinek et al. 2000; Katsanis et al. 2000; Hebebrand et al. 2001). Neben der stammbetonten Adipositas wiesen Patienten mit diesen Syndromen häufig zusätzlich Intelligenzverminderung und leichte Dysmorphiezeichen auf. Die Aufklärung der für das Symptom Adipositas verantwortlichen Gene bei den syndromalen Formen der Adipositas könnte ebenso für die Aufklärung der molekularen Mechanismen der allgemeinen Adipositas bedeutsam sein.

## **1.3 Ansätze zur Identifizierung von humanen Genen für die Gewichtsregulation**

### **1.3.1 Genom-Scan**

Ein Genom-Scan erlaubt die Identifizierung chromosomaler Regionen, auf denen mutmaßlich Allele liegen, die den Phänotyp Adipositas mitbedingen. Hierfür werden multiallelische DNA-Marker, die in maximalen Abständen von etwa 5-10 cM über das ganze Genom verteilt sind, hinsichtlich ihrer Kopplung untersucht. Als multiallelische Marker können z. B. Mikrosatelliten typisiert werden, die aus Di-, Tri-, oder Tetranukleotid-Wiederholungen (z. B. CA-CA-CA-...<sub>n</sub>) bestehen (Hinney und Hebebrand 2001). Entgegen klassischen Kopplungsanalysen, die spezifische genetische Modellannahmen erfordern, verlangen neuere Verfahren, wie beispielsweise der extrem konkordante Geschwisterpaar-Ansatz (ECSP; Risch und Zhang 1995), keine Kenntnis des Erbgangs und sind somit ein systematisches und annahmefreies Verfahren (Lander und Kruglyak 1995; Risch und Zhang 1995; Übersicht Weeks und Lathrop 1995). In einem Genom-Scan werden chromosomale Regionen identifiziert, in denen beispielsweise zwei adipöse Geschwister überzufällig häufig in einzelnen Allelen der untersuchten Mikrosatelliten übereinstimmen, als es dem Erwartungswert von 50 % entsprechen würde. Es wird angenommen, dass die identifizierten Markerallele im Kopplungsungleichgewicht mit einem „Adipositas“-Allel in einem benachbarten Gen stehen, das an der Ausprägung der Adipositas beteiligt ist. Mit diesem Ansatz können Kandidatengenregionen und nachfolgend darin liegende Kandidatengene identifiziert werden (Hinney und Hebebrand 2001).

Weltweit wurden bislang insgesamt über 40 Genom-Scans sowie weitere auf einzelne chromosomale Regionen bzw. einzelne SNPs beschränkte Kopplungsstudien zu Adipositas und den damit verbundenen Phänotypen bei Erwachsenen bzw. Kindern und Jugendlichen durchgeführt (Borecki et al. 1994; Clément et al. 1996; Duggirala et al. 1996; Reed et al. 1996; Chagnon et al. 1997; Comuzzie et al. 1997; Lapsys et al. 1997; Lembertas et al. 1997; Norman et al. 1997; Roth et al. 1997; Hager et al. 1998; Hanson et al. 1998; Norman et al. 1998; Onions et al. 1998; Chagnon et al. 1999; Lee et al. 1999; Rotimi et al. 1999; Hinney et al. 2000; Kissebah et al. 2000; Öhman et al. 2000; Van der Kallen et al. 2000; Watanabe et al. 2000; Hirschhorn et al. 2001; Hsueh et al. 2001; Hunt et al. 2001; Lindsay et al. 2001; Perola et al. 2001; Perusse et al. 2001; Price et al. 2001; Weyer et al. 2001; Atwood et al. 2002; Deng et al. 2002; Feitosa et al. 2002; Stone et al. 2002; Wu et al. 2002; Zhu et al. 2002; Dong et al. 2003; Iwasaki et al. 2003; Palmer et al. 2003; Saar et al. 2003). Da Adipositas ein komplexer

Phänotyp und eine polygen bedingte Erkrankung ist, hat die unabhängige Bestätigung einzelner Kopplungsregionen durch mehrere Arbeitsgruppen große Bedeutung. So konnten zahlreiche chromosomale Kopplungsregionen zu Adipositas assoziierten Phänotypen durch mindestens zwei Gruppen repliziert werden (s. Abb. 1-2).

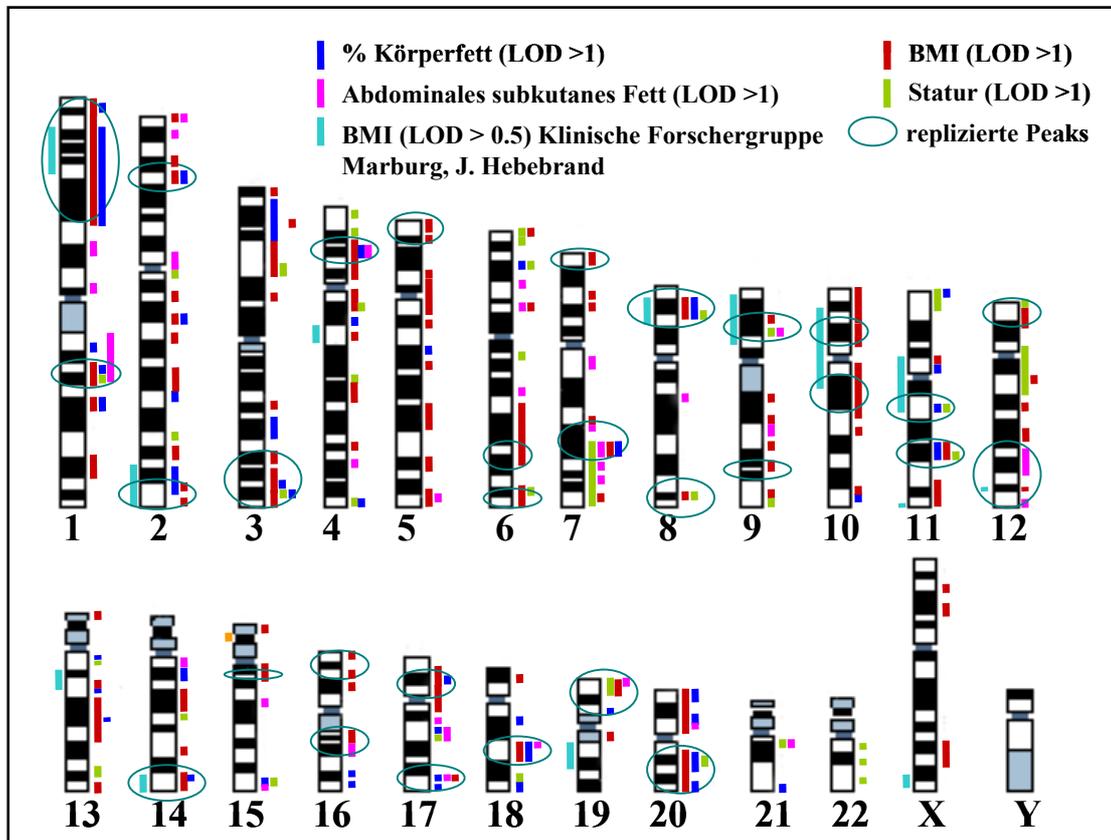


Abb. 1-2: Chromosomale Regionen, für die Kopplungsstudien (s. u. 1.3.1) an Adipositas assoziierten Phänotypen vorgenommen wurden. Jeder senkrechte Balken steht für einen oder mehrere Kopplungsbefunde in ein und derselben Region für einen Phänotyp.

Allerdings weisen diese Genom-Scans verschiedener Arbeitsgruppen nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit auf, da sie einerseits an z.T. unterschiedlichen ethnischen Studiengruppen durchgeführt wurden und außerdem als Bezugsgröße z.T. unterschiedliche Phänotypen wie BMI, prozentualer Körperfettanteil verwendet wurden. Ebenso muss darauf verwiesen werden, dass mit solchen Genom-Scans nur Hauptgenloci identifiziert werden können. Allele mit schwachem Effekt bleiben ebenso wie seltene relevante Allele unentdeckt. Bisher wurde von zwei Genen berichtet, die Kopplungsbefunde zu erklären scheinen: 1.) *SLC6A14* - ein Aminosäuretransporter, der die Tryptophan-Verfügbarkeit für die Serotonin-Synthese reguliert und somit wahrscheinlich den Appetit beeinflusst – auf Chromosom Xq24 (Suviolahti et al. 2003) und 2.) *GAD2* – ein Gen, das für das Glutaminsäure Decarboxylase Enzym GAD65 kodiert und in pankreatischen  $\beta$ -Zellen exprimiert wird - auf Chromosom

10p11-12 (Boutin et al. 2003). Es wird vermutet, dass einige der erhaltenen Peaks auf die Beteiligung mehrerer Gene in den jeweiligen Regionen zurückzuführen sind. In den nächsten Jahren wird vermutlich aufgeklärt, in welchem Maß einzelne Mutationen, SNPs, Haplotypen oder kombinierte Effekte von SNPs bzw. Haplotypen am Zustandekommen dieser Peaks beteiligt sind (Übersicht Hebebrand et al. 2003).

### **1.3.2 Kandidatengenansatz**

Beim Kandidatengenansatz werden solche Gene für eine detaillierte Untersuchung ausgewählt, die aufgrund der Befunde bei Tieren (s. u. 1.2.2) und beim Menschen (s. u. 1.2.3) sowie aufgrund von Überlegungen und Befunden zu physiologischen Funktionen, Expressionsmustern, pharmakologischen Tierbefunden, zu Knockout- oder transgenen Tiermodellen oder zu chromosomalen Störungen als Kandidatengene für die Gewichtsregulation am ehesten plausibel sind.

Diese Kandidatengene können u. a. mit Hilfe der single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP; s. u. 3.3.1) oder der denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC; s. u. 3.3.2) und der Sequenzierung (s. u. 3.3.3) systematisch auf genetische Varianten untersucht werden, welche möglicherweise funktionsrelevante Allele aufweisen können. Die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung der eher seltenen Varianten wird durch eine Erweiterung des Stichprobenumfangs erhöht.

#### 1.3.2.1 Assoziationstests

Die bei den Mutationsscreenings detektierten häufigeren Sequenzvarianten (Frequenz > 1 %), die so genannten Single Nukleotid Polymorphisms (SNPs) bzw. auch schon in dem Gen bekannten SNPs können zu Assoziationsstudien herangezogen werden. In Assoziationsstudien wird die statistische Assoziation zwischen Phänotyp und einem Allel des SNPs bei Fällen und Kontrollpersonen geprüft. Dabei wird untersucht, ob Unterschiede in der Häufigkeit eines SNP-Allels in Studiengruppen mit unterschiedlichen Phänotypen z. B. bei adipösen Probanden und bei normalgewichtigen Kontroll-Personen existieren.

#### 1.3.2.2 Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT)

Assoziationsuntersuchungen ergeben nicht selten falsch positive Ergebnisse. Ursachen hierfür können u. a. Stratifikationseffekte sein (s. u. 3.8.2). Entscheidend für den Erfolg der statistischen Aussage solcher Fall-Kontroll-Studien ist die Wahl der Kontrollgruppen. Fälle und Kontroll-Personen sollten sich möglichst nur in der zu untersuchenden Größe, z. B. dem

BMI, unterscheiden. Alle weiteren Merkmale sollten identisch sein. Diese schwer zu erfüllende Voraussetzung kann mit internen Kontrollen umgangen werden, z. B. mit dem Test auf Transmissions-Ungleichgewicht (TDT, Spielman et al. 1993), der auf den transmittierten und nicht-transmittierten Allelen heterozygoter Eltern beruht.

Weltweit wurden verschiedene zentral im Gehirn oder peripher im Organismus exprimierte Kandidatengene mit Hilfe von Assoziationsstudien auf ihre Beteiligung an der Entwicklung einer Adipositas untersucht (Übersicht Chagnon et al. 2003). Aufgrund von Stratifikationsproblemen oder nicht erfolgter Korrektur von multiplem Testen konnte eine sehr große Anzahl veröffentlichter Assoziationen durch andere Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, nach der Detektierung einer Assoziation eines Markerallels mit z. B. Adipositas, diesen positiven Befund mittels eines TDTs unter Heranziehung eines Triodesigns (adipöses Kind und beide Eltern) zu bestätigen. Der TDT ist ein stabiler Test, der nicht diesen Stratifikationseffekten unterliegt.

#### 1.3.2.3 Bestätigung der Assoziation in anderen Populationen

Aufgrund der o. g. Anfälligkeit der Assoziationsuntersuchungen für falsch positive Ergebnisse wird auch angeraten, positive Assoziationsergebnisse in unabhängigen Stichproben zu bestätigen (Übersicht Campbell und Rudan 2002; Dahlman et al. 2002; Übersicht Hirschhorn and Altshuler 2002). Hierfür können u. a. rekrutierte Indexpatienten und Kontroll-Personen anderer Forschergruppen genutzt werden. Die Bestätigung kann sowohl in Studiengruppen derselben Ethnie oder/und anderer ethnischer Angehörigkeit erfolgen.

#### 1.3.2.4 Funktionelle Studien

Nach Erhalt positiver Befunde für die Assoziation sind weitere Untersuchungen (*in vitro*; *in vivo* beim Tier) zum Nachweis der funktionellen Relevanz des SNP oder mehrerer zu einem Haplotyp gehörigen SNPs notwendig.

Ebenso können die detektierten seltenen Varianten (Frequenz < 1 %), insbesondere die nicht-synonymen Varianten, die zu einem Aminosäureaustausch führen, mittels verschiedener pharmakologischer Assays (z. B. cAMP-, IP-Assay; s. u. 3.5.2) auf ihre funktionelle Relevanz hin überprüft werden.

Wenn in einer Stichprobe verschiedene, plausible Mutationen (z. B. Nonsense-Mutationen, Deletionen, Missense-Mutationen) mit ableitbaren funktionellen Konsequenzen gefunden werden, diese in den Kontrollgruppen jedoch nicht auftreten, ist ein Einfluss dieser Mutation auf die Ausprägung des Phänotyps wahrscheinlich. Falls der Unterschied statistisch signifikant ist, impliziert dies, dass die gefundenen Sequenzvarianten mit dem Phänotyp assoziiert sind.

## **1.4 Kontrolle der Nahrungsaufnahme durch das ZNS**

Schon vor über 60 Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Nahrungsaufnahme durch zwei hypothalamische Zentren reguliert wird – durch das Sättigungszentrum Ventromedialer Hypothalamus (VMH) und das Hungerzentrum Lateraler Hypothalamus (LHA), da bei Katzen und Ratten Läsionen des VMH zu Hyperphagie und Übergewicht und Läsionen des LHA dagegen zu Hypophagie und Magerkeit führten (Hetherington und Ranson 1940; Anand und Brobeck 1951). Diese Hypothese wurde lange akzeptiert. In den vergangenen Jahrzehnten wurde weltweit intensiv an der Aufklärung der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen geforscht. Es wurden zahlreiche Signal-Moleküle, die im Zusammenhang mit der Regulation der Nahrungsaufnahme stehen, darunter die hypothalamischen Neuropeptide, erforscht. Heute wird die präzise Einstellung des Körpergewichts auf einen genetisch ko-determinierten „Setpoint“ als ein kompliziertes neuronales Netzwerk verstanden, das die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch mittels zahlreicher im Hypothalamus exprimierter Neuropeptide reguliert.

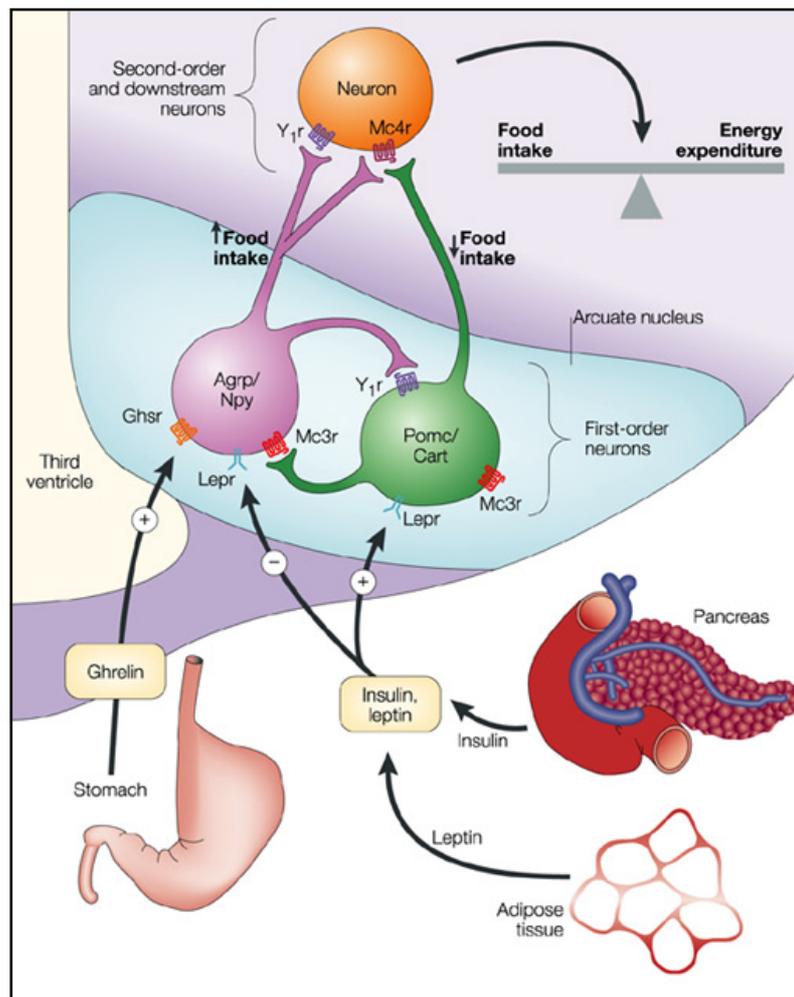
Diese Neuropeptide wurden verschiedenen Subpopulationen der hypothalamischen Neuronen zugeordnet, die in einzelnen hypothalamischen Kernen lokalisiert sind und in ihre eigenen Zielregionen im Gehirn projizieren (Übersicht Elmquist et al. 1999; Übersicht Schwartz et al. 2000; Übersicht Kawano et al. 2002). Die identifizierten Neuropeptide werden in zwei Gruppen eingeteilt: a) zu den orexigenen Neuropeptiden, die den Appetit und die Nahrungsaufnahme stimulieren, zählen u. a. das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH), die Orexine A und B, das Neuropeptid Y (NPY), das Agouti related peptide (AGRP) und das Ghrelin; b) anorexigene Neuropeptide, die die Nahrungsaufnahme hemmen, sind u. a. das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH), das Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART), das Thyrotropin-releasing Hormon (TRH), das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) und das Cholecystokinin (CCK) (Übersicht Flier und Maratos-Flier 1998; Übersicht Sawchenko 1998; Übersicht Elmquist et al. 1999; Übersicht Inui 1999; Kalra et al. 1999; Übersicht Schwartz et al. 2000; Übersicht Cone et al. 2001; Übersicht Spiegelman und Flier 2001; Übersicht Barsh und Schwartz 2002; Übersicht Saper et al. 2002).

Neben dem Hypothalamus sind auch kortikale und subkortikale Gehirnareale an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Aufgrund neuester Forschungsergebnisse wird die Beteiligung des Nucleus accumbens an der Regulation der Energiezufuhr diskutiert, wobei hier von einem Zusammenhang zum so genannten „reward system“ ausgegangen wird (Will et al. 2003).

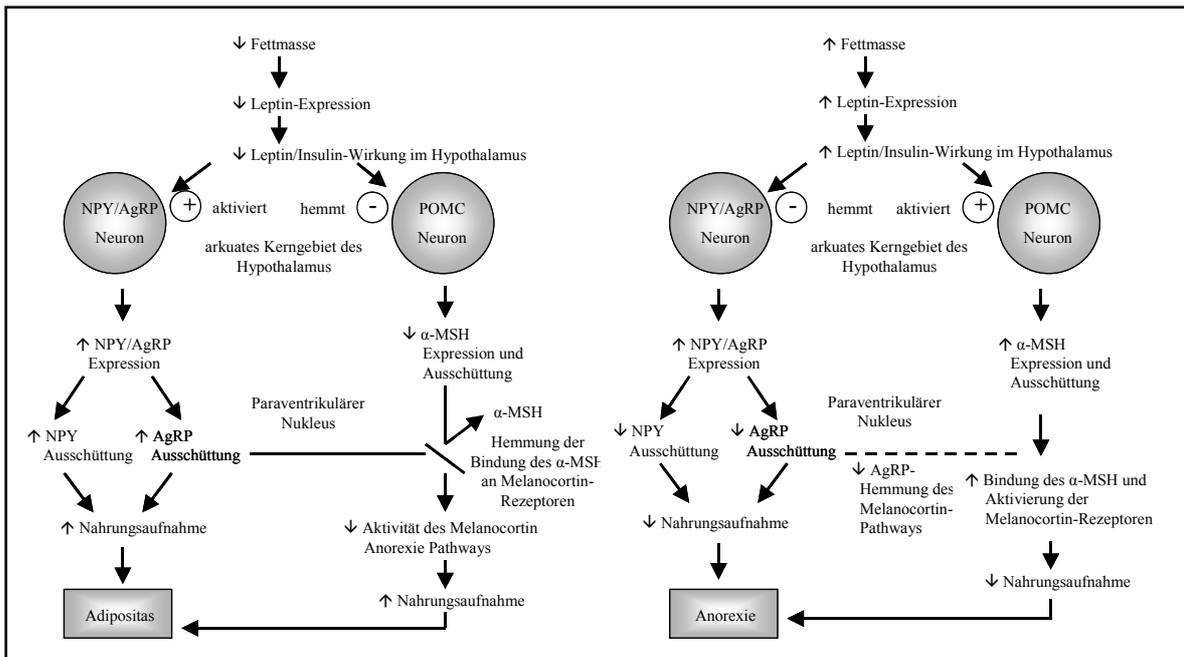
## 1.5 Kontrolle der Nahrungsaufnahme durch Signalstoffe aus peripheren Organen

In dem komplexen hypothalamischen Netzwerk, das die Nahrungsaufnahme reguliert, werden auch metabolische Informationen aus der Peripherie, insbesondere dem Fettgewebe, aber auch dem Gastrointestinaltrakt, integriert. Mit der Entdeckung des Leptins erfuhr die Erforschung der Regulationsmechanismen der Energiehomöostase einen enormen Auftrieb.

Leptin ist ein anorektisch wirkendes Hormon, das im weißen Fettgewebe exprimiert wird. Zhang et al. (1994) klonierten und sequenzierten das *ob/ob*-Gen, das für Leptin kodiert und dessen Fehlen bei der *ob/ob*-Maus zu Hyperphagie und extremem Übergewicht führt. Zentral injiziertes Leptin reduziert die erhöhte Nahrungsaufnahme und das erhöhte Körpergewicht der *ob/ob*-Mäuse (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1995; Pelleymounter et al. 1995; Weigle et al. 1995). Der Leptin-Rezeptor gehört zu der Familie der Cytokin-Rezeptoren und übt den Effekt des Leptins über die Aktivierung des Janus-Kinase/STAT-3-Signalweges und die Induktion von Genen aus (Tartaglia et al. 1995; Übersicht Tartaglia 1997). Sowohl die POMC/CART Neuronen als auch die NPY/AGRP Neuronen im Hypothalamus exprimieren Leptin-Rezeptoren (Hakansson et al. 1996; Mercer et al. 1996; Schwartz et al. 1996a; Cheung et al. 1997; Elmquist et al. 1998; Baskin et al. 1999). Leptin beeinflusste beide Neuronen über die Änderung der Expression der Neuropeptid-Gene (Schwartz et al. 2000). Leptin hemmt die NPY/AGRP-Neuronen, die wiederum bei niedrigen Leptin-Spiegeln aktiviert werden (s. Abb. 1-3; Stephens et al. 1995; Schwartz et al. 1996b; Spanswick et al. 1997; Broberger et al. 1998; Hahn et al. 1998; Elias et al. 1999; Cowley et al. 2001). Entgegengesetzt dazu aktiviert Leptin die POMC/CART Neuronen des arkuaten Kerngebietes im Hypothalamus, die jedoch bei niedrigen Leptin-Spiegeln gehemmt werden (s. Abb. 1-3; Schwartz et al. 1997; Thornton et al. 1997; Kristensen et al. 1998; Cowley et al. 2001).



**Abb. 1-3: Kontrolle der Energiehomöostase durch die Neuronen des arkuaten Kerngebietes im Hypothalamus (nach Barsh und Schwartz 2002).** In dem arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus existieren zwei Arten von Neuronen, die AGRP/NPY- und die POMC/CART-Neuronen, die durch Hormone aus peripheren Organen reguliert werden. AGRP und NPY sind orexigene Neuropeptide, die die Nahrungsaufnahme stimulieren und den Energieverbrauch senken. Im Gegensatz dazu sind  $\alpha$ -MSH (ein post-translationales Produkt des POMC) und CART Neuropeptide, die Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch hemmen. Insulin und Leptin sind Hormone, die in Proportion zu dem Fettspeicher des Körpers zirkulieren und die AGRP/NPY-Neuronen hemmen bzw. die POMC/CART-Neuronen stimulieren. Niedrige Insulin- und Leptinspiegel aktivieren die AGRP/NPY-Neuronen und hemmen die POMC/CART-Neuronen. Ghrelin ist ein vom Magen sezerniertes Peptid, das die AGRP/NPY-Neuronen aktivieren und damit die Nahrungsaufnahme stimulieren kann. Damit ist ein potentieller molekularer Mechanismus gegeben, der die Signale der langzeitregulierten Energie-Hoömostase und die Signale des kurzzeitig regulierten Mahlzeiten-Rhythmus integriert. Ghsr: Growth hormone secretagogue receptor; Lepr: Leptin-Rezeptor; Mc3r/Mc4r: Melanocortin 3- bzw. 4-Rezeptor; Y1r: Neuropeptid Y1-Rezeptor (Barsh und Schwartz 2002).



**Abb. 1-4: Rolle des arkuaten Kerngebietes des Hypothalamus bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs (nach Schwartz et al. 2000).**

- a) Aktivität der Leptin-sensitiven Signalwege im Hypothalamus bei Leptin/Insulin-Mangel führt zu erhöhter Nahrungsaufnahme und Adipositas.
- b) Erhöhte Spiegel von Leptin/Insulin im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus hemmen den anabolischen NPY/AGRP-Signalweg und stimulieren den katabolischen Signalweg, der in einer verminderten Nahrungsaufnahme und Anorexie resultiert (Schwartz et al. 2000).

Ein hoher Leptin-Spiegel bewirkt über die Aktivierung der POMC/CART-Neuronen eine Stimulation der  $\alpha$ -MSH-Expression und damit eine Reduktion der Nahrungsaufnahme (s. Abb. 1-4; Thornton et al. 1997; Mizuno et al. 1998). Entgegengesetzt dazu induzieren niedrige Leptin-Spiegel im Hungerzustand die NPY/AGRP- und die MCH-Neuronen, was eine erhöhte Nahrungsaufnahme nach sich zieht (s. Abb. 1-4; Qu et al. 1996; Tritos et al. 2001). Mit der Hemmung der orexigenen (z. B. NPY, AGRP) und der Induktion der anorexigenen (z. B.  $\alpha$ -MSH) Neuropeptide nimmt Leptin eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle der hypothalamischen neuronalen Kreisläufe der Gewichtsregulation ein (Übersicht Cone et al. 2001; Übersicht Jequier 2002).

Ein weiteres, die Nahrungsaufnahme regulierendes Hormon, ist Ghrelin, das nicht nur im Gehirn, sondern auch im Magen synthetisiert wird. Die intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Gabe von Ghrelin an Ratten zog eine erhöhte Nahrungsaufnahme und einen verstärkten Gewichtsanstieg nach sich (Tschöp et al. 2000). Die Ghrelin-Spiegel stiegen im Hungerzustand sowohl bei Tieren (Kojima et al. 1999) als auch beim Menschen vor einer Mahlzeit stark an (Cummings et al. 2001, 2002). Ghrelin aktivierte die NPY-Neuronen des arkuaten Kerngebietes im Hypothalamus und initiierte so die Wirkung des NPY im paraventriculären

Hypothalamus (Cowley et al. 2003). Cowley et al. (2003) vermuten, dass Ghrelin so im Hypothalamus die Ausschüttung von orexigenen Peptiden stimulieren könnte, was als ein neuer regulatorischer Kreislauf für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase angesehen werden könnte. Ein erhöhter Ghrelin-Spiegel bei gleichzeitig fallendem Leptinspiegel scheint ein entscheidendes Signal bei der Entstehung von Hunger und damit der Motivation zur Nahrungsaufnahme zu sein (Übersicht Saper et al. 2002).

## 1.6 Beteiligung des Melanin-konzentrierenden Hormon-Systems an der Regulation von Energieaufnahme und –verbrauch

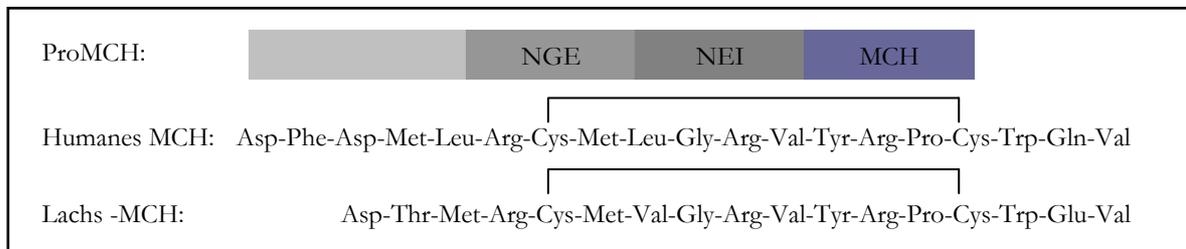
Das melanokortinerge System stellt einen entscheidenden zentralen Signalweg dar, in dem die Bindung des  $\alpha$ -MSH an den Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (s. Abb. 1-4). Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH)-System gehört im Gegensatz dazu zu einem zentralen Signalweg, der entscheidend für die Stimulation der Nahrungsaufnahme ist. Anatomische, physiologische und genetische Daten unterstützen die Hypothese zur Schlüsselrolle des MCH-Systems bei der Stimulation der Nahrungsaufnahme.

### 1.6.1 Hohe Konservierung des MCH bei Wirbeltieren und zentrale Expression

Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH) wurde erstmalig 1983 aus der Lachs-Hypophyse isoliert und sequenziert (Kawauchi et al. 1983). Der Name dieses Hormons leitet sich aus dessen Fähigkeit ab, in den Melanozyten der Fischhaut Melanin anzureichern, womit MCH dem Melanin-verteilenden Effekt des  $\alpha$ -MSH entgegenwirkt (Rance und Baker 1979; Übersicht Baker et al. 1991). Das MCH der Ratte ist ein zyklisches Peptid aus 19 Aminosäuren, das um 2 Aminosäuren länger ist als das des Lachses (Vaughan et al. 1989). Das MCH der Ratte, der Maus und des Menschen sind auf Aminosäure-Ebene identisch (Presse et al. 1990; Breton et al. 1993). Das MCH der Säugetiere besitzt zwei zusätzliche Reste und drei Aminosäureaustausche im Vergleich zum Fisch-MCH, d. h. 14 Aminosäuren der Fisch- und Säugetier-Sequenzen stimmen überein (s. Abb. 1-5; Übersicht Boutin et al. 2002).

Diese hohe Konservierung des MCH während der Evolution der Wirbeltiere spricht für eine entscheidende physiologische Rolle dieses Hormons. Die *MCH* mRNA der Ratte kodiert für einen Precursor aus 165 Aminosäuren, wobei MCH an dessen C-Terminus lokalisiert ist (s. Abb. 1-5; Nahon et al. 1989). Von dem preproMCH (*Pmch*) der Ratte werden neben dem MCH auch das Neuropeptid Glutamat Isoleucin (NEI) und das Neuropeptid Glycin Glutamat

(NGE) kodiert (Abb. 1-5; Nahon et al. 1989; Presse et al. 1990; Bittencourt et al. 1992). MCH entsteht aus dem Precursor-Peptid durch proteolytische Spaltung mittels der Prohormon-Konvertase (Viale et al. 1999). Es hat sich herausgestellt, dass das verkürzte Peptidanalogs, das nur aus Arg<sup>6</sup> und dem cyclischen Disulfid (Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>16</sup>) besteht, ein potenter Agonist mit vergleichbarer Aktivität wie MCH ist (Audinot et al. 2001a; Bednarek et al. 2001).



**Abb. 1-5: Struktur und Sequenz des MCH-Precursors und MCHs (nach Collins und Kym 2003).** Das ProMCH (*Pmcb*) kodiert für MCH sowie zwei Neuropeptide NGE und NEI (Nahon et al. 1989; Presse et al. 1990; Bittencourt et al. 1992). Das Lachs-MCH unterscheidet sich im zyklischen Ring in nur einer Aminosäure von dem humanen und Nager-MCH (Audinot et al. 2001a).

Die *Mcb* mRNA wurde in Neuronen des lateralen Hypothalamus, in der Zona incerta und dem perifornikalen Gebiet mit weit über das Gehirn verteilten Fasern der Ratte gefunden (Skofitsch et al. 1985; Naito 1988; Thompson and Watson 1990; Bittencourt et al. 1992; Presse et al. 1992; Übersicht Nahon 1994; Grillon et al. 1997; Elias et al. 1998; Übersicht Kawano et al. 2002). Der Laterale Hypothalamus einschließlich der perifornikalen Region spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Nahrungsaufnahmeverhaltens (Anand und Brobeck 1951). Die *Mcb* mRNA wurde auch im Paraventriculären Nucleus (PVN) und arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus der Ratte identifiziert (Zamir et al. 1986). Eine ähnliche Verteilung des MCH fand sich auch im Gehirn des Menschen, mit den höchsten Konzentrationen im Hypothalamus (Sekiya et al. 1988). Neuronen, die MCH enthielten, wurden durch Neuronen des arkuaten Kerngebietes des Hypothalamus innerviert (Elias et al. 1998). In peripheren Geweben der Nagetiere (Magen, Darm und Testis) wurde eine niedrige MCH Expression festgestellt (Hervieu und Nahon 1995; Viale et al. 1997). In der hypothalamischen mRNA der Ratte konnte die Sequenz eines weiteren *Mcb* Transkriptes, zusammengesetzt aus den Exons 1 und 3 des Gens, detektiert werden. Die Funktion dieses neuen Proteins MCH(M)-gene(G)-overprinted(O)-polypeptide(P) ist noch weitgehend unbekannt (Toumaniantz et al. 1996, 2000).

## 1.6.2 MCH und die Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase

In zahlreichen Studien wurde ebenso wie durch das Expressionsmuster die entscheidende Rolle des MCH bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase deutlich.

### 1.6.2.1 Effekte des MCH bei Maus und Ratte

Die akute intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von MCH zog aufgrund einer appetitstimulierenden Wirkung eine Erhöhung der Nahrungsaufnahme bei Nagetieren nach sich (Qu et al. 1996; Rossi et al. 1997; Sahu 1998; Ludwig et al. 1998, 2001; Rossi et al. 1999; Suply et al. 2001; Chaffer und Morris 2002; Della-Zuana et al. 2002; Kela et al. 2003). Die chronische i.c.v. Injektion von MCH bei Nagetieren bewirkte eine erhöhte Nahrungsaufnahme und in der Folge eine Zunahme des Körpergewichts (Della-Zuana et al. 2002; Gomori et al. 2003; Ito et al. 2003). MCH erhöhte bei Ratten nach Injektion in den dritten Ventrikel (3vt) nicht nur die Nahrungs- sondern auch die Wasseraufnahme (Clegg et al. 2003).

Die *Mch* mRNA ist im Hypothalamus von *ob/ob*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hochreguliert, wobei Fasten zu einer weiteren Erhöhung der Expression sowohl bei genetisch adipösen *ob/ob*-Mäusen als auch Wildtypmäusen führte (Qu et al. 1996). *Mch* mRNA Spiegel waren ebenso bei hungernden *Ay/a* (Agouti)-Mäusen hochreguliert (Hanada et al. 2000). Die Leptingabe an hungernde Wildtyp- bzw. *ob/ob*-Mäuse blockierte die Erhöhung der MCH-Expression (Tritos et al. 2001). Da die lange Isoform des Leptin-Rezeptors neben dem hauptsächlichsten Vorkommen im medialen Hypothalamus, auch spärlich im lateralen Hypothalamus exprimiert wurde (Elmqvist et al. 1998; Hankansson et al. 1998; Übersicht Elmqvist et al. 1999), vermuten Tritos et al. (2001), dass der Effekt des Leptins nur indirekt auf die MCH Expression ausgeübt und über Signale vom medialen Hypothalamus vermittelt wird. Es existierten Nerven-Fortsätze des arkuaten Kerngebietes, die zum lateralen Hypothalamus führten und das Leptin-Signal zu den MCH exprimierenden Neuronen weiterleiten könnten (Elias et al. 1998).

Ito et al. (2003) versuchten, die Mechanismen aufzuklären, die der MCH-vermittelten Adipositas der Maus zugrunde liegen. Die Autoren schlussfolgerten, dass die aufgrund der Aktivierung der MCH-Signalwege entstehende Adipositas teilweise in der erhöhten Lipogenese in der Leber und im weißen Fettgewebe begründet ist. Andererseits wirkte bei der Ausbildung des adipösen Phänotyps der reduzierte Energieverbrauch im Braunen Fettgewebe mit (Ito et al. 2003). Eine mögliche Rolle von MCH bei der Kontrolle der Energiebilanz über die Hemmung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse vermuten Kennedy et al. (2001). Sie berichteten, dass i.c.v. appliziertes MCH signifikant den Plasma-TSH-Spiegel und ebenso die TRH stimulierte TSH Abgabe in hypophysären Zellkulturen senkte (Kennedy et al. 2001).

Bei Ratten führte die intravenöse Infusion von MCH zu einem dosisabhängigen Anstieg des Insulin-Spiegels um 40-70 %. Dies belegt deutlich eine regulatorische Rolle von MCH im Metabolismus (Tadayyon et al. 2000). In Adipozyten der Ratte stimulierte MCH die *Leptin* mRNA Expression und die Leptin Sekretion, was als ein Rückkopplungs-Effekt auf die MCH-induzierte Nahrungsaufnahme gedeutet werden könnte (Bradley et al. 2000).

Nach Injektion von MCH in die arkuaten, paraventriculären und dorsomedialen Kerngebiete des Hypothalamus von Ratten war die Nahrungsaufnahme erhöht (Abbott et al. 2003). Es ist denkbar, dass diese Stimulierung der Nahrungsaufnahme über die Aktivierung bzw. Hemmung der neuronalen Nahrungskreisläufe, die vom arkuaten zum paraventriculären Kerngebiet verlaufen, vermittelt werden. Denn MCH förderte die Ausschüttung der orexigenen Neuropeptide NPY und AgRP und hemmte die der anorexigenen Neuropeptide  $\alpha$ -MSH und CART aus hypothalamischen Explantaten (Abbott et al. 2003).

Davidowa et al. (2002) stellten signifikant unterschiedliche Effekte des MCH auf die Neuronen des ventromedialen und des arkuaten Kerngebietes des Hypothalamus bei übergewichtigen hyperphagen Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren fest. Bei übergewichtigen Ratten wurden die Neuronen des arkuaten Kerngebietes des Hypothalamus durch das MCH überwiegend aktiviert und die Neuronen des ventromedialen Hypothalamus häufiger gehemmt. Hingegen wurde zwischen normal gefütterten und fastenden Ratten weder in der Reaktion auf MCH noch in der Art der Reaktion von ventromedialen und arkuaten Neuronen des Hypothalamus ein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Autoren vermuten, dass MCH als orexigenes Neuropeptid über eine Aktivierung der NPY-Neuronen im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus die Nahrungsaufnahme fördert und den Energieverbrauch über eine verstärkte Hemmung des ventromedialen Hypothalamus reduziert. Dadurch könnte es zu einem Abdriften der Energiehomöostase zu einem höheren Niveau des Körpergewichts kommen und somit kann eine Beteiligung des MCH auch in der Langzeitregulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts nahe gelegt werden.

Auch der Einfluss von MCH auf die Entstehung von Angst oder Depression könnte indirekt die Nahrungsaufnahme und damit das Körpergewicht beeinflussen. So gibt es einige Studien, die eine Rolle von MCH bei der Entstehung von Angst nahe legen (Gonzalez et al. 1996; Monzon und De Barioglio 1999; Monzon et al. 2001; Borowsky et al. 2002; Kela et al. 2003). Da jedoch sowohl angstauslösende (Gonzalez et al. 1996) als auch angstauflösende (Monzon und De Barioglio 1999; Monzon et al. 2001; Kela et al. 2003) Wirkungen des MCH beschrieben wurden, ist die eindeutige Rolle des MCH bei dieser Erkrankung noch nicht geklärt. Für die sich widersprechenden Ergebnisse könnten u. a. die Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen als auch unterschiedlicher Geschlechter sein. Gonzalez et al. (1996)

verwendeten z. B. weibliche Tiere, während Monzon und De Barioglio (1999), Monzon et al. (2001) als auch Kela et al. (2003) männliche Tiere untersuchten. Es ist jedoch offensichtlich, dass MCH eine gewisse Rolle bei der Modulation der Angst spielt, wobei der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus noch unbekannt ist.

#### 1.6.2.2 Transgene Mäuse

ProMCH (*Pmch*) defiziente Mäuse (*Pmch*<sup>-/-</sup>) hatten ein vermindertes Körpergewicht (24-28 %) und einen verringerten Körperfettgehalt, waren hypophag (fressen 12 % weniger als Wildtyp-Mäuse) und wiesen eine um 20 % höhere metabolische Rate auf (Shimada et al. 1998). Die orexigenen Neuropeptide, die im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus (NPY, AGRP) und im lateralen Hypothalamus (Orexin) exprimiert werden, wiesen keine veränderten Expressionsraten auf. Im Gegensatz dazu waren sowohl die POMC-Expression im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus als auch die Leptinspiegel erniedrigt. Möglicherweise sind diese geringen Spiegel des anorexigen wirksamen POMC bzw. Leptins Ausdruck eines Kompensationsmechanismus auf die verminderte Nahrungsaufnahme bzw. das geringere Körpergewicht (Shimada et al. 1998).

Im Gegensatz dazu wiesen transgene Mäuse mit einer Überexpression des pro-MCH Gens (*Pmch*) im lateralen Hypothalamus Übergewicht als Folge einer Hyperphagie auf, wenn ihnen eine Diät mit hohem Fettanteil angeboten wurde. Sie waren somit für eine Diät-Induzierte Adipositas empfänglich. Diese Mäuse zeigten weitere phänotypische Merkmale wie Hyperleptinämie, Hyperglucosämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz (Ludwig et al. 2001).

Die Generierung einer Doppel-Knockout Maus (*Pmch*<sup>-/-</sup> *ob/ob*-Maus), bei der sowohl das Leptin-Gen (*obese*) als auch das pro-MCH Gen (*Pmch*) ausgeschaltet worden waren, sollte die Hypothese bestätigen, dass die Adipositas der *ob/ob*-Maus durch Ausbleiben der Hochregulation der MCH-Expression und damit der erhöhten Nahrungsaufnahme abgeschwächt wird (Segal-Lieberman et al. 2003). Die Adipositas der *ob/ob*-Maus war bei den *Pmch*<sup>-/-</sup> *ob/ob*-Mäusen abgeschwächt, was sich in einem verminderten Körpergewicht (im Alter von 12 Wochen 21,6 % weniger als die *ob/ob*-Mäuse) und einem verminderten Fettgehalt (im Alter von 16 Wochen 44,7% im Gegensatz zu 55,8% der Gesamtkörpermasse bei *ob/ob*-Mäusen) zeigte. Dies wurde jedoch nicht durch eine verminderte Nahrungsaufnahme, sondern durch eine Erhöhung der metabolischen Rate (Erhöhung des Ruheumsatzes, der in den Perioden der Inaktivität gemessen wurde) um etwa 25% im Vergleich zu den *ob/ob*-Mäusen und eine Erhöhung der physischen Aktivität (die Doppel-Knockout-Mäuse haben kürzere Ruhephasen mit durchschnittlich 2,6 h im Gegensatz zu den *ob/ob*-Mäusen mit durchschnittlich 16,8 h)

verursacht. Die Hyperphagie blieb unverändert, vermutlich durch die Aktivierung anderer orexigener Neuropeptide wie NPY oder AGRP. Neben dieser sehr wichtigen Rolle des MCH bei der Regulation des Energieverbrauchs, scheint MCH auch einen Einfluss auf die Temperaturregulation zu haben (Segal-Lieberman et al. 2003).

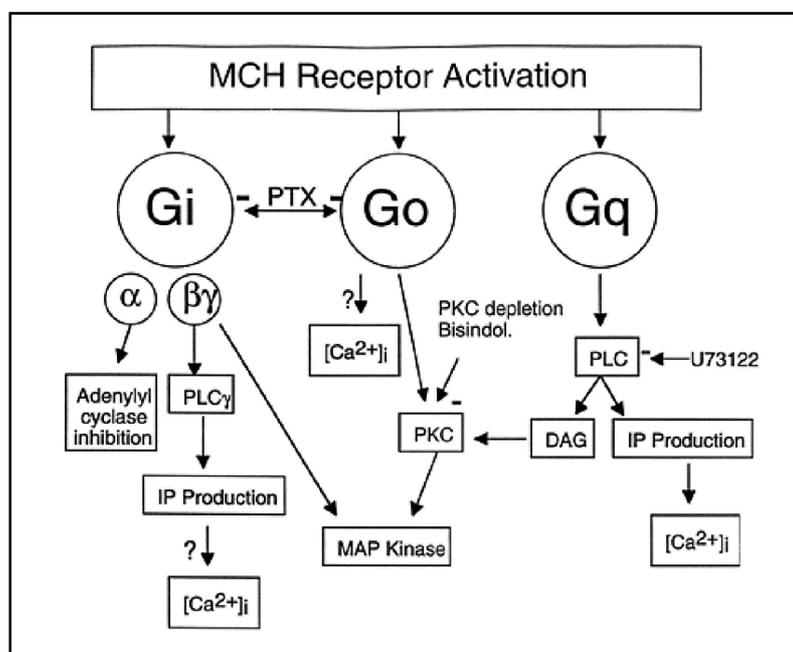
### 1.6.3 Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons (MCHR1)

#### 1.6.3.1 Charakteristik und Liganden des MCHR1

Für weitere Erkenntnisse zur physiologischen Funktion des orexigenen Neuropeptids MCH war die Identifizierung des MCHR1 als einen der beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die MCH mit nanomolarer Affinität binden (Bächner et al. 1999; Chambers et al. 1999; Lembo et al. 1999; Saito et al. 1999; Shimomura et al. 1999) ein entscheidender Schritt. Der MCHR1 war über verschiedene Spezies, wie Ratte (Übersicht Saito et al. 2000), Maus, Katze, Hund, Hase, Kuh, Schwein, Affe und Mensch konserviert (Tan et al. 2002). Die Protein-Identität zwischen allen MCHR1 Orthologen war mit > 95 % sehr hoch (Tan et al. 2002).

Als G-Protein-gekoppelter Rezeptor besteht der MCHR1 aus sieben hydrophoben Transmembran-Domänen. Die Bindung von Agonisten an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren resultiert in der Aktivierung einer oder mehrerer Klassen von G-Proteinen, die zahlreiche intrazelluläre Signal-Übertragungswege regulieren (Übersicht Neves et al. 2002). G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bestehen und entsprechend der Signal-Charakteristika ihrer  $G_\alpha$ -Untereinheit eingeteilt werden (Hawes et al. 2000). Die über 20 ausgeprägten  $G_\alpha$ -Untereinheiten werden in vier Klassen eingeteilt:  $G_s$ ,  $G_i/G_o$ ,  $G_q/11$  und  $G_{12/13}$  (Übersicht Simon et al. 1991; Übersicht Gudermann et al. 1997; Übersicht Gutkind 1998; Übersicht Hamm 1998). Die MCH-vermittelte Aktivierung des MCHR1 aktivierte verschiedene G-Proteine -  $G_s$ - (Pissios et al. 2003),  $G_i$ -,  $G_o$  und  $G_q$ -Typen - und reguliert damit unterschiedliche intrazelluläre Signalwege (s. Abb. 1-6; Hawes et al. 2000). MCH stimulierte die Bildung von Arachidonsäure, hemmte die forskolinstimulierte intrazelluläre cAMP Akkumulierung, induzierte einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, erhöhte die Inositol-Phosphat-Spiegel, aktivierte die Mitogen-aktivierte Proteinkinase sowie die p44/42 MAP-Kinase und pp70 S6 Kinase (Bächner et al. 1999; Chambers et al. 1999; Lembo et al. 1999; Saito et al. 1999; Übersicht Saito et al. 2000; Hawes et al. 2000; Suply et al. 2001; Bradley et al. 2002; Takekawa et al. 2002).

MCH aktivierte ERK einerseits direkt über den Pertussistoxin-abhängigen  $G_i$ -Signalweg. Andererseits konnte MCH auch synergistisch mit Aktivatoren der Adenylatcyclase, z. B. Forskolin oder Isoproterenol, die ERK aktivieren (4-fach höher), was nicht durch Pertussistoxin beeinflusst wurde. Das legt nahe, dass der synergistische Effekt nicht über den  $G_i$ -sondern über den  $G_q$ -Signalweg vermittelt wurde. Da aber die Bindung des MCHR1 an  $G_q$ -Proteine nicht ausreichend für die Aktivierung der ERK ist, müssen Wechselwirkungen zwischen den  $G_q$ - und den  $G_s$ -Signalwegen existieren, um die Wirkung des MCH zu amplifizieren (Pissios et al. 2003). Die Autoren konnten bei der Verwendung von *ex vivo* Gehirnschnitten eine Aktivierung der ERK durch MCH in olfaktorischen Regionen beobachten. Auch bei der Kombination von MCH mit Forskolin war ein additiver Effekt auf die ERK Phosphorylierung in derselben Region nachweisbar (Pissios et al 2003).



**Abb. 1-6: Modell der intrazellulären Signalwege, die an die Aktivierung des MCHR 1 in CHO-MCHR-Zellen gekoppelt sind (nach Hawes et al. 2000).** Der MCHR bindet an  $G_i$ ,  $G_o$  und  $G_q$ -Proteine. Eine  $G_i$ -Aktivierung bewirkt eine Verminderung der Adenylylcyclase-Aktivität und reduziert die cAMP-Produktion. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheit der  $G_i$ -Proteine vermittelt einen Teil der MCH-stimulierten MAP-Kinase-Aktivität.  $G_i$  kann auch einen Teil der MCH-stimulierten IP-Produktion und Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ -Ionen vermitteln.  $G_o$  vermittelt einen Teil der MCH-stimulierten MAP-Kinase und kann auch eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  vermitteln.  $G_q$  vermittelt einen Teil der MCH-stimulierten IP-Produktion und eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$ . PTX hemmt die Aktivität von  $G_i$  und  $G_o$ . Die PKC-Aktivität wird durch Bisindolmaleimid oder eine anhaltende Vorbehandlung mit PMA blockiert. U73122 hemmt die PLC-Aktivität (Hawes et al. 2000).

Mehrere Struktur-Aktivitäts-Studien wurden mit verschiedenen Liganden, die mit dem humanen (Macdonald et al. 2000; Audinot et al. 2001a und 2001b) und Ratten-MCHR1 (Kokkotou et al. 2000, Suply et al. 2001) interagieren, durchgeführt. Asp<sup>123</sup> in der dritten

Transmembrandomäne des MCHR1 sowie Arg<sup>11</sup> des MCH-Peptides waren entscheidend für Ligand-Rezeptor-Bindung (Macdonald et al. 2000). 57 MCH-Analoga wurden bezüglich der Hemmung der forskolin-stimulierten cAMP Bildung und der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTPgammaS untersucht [Audinot et al. 2001a]. Dabei konnte die für die vollständige agonistische Wirkung auf die cAMP-Bildung und [<sup>35</sup>S]GTPgammaS Bindung erforderliche minimale Sequenz des MCH (MCH<sub>6-17</sub>) ermittelt werden. Ebenso entwickelten die o. g. Autoren durch Austausch einiger Aminosäuren des MCH und Ersetzen einer Disulfidbrücke durch eine Stickstoffbrücke drei Substanzen mit antagonistischen Eigenschaften. Suply et al. (2001) untersuchten einige der 57 MCH-Analoga (Audinot et al. 2001a) bezüglich ihrer funktionellen Aktivität (Hemmung des intrazellulären cAMP) und ihrer Bindungsaffinität am MCHR1 der Ratten *in vitro* sowie ihrer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme nach i.c.v. Injektion der Ratte. Dabei wurde deutlich, dass zwischen den Effekten der MCH-Analoga auf die Nahrungsaufnahme und den Ergebnissen, die mit dem rekombinierten Ratten-MCHR erzielt wurden, eine gute Korrelation bestand. Dies bestätigt noch einmal, dass MCH die Nahrungsaufnahme über den MCHR1 beeinflusst (Suply et al. 2001).

Der MCHR1 wies in seinem extrazellulären N-terminalen Ende drei Konsensusstellen für eine Asparagin-gekoppelte Glycosylierung (Asn-X-Ser/Thr) auf, die ein gemeinsames Kennzeichen vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren darstellt (Lakaye et al. 1998). Saito et al. (2003) stellten am MCHR1 der Ratte fest, dass dieser an diesen drei Stellen tatsächlich glycosyliert wurde. Bei der Untersuchung der funktionellen Rolle dieser N-Glycosylierungsstellen durch Entfernung dieser Stellen mittels „site-directed mutagenesis“ fanden sie heraus, dass das Asparagin an Position 23 des Ratten-MCHR1 entscheidend für die Expression an der Zelloberfläche, für die Ligandenbindung und die Signaltransduktion war (Saito et al. 2003).

Auch weitere in Frage kommende Peptide wurden auf ihre Affinität zum MCHR1 getestet: z. B. die durch *Pmch* kodierten Neuropeptide das Neuropeptid Glutamat Isoleucin (NEI) und das Neuropeptid Glycin Glutamat (NGE) (Nahon et al. 1989; Presse et al. 1990; Bittencourt et al. 1992) oder die durch alternatives Splicen aus dem *Pmch* hervorgehenden potentiell bioaktiven Peptide „MCHgene-overprinted peptides“ (MGOP) 14 und 27 (Toumaniantz et al. 1996); keines dieser Peptide aktivierte den MCHR1 (Chambers et al. 1999, Saito et al. 1999, Hawes et al. 2000). Ebenso beeinflussten NGE und NEI nach ihrer i.c.v. Injektion bei Ratten nicht die Nahrungsaufnahme (Tritos et al. 1998), was die Befunde von Nahon et al. (1989) zur fehlenden Affinität dieser Peptide zum MCHR1 bestätigte.

Die Suche nach MCHR1-Antagonisten für die Entwicklung möglicher Medikamente, die die Nahrungsaufnahme und damit Gewichtszunahme hemmen, wird intensiv von der Pharmaindustrie betrieben. Der von der Pharmafirma Takeda entwickelte MCHR1-Antagonist T-226296 hemmt effektiv die Nahrungsaufnahme, die durch eine hohe Dosis (5 µg/5µl) bei Ratten i.c.v. verabreichtes MCH stimuliert worden war (Takekawa et al. 2002).

Die chronische i.c.v. Gabe eines MCHR1-Agonisten an Ratten über 14 Tage führte zu einem adipösen Phänotyp mit einer um 23 % erhöhten Nahrungsaufnahme, erhöhter kalorischer Effizienz und Körpergewichtszunahme um 38 % im Vergleich zu den Kontrolltieren (Shearman et al. 2003). Ebenso konnte ein Anstieg des Insulin- und Leptin-Spiegels beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte die chronische Gabe eines MCHR1-Antagonisten zu einer anhaltenden Verminderung der Nahrungsaufnahme um 16 %, der Körpergewichtszunahme (-35 %) und der Körperfettzunahme im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, ohne Effekte auf die Lean body mass. Dies zeigt, dass die Hemmung des MCHR1 durch Antagonisten ein effektiverer Ansatz sein kann, um Adipositas zu behandeln (Shearman et al. 2003).

Die Pharmafirma Synaptic entwickelte eine Familie von hochaffinen MCHR1-Antagonisten, die eine bis zu mehr als 1000fache Selektivität für MCHR1 aufwiesen im Vergleich zu MCHR2 und anderen GPCRs, die mit Nahrungsaufnahme verbunden sind, wie z. B. 5-Hydroxytryptamin 2C (5-HT<sub>2c</sub>), Galanin und NPY (Borowsky et al. 2002). Der gegenwärtig interessanteste und vielversprechendste MCHR1-Antagonist ist der SNAP-7941. Dieser Antagonist hemmte die Nahrungsaufnahme von Ratten, die durch vorhergehende MCH-Stimulation (3 nmol) ausgelöst wurde. Nicht nur die akute, sondern auch die chronische Gabe von SNAP-7941 an Ratten mit diät-indizierter Adipositas (DIO) führen zu einem deutlichen und anhaltenden Gewichtsverlust (26 %) aufgrund von Hypophagie. Ebenso bewirkte SNAP-7941 eine Hemmung des Appetits und der Aufnahme von schmackhafter Nahrung (Borowsky et al. 2002). Da die chronische MCHR1-Blockade durch SNAP-7941 nur zu einer moderaten Verminderung der Nahrungsaufnahme, aber zu einer kontinuierlichen Reduzierung des Körpergewichts bis zum Ende der Behandlung mit dem Antagonisten führte, wird bei dem Effekt des SNAP-7941 auf das Körpergewicht eine Rolle für den Energieverbrauch vermutet (Übersicht Forray 2003). Zusätzlich wirkt dieser Antagonist bei Ratten und Meerschweinchen wie handelsübliche Antidepressiva und Anxiolytika (Borowsky et al. 2002). Dies steht im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Beobachtung der angstauflösenden Wirkung von MCH (Monzon und De Barioglio 1999; Monzon et al. 2001; Kela et al. 2003), unterstützt aber die Befunde über eine angstauflösende Wirkung von MCH (Gonzalez et al. 1996; s. u. 1.6.2.1). Weitere Studien zur Klärung der Rolle des MCH bei der Beeinflussung der Angstentstehung oder -auflösung sind erforderlich. Kürzlich wurde von Synaptic ein signifikanter

Gewichtsverlust nach Gabe dreier verschiedener MCHR1-Antagonisten über 3 Tage berichtet, die auch Aktivitäten bei Test-Modellen mit Angst bzw. Depressivität sowie bei Test-Modellen für die Blasenfunktion aufwiesen (SYNAPTIC PHARM CORP: Marzabadi et al. 2003). Die Erfolge dieser *in vivo* getesteten MCHR1-Antagonisten bei der Gewichtsreduktion lassen hoffen, dass dessen weitergehende Entwicklung sowie dessen Anwendung im klinischen Bereich hilfreich bei der Behandlung von Adipositas sein werden (Collins und Kym 2003). Auch der Hinweis auf eine Beteiligung des MCH-Systems an psychischen Erkrankungen wie Depression oder Angstzuständen erhöht für die Pharmaindustrie die Attraktivität der Entwicklung von Antagonisten für den MCHR1 (Collins und Kym 2003).

#### 1.6.3.2 Zentrale Expression des MCHR1

Bei Nagetieren wird der *Mchr1* in verschiedenen Hirn-Regionen exprimiert, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichts und der sensorischen Verarbeitung von Geruchs- und Geschmacks-Reizen beteiligt sind. Hohe *Mchr1* mRNA Spiegel wurden im Gehirn in der olfaktorischen Region im Hippocampus und im medialen Nucleus accumbens gefunden (Lembo et al. 1999; Saito et al. 1999, 2001; Hervieu et al. 2000; Kokkotou et al. 2001; Übersicht Saper et al. 2002; Hervieu 2003). Möglicherweise spielt der MCHR1 eine Rolle bei der Erstellung bzw. dem Abruf eines olfaktorischen Gedächtnisses, das mit einem bestimmten Ereignis des Ernährungsverhaltens verbunden ist (Übersicht Saito et al. 2000).

Über die Verbindung von MCH Neuronen zum Nucleus accumbens könnte MCH einen Einfluss auf die „Belohnungs“-Aspekte der Ernährung haben, an denen der Nucleus accumbens beteiligt zu sein scheint (Übersicht Saper et al. 2002). So könnte MCH über eine Aktivierung des Nucleus accumbens eine Rolle bei der Erhöhung des Lustwertes von Nahrung spielen (Übersicht Saper et al. 2002) und somit das Nahrungsaufnahmeverhalten verändern (Übersicht DiLeone et al. 2003). DiLeone et al. (2003) vermuten im Zusammenhang mit der Expression des *MCHR1* im Nucleus accumbens auch eine entscheidende Beteiligung des MCH am Suchtverhalten.

Ebenso wurde eine *MCHR1* mRNA Expression in den Nuclei des ventromedialen, dorsomedialen, paraventriculären, lateralen sowie im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus festgestellt – neuronale Regionen, die die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht regulieren (Bittencourt et al. 1992; Kolakowski et al. 1996; Elias et al. 1998; Chambers et al. 1999; Lembo et al. 1999; Saito et al. 1999, 2001; Hervieu et al. 2000; Kokkotou et al. 2001; Suply et al. 2001; Hervieu 2003). Die *MCHR1* Expressionsmuster stimmten überwiegend mit MCH Immunoreaktivitäten als auch mit monosynaptischen Verbindungen der MCH-Neuronen überein (Bittencourt et al. 1992). Die Expressionsorte des *MCHR1* implizieren somit eine

Funktion des MCHR1 bei der Vermittlung des MCH-Effekts auf den Appetit, die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht und den Energiestoffwechsel. Ebenso implizieren die Expressionsorte des *MCHR1* eine Funktion des MCH bei der Integrierung von Geschmack und Geruch und von positiven Belohnungsaspekten von Hunger und Sättigung (Collins und Kym 2003). Bei Nagetieren wurde *Mchr1* mRNA peripher in niedrigeren Konzentrationen in Auge, Zunge, Niere, Skelettmuskel, Adipozyten, Schilddrüse, Haut und den  $\beta$ -Zellen des Pankreas detektiert (Saito et al. 1999; Bradley et al. 2000; Suply et al. 2001; Kokkotou et al. 2001; Hoogduijn et al. 2002).

#### 1.6.4 Identifizierung des MCHR2 und seine Charakterisierung

Kürzlich wurde durch sechs Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein zweiter Rezeptor des MCH (MCHR2) beschrieben, der mit hoher Affinität MCH bindet (An et al. 2001; Hill et al. 2001; Mori et al. 2001; Rodriguez et al. 2001; Sailer et al. 2001; Wang et al. 2001).

Er weist die höchste Homologie zu dem oben genannten MCHR1 auf (35-38 %), wobei eine 44 %ige Identität der Aminosäuren in den Transmembrandomänen besteht (An et al. 2001; Wang et al. 2001; Sailer et al. 2001; Hill et al. 2001). Der MCHR2 besteht aus 340 Aminosäuren und wird durch 6 Exons kodiert (Rodriguez et al. 2001; Wang et al. 2001; Sailer et al. 2001; Hill et al. 2001). *MCHR2* ist auf Chromosom 6q16 lokalisiert (Sailer et al. 2001). Kürzlich wurden zytogenetische Strukturveränderungen (Translokation) in der Chromosomen-Region 6q16 in Verbindung mit einem adipösen Phänotyp berichtet (Holder et al. 2000; Übersicht Gilhuis et al. 2000). Der MCHR2 scheint hauptsächlich an die  $G_q$ -gekoppelten Signalwege gebunden zu sein (Sailer et al. 2001; Wang et al. 2001).

Die aus dem *Pmch* hervorgehenden Peptide MGOP, NEI und NGE scheinen, ebenso wenig an den MCHR1 auch nicht an MCHR2 gebunden zu werden (Sailer et al. 2001; Übersicht Boutin et al. 2002; Übersicht Saito et al. 2000).

Auch die *MCHR2* mRNA ist sowohl peripher im Fettgewebe und im Pankreas (An et al. 2001) als auch in hohen Konzentrationen zentral in Cortex, Hypophyse, Hypothalamus und Hippocampus nachweisbar (Wang et al. 2001; An et al. 2001; Hill et al. 2001; Sailer et al. 2001). *MCHR2* wird somit ebenfalls hauptsächlich in solchen Gehirnregionen exprimiert, die an der Regulation der Energiebilanz beteiligt sind. Hill et al. (2001) fanden zusätzlich eine hohe Expression des *MCHR2* im Fettgewebe; dies steht im Gegensatz zum *MCHR1*. In der Peripherie konnte *MCHR2* ebenfalls in geringen Mengen in den Testes nachgewiesen werden (Mori et al. 2001). Aufgrund der Unterschiede im Expressionsmuster von *MCHR1* und *MCHR2* wird vermutet, dass MCHR2 in andere Funktionen des MCH, die nicht das

Ernährungsverhalten betreffen, eingebunden ist (Collins und Kym 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass mehrere Säugetierspezies keinen funktionsfähigen MCHR2 besitzen (Maus, Ratte) oder nur ein funktionsloses *MCHR2* Pseudogen besitzen (Meerschweinchen, Hase), während sie eine messbare *MCHR1* Expression aufweisen; lediglich bei Hund, Rhesusaffe und Frettchen fand sich ein funktionsfähiger Rezeptor 2 des MCH (Tan et al. 2002).

### 1.6.5 Beteiligung des MCHR1 an Energieaufnahme bzw. -verbrauch

#### 1.6.5.1 MCHR1 bei Maus und Ratte

Die *MCHR1* Expression war bei hungrigen und *ob/ob*-Mäusen signifikant erhöht und wurde durch Leptin-Gabe gehemmt. Infolgedessen könnte der MCHR1 ein mögliches Ziel der zentralen Leptin-Wirkung darstellen und eine entscheidende Rolle im Nahrungsverhalten und in der Energiebilanz spielen (Kokkotou et al. 2001).

#### 1.6.5.2 MCHR1 Knockout-Mäuse

Sowohl die *Pmch*<sup>-/-</sup> als auch die *Mchr1*<sup>-/-</sup> defizienten Mäuse wiesen eine reduzierte Fettmasse und eine erhöhte metabolische Rate auf (Shimada et al. 1998; Chen et al. 2002; Marsh et al. 2002). Während Marsh et al. (2002) ein ähnliches Körpergewicht von *Mchr1*<sup>-/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund) und Wildtyp-Maus beschrieben, berichteten Chen et al. (2002) ein reduziertes Körpergewicht bei *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (129/B6 Hintergrund). Zusätzlich waren die *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse weniger empfänglich (Marsh et al. 2002) oder resistent für Diät-induzierte Adipositas (Chen et al. 2002). Die Ausschaltung des *MCHR1* übte bei männlichen einen stärker ausgeprägten Effekt auf das Körpergewicht und den Körperfett-Gehalt als bei weiblichen Mäusen aus (Chen et al. 2002). Bei Fütterung einer fettreichen Diät zeigten die männlichen *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Reduktion des Körpergewichts sieben Wochen früher und ebenso eine stärker ausgeprägte Reduktion der Fettmasse (50% vs 30% in der 15. Woche) als die weiblichen *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Dies konnte nicht aus einer verminderten Nahrungsaufnahme resultieren, weil die weiblichen (15 %) und die männlichen knockout-Tiere (20 %) mehr Kalorien pro Einheit Körpergewicht als die Wildtyp-Tiere aufnahmen. Deshalb könnte die Reduktion des Körpergewichts und des Körperfetts darin begründet sein, dass einerseits die Energieeffizienz (Körpergewichtszunahme pro Kilokalorie Nahrungsaufnahme) bei den männlichen Knockout Mäusen herabgesetzt, die metabolische Rate aufgrund eines erhöhten Energieverbrauchs erhöht und die körperliche Aktivität der männlichen *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse leicht erhöht ist (Chen et al. 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass MCHR1 die Effekte des MCH auf die Energiehomöostase vermittelt (Übersicht Forray 2003).



Bächner et al. (2002) identifizierten ein bei Maus, Ratte und Mensch hochkonserviertes MCHR1-interagierendes Zink-Finger-Protein (MIZIP). Da MIZIP in vielen Geweben, v. a. im Gehirn, mit *MCHR1* ko-exprimiert wird und mit dem C-Terminus des MCHR1 interagiert, wird von den Autoren vermutet, dass MIZIP in die MCHR1-Funktion als regulatorisches Molekül involviert ist (Bächner et al. 2002).

MCH wird über die Bindung an den MCHR1 als Vermittler der Nahrungsaufnahme und der Senkung des Energieverbrauchs als Reaktion auf die Signale aus dem arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus verstanden, welcher wiederum die Signale aus der Peripherie über Ernährungs- und Hunger bzw. Sättigung verarbeitet (s. Abb. 1-7; Schwartz und Gelling 2002). Es existieren auch weitere Hypothesen, die von einer Aktivierung der NPY/AGRP-Neuronen im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus und von einer Hemmung des  $\alpha$ -MSH und CART bzw. des ventromedialen Hypothalamus ausgehen. Aus der beschriebenen entscheidenden Rolle des Melanin-konzentrierenden Hormon-Systems für die Adipositas und weitere Erkrankungen ergibt sich die Notwendigkeit, dieses System zum Ziel einer intensiven Forschung über die medikamentöse Therapierbarkeit zu machen.

## 1.7 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das Kandidatengen *Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons (MCHR1)* in Hinblick auf eine mögliche Beteiligung an der Regulation des Appetits, der Nahrungsaufnahme, des Energiestoffwechsels und damit insgesamt an der Gewichtsregulation sowie der Entstehung von Adipositas untersucht werden. *MCHR1* wurde in Studiengruppen aus deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen und ihren Eltern sowie deutschen über-, normal- und untergewichtigen Studenten analysiert.

Mit der Erzielung signifikant positiver Ergebnisse sollte der Hinweis auf die funktionelle Relevanz des MCHR1 bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiestoffwechsel über funktionelle Studien durch Kooperationspartner untermauert werden.

Zusätzlich sollte die Typisierung eines Missense-SNP des *MCHR1* für den Versuch der Bestätigung der positiven Ergebnisse über die Typisierung in weiteren Population bzw. Ethnien erfolgen. Es wurden Stichproben aus Deutschland, Dänemark, Frankreich und Amerika untersucht. Die Genotypisierungen wurden teilweise von den Kooperationspartnern selbst übernommen.

Die Ziele waren im speziellen:

### I) eigene Arbeiten:

- 1) Mutationsscreening des *MCHR1*-Locus
  - a) Ermittlung der genomischen Organisation
  - b) Untersuchung der kodierenden Region, des Introns und der ersten 317 bp der 5' Region auf mögliche Mutationen und Polymorphismen mittels SSCP und dHPLC
  - c) Identifizierung von Varianten mittels Sequenzierung von DNA-Proben mit auffälligen SSCP- bzw. dHPLC-Mustern
- 2) Typisierung neu detektierter bzw. bekannter Polymorphismen bei adipösen Probanden und ihren Eltern sowie bei über-, normal- und untergewichtigen Kontroll-Personen mittels entsprechender Methoden (SSCP, PCR-RFLP oder Tetra-Primer ARMS-PCR) für Assoziationsstudien und gegebenenfalls Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT)
- 3) Typisierung von einem SNP mittels PCR-RFLP in einer weiteren deutschen Studiengruppe aus Berlin und einer dänischen Studiengruppe für den Versuch der Bestätigung der unter 2) erzielten Assoziations- und TDT-Ergebnisse

### II) Von Kooperationspartnern durchgeführte Arbeiten:

- 4) Mutationsscreening des *MCHR1*-Locus
  - a) Ermittlung der genomischen Organisation
  - b) Sequenzierung der kodierenden Region, des Introns und von 9,8 kb der 5' Region
- 5) Expressionsanalysen
- 6) Durchführung von funktionellen *in vitro* Studien
  - a) Promoterstudien mittels eines Luziferase Assays
  - b) Assays zur Bestimmung der Inositolphosphat- und cAMP-Akkumulierung in der Zelle
  - a) Oberflächenexpressions-Assay
- 7) Schätzung des individuellen und epidemiologischen Risikos
- 8) Phänotyp orientierte *post hoc* Tests aufgrund der beschriebenen Phänotypen und der geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der *MCHR1*<sup>-/-</sup> Maus
  - a) physische Aktivität
  - b) prozentualer Körperfettgehalt
  - c) prozentualer Fett-Anteil an der Gesamt-Energieaufnahme
- 9) Typisierung von einem bzw. zwei SNPs mittels PCR-RFLP in einer weiteren deutschen Studiengruppe (KORA), einer Studiengruppe aus Frankreich und einer aus den USA für den Versuch der Bestätigung der unter 2) erzielten Assoziations- und TDT-Ergebnisse.

## 2 Material

### 2.1 Untersuchungsmaterial und Probandenkollektive

Als Untersuchungsgut wurde EDTA-Blut eingesetzt.

#### 2.1.1 Rekrutierung der Probanden

Für die vorliegenden Studien wurden Probanden und gegebenenfalls deren Eltern und Geschwister durch Mitarbeiter der Klinischen Forschergruppe aus verschiedenen Orten der Bundesrepublik rekrutiert (Übersicht Hinney et al. 1997):

- (1) Klinik Hochried, Murnau (Spezialklinik zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas): extrem adipöse Kinder und Jugendliche.
- (2) Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA, Berchtesgaden (Langzeittherapie für Jugendliche mit extremer Adipositas): extrem adipöse Kinder und Jugendliche.
- (3) Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität, Marburg: extrem adipöse Kinder und Jugendliche, unter-, normal- und übergewichtige Studenten der Philipps-Universität.
- (4) Spessartklinik Bad Orb: extrem adipöse Kinder und Jugendliche.

Mit den extrem adipösen Kindern und Jugendlichen und gegebenenfalls ihren Eltern und Geschwistern wurden durch Mitarbeiter der Klinischen Forschergruppe Interviews zur Gewichtsanamnese, Erfassung soziodemographischer Daten und organischer Erkrankungen durchgeführt. Jeder Patient wurde über Zweck und Ziel der Studien der Klinischen Forschergruppe anhand eines Informationsblattes aufgeklärt und unterzeichnete eine Einverständniserklärung seiner Teilnahme. Bei Minderjährigen wurde diese von mindestens einem Erziehungsberechtigten eingeholt. Die personenbezogenen Daten wurden verschlüsselt und werden gemäß dem gültigen Datenschutzgesetz verwahrt. Ein positives Votum zur Durchführung der Studie liegt von der Marburger Ethik-Kommission vor.

#### *Kriterien für die Aufnahme in die Studie*

Für die Aufnahme der Probanden in die Studiengruppen galten, unabhängig von der Gewichtsklasse folgende Kriterien:

- (1) Ausschluss organischer Erkrankungen, die das Körpergewicht beeinflussen
- (2) Ausschluss einer Dauermedikation, die das Körpergewicht beeinflusst (ausgenommen Kontrazeptiva)
- (3) maximaler Zigarettenkonsum von 10 Zigaretten täglich

Für die einzelnen Studiengruppen existieren jeweils folgende zusätzliche Aufnahme-Kriterien:

- Adipositas (Kinder und Jugendliche): extreme Adipositas (BMI  $\geq$  97. Perzentile)
- untergewichtige Kontrollgruppe: BMI  $\leq$  15. Perzentile
- normalgewichtige Kontrollgruppe: BMI  $\geq$  40. und  $\leq$  60 Perzentile
- übergewichtige Kontrollgruppe: BMI  $\geq$  90. Perzentile

Untersucht wurden weiterhin die Eltern der extrem adipösen Kinder und Jugendlichen; für sie galten keine einschränkenden Kriterien für die Rekrutierung. Von der Familienuntersuchung ausgeschlossen wurden Familien, bei denen Vater- und/oder Mutterschaft nicht mit den Vererbungsregeln nach Mendel vereinbar waren. Dies wurde mittels vorangegangener Typisierungen von SNPs und Mikrosatelliten überprüft.

### 2.1.2 Studiengruppen

Die für *MCHR1* untersuchten Studiengruppen der Klinischen Forschergruppe sind in Tab. 2-1 dargestellt.

**Tab. 2-1: Darstellung der Studiengruppen**

Studiengruppe	Anzahl gesamt	Anzahl geschlechts- getrennt	Mittlerer BMI (kg/m <sup>2</sup> )	BMI- Perzentile	Mittleres Alter (Jahre)
1. extrem adipöse Kinder und Jugendliche	620	359 (w) 261 (m)	33,4 $\pm$ 6,6	99,3.	14,0 $\pm$ 2,7
1a) extrem adipöse Kinder und Jugendliche*	215	127 (w) 88 (m)	39,8 $\pm$ 5,3	$\geq$ 90.	15,3 $\pm$ 2,4
1b) Trios (extrem adipöse Kinder mit Eltern)**	525	304 (w) 221 (m)	32,2 $\pm$ 6,0	$\geq$ 90.	13,7 $\pm$ 2,8
2. untergewichtige Studenten	230	110 (w) 120 (m)	18,3 $\pm$ 1,1	$\leq$ 15.	25,2 $\pm$ 3,7
3. normalgewichtige Studenten	96	49 (w) 47 (m)	21,9 $\pm$ 1,1	$\geq$ 40. $\leq$ 60.	24,7 $\pm$ 2,6
4. übergewichtige Studenten	99	51 (w) 48 (m)	29,1 $\pm$ 3,4	$\geq$ 90	25,3 $\pm$ 3,7

\* ist eine Untergruppe der Studiengruppe 1, sie geht auch in die Gruppe 1b ein; \*\* die adipösen Kinder und Jugendlichen bilden eine Untergruppe der Studiengruppe 1

Die Probandenkollektive der für den Versuch der Bestätigung der positiven Ergebnisse herangezogenen Studiengruppen aus Berlin, München, Kopenhagen, Paris und Philadelphia werden im folgenden beschrieben:

5. Berlin: Zufällige Stichprobe von 196 (98 weiblichen) nicht verwandten deutschen adipösen Kindern (BMI  $\geq$  90. Perzentile), die sich in der Poliklinik für pädiatrische Endokrinologie des Kinderkrankenhauses der Berliner Charité im Jahr 2001 vorgestellt hatten. Als Kontrollgruppe wurden 99 (57 weibliche) nicht verwandte normalgewichtige Säuglinge mit angeborenem endokrinen Störungen, die ebenso in der Poliklinik für pädiatrische Endokrinologie des Kinderkrankenhauses der Berliner Charité vorgestellt wurden, herangezogen.
6. KORA: 4056 deutsche Individuen (2030 Frauen), die im Rahmen der epidemiologischen Studie „*Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg*“ (KORA; Filipiak et al. 2001) von Oktober 1999 bis April 2001 rekrutiert worden sind und die bevölkerungsrepräsentativ für die Altersspanne von 25 bis 74 Jahren für die Stadt und die Region Augsburg (Bayern, Deutschland) sind. Diese Personen repräsentieren alle BMI-Perzentilen in einem Bereich von  $\leq$  10. bis  $\geq$  95. Perzentile. Die initialen Analysen basierten auf dem Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen derjenigen Probanden mit einem BMI  $>$  90. Perzentile und  $\leq$  50. Perzentile. *Post hoc* Analysen basierten auf der Einteilung von BMI-Perzentilen und dem Geschlecht in entsprechenden Altersgruppen.
7. Dänemark: 231 Männer (BMI  $\geq$  31 kg/m<sup>2</sup>), die bereits im Jugendalter adipös waren und 318 männliche Kontroll-Personen (BMI  $<$  31 kg/m<sup>2</sup>), die bei der Musterung für den Wehrdienst im Alter von 18-26 Jahren (mittleres Alter  $19,9 \pm 1,9$  Jahre) zwischen 1953 und 1977 im östlichen Teil Dänemarks ausgewählt wurden (Sonne-Holm et al. 1989; Echwald et al. 2001). In dieser Population der Wehrdienstpflichtigen wurde als Kriterium für die adipöse Gruppe die 99,5. Perzentile angelegt. Die DNA-Proben wurden in einer Follow-up-Untersuchung zwischen 1998 und 2000 gesammelt.
8. Frankreich: 468 adipöse (353 weibliche; mittlerer BMI  $47,8 \pm 7,8$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $43,3 \pm 12,2$  Jahre) Erwachsene und 322 Kontroll-Personen (166 weibliche; mittlerer BMI  $21,5 \pm 1,8$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $51,9 \pm 10,8$  Jahre) aus Paris.
9. USA: Ein amerikanisches Studienkollektiv von 187 Trios (153 weibliche Indexpatienten), das sich aus 160 extrem adipösen europäischen Amerikanern und 27 extrem adipösen afrikanischen Amerikanern (mittlerer BMI  $50,5 \pm 9,4$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $37,2 \pm 9,3$  Jahre) sowie ihren beiden Eltern zusammensetzt.

## 2.2 Chemikalien und Geräte

### 2.2.1 Chemikalien

In Tabelle 2-2 sind die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle aufgeführt:

**Tab. 2-2: Verwendete Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller
123 bp DNA-Längenstandard	Gibco BRL (Eggenstein)
[2,8-3H]-adenine (24.2 Ci/mmol)	Perkin Elmer (Weiterstadt)
3-isobutyl-1-methylxanthine	Sigma (Deisenhofen)
3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate solution	Pierce (Rockford, IL)
Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Acrylamid-Bis Acrylamid (37,5:1)	Q Biogene (Heidelberg)
Agarose NEEO	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Anti-HA-Antikörper, der Peroxidase markiert ist	Roche (Mannheim)
APUWA (steriles Aqua bidest)	Fresenius (Bad Homburg)
Aqua bidest/HPLC	Roth (Karlsruhe)
BigDye Terminator Cycle sequencing v20 kit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Borsäure	Riedel-de-Haën (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Carbachol	Sigma (Deisenhofen)
Dibutyryl-cAMP (dbcAMP)	Sigma (Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
DNA- Polymerisationsmix (dNTP)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	PAA - Cell Culture Company (Pasching, A)
Earle's modified Eagle Medium (Earle's MEM)	PAA Cell Culture Company (Pasching, A)
Essigsäure	Riedel-de-Haën (Taufkirchen)
Ethanol 100%, vergällt	Apotheke, Klinikum Marburg
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylen-ediamin-tetraacetic-acid (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA - Cell Culture Company (Pasching, A)
Ficoll (Type 400)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Glyzerol	Sigma (Deisenhofen)
Harnstoff	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Isoproterenol	Sigma (Deisenhofen)
LiCl	Sigma (Deisenhofen)
Long Ranger	Roth (Karlsruhe)
Low DNA mass ladder	Gibco BRL (Eggenstein)
Magnesiumchlorid	Sigma (Deisenhofen)

- Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt -

- Fortsetzung der Tabelle 2-2 -

Melanin-konzentrierendes Hormon	Phoenix Peptide Inc. (Karlsruhe)
METAFFECTENE	Biontex (München)
myo-[2-3H] inositol (15,0 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Penizillin	PAA - Cell Culture Company (Pasching, A)
peroxidase-labeled anti-HA monoclonal antibody	Roche (Mannheim)
Pronase E	Sigma (Deisenhofen)
Puffer 10x (Reaktionspuffer für PCR)	Sigma (Deisenhofen)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Salpetersäure	Merck (Darmstadt)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure 1 M	Merck (Darmstadt)
SDS	Roth (Karlsruhe)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Streptomycin	PAA - Cell Culture Company (Pasching, A)
Taq-Polymerase	Sigma (Deisenhofen); Perkin Elmer (Weiterstadt)
Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen)
Thermo sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7- deaza- dGTP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Trichloressigsäure (5 %)	Merck (Darmstadt)
Triethylammonium Acetat (TEAA)	Transgenomic (Cheshire, GB)
Tris-Base	Sigma (Deisenhofen)
TrisHCl	Roth (Karlsruhe)
Xylene-Zyanol blau	Merck (Darmstadt)

### 2.2.2 Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden mit Aqua bidest angesetzt und, wenn nicht anders erwähnt, anschließend autoklaviert. Die hierfür verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p. a..

#### 2.2.2.1 Puffer für die Isolierung genomischer DNA

<b>Red cell lysis buffer (RCLB)</b>	10	mM	Tris/HCl
PH 7,6	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	NaCl
<b>SE-Puffer</b>	75	mM	NaCl
PH 8,0	25	mM	EDTA
<b>TE-Puffer</b>	10	mM	Tris/HCl
PH 8,0	1	mM	EDTA

2.2.2.2 Puffer für die Gelelektrophorese

Diese Lösungen wurden nicht autoklaviert.

*Agarose-Gelelektrophorese*

<b>50x TAE</b> (per Liter)	242,0	g	Tris/HCl
	57,0	ml	Essigsäure 100 %
	100,0	ml	0,5 M EDTA; pH 8,0
<b>1x TAE</b>	0,2	l	50x TAE
	9,8	l	Aqua bidest
<b>Auftragspuffer</b>	15	% (w/v)	Ficoll (Type 400)
	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25	% (w/v)	Xylen Zyanol

*Einzelstrang-Konformationsanalyse*

<b>10x TBE</b> (per Liter)	108,0	g	Tris-Base
	55,0	g	Borsäure
	8,3	g	EDTA
<b>Auftragspuffer</b>	8	ml	EDTA (0,5 M)
	190	µl	deionisiertes Formamid
	2	ml	Glyzerol
	50	mg	Bromphenolblau
	50	mg	Xylen Zyanol
	ad 200	ml	Aqua bidest

2.2.2.3 Puffer für die Detektion von DNA*Silberfärbung*

Diese Lösungen wurden nicht autoklaviert.

<b>Fixierer</b>	10	% (v/v)	Ethanol
	0,5	% (v/v)	Essigsäure
<b>Entwickler</b>	280	mM	NaCO <sub>3</sub>
	0,019	% (v/v)	Formaldehyd

#### 2.2.2.4 Puffer für die denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC)

Diese Lösungen wurden nicht autoklaviert.

<b>Puffer A</b>	50	ml	2M Triethylammonium Acetat (TEAA)
	250	µl	Acetonitril
	ad 1	l	Aqua bidest/HPLC
<b>Puffer B</b>	50	ml	2M Triethylammonium Acetat (TEAA)
	250	ml	Acetonitril
	ad 1	l	Aqua bidest/HPLC
<b>Puffer C</b>	750	ml	Acetonitril
	ad 1	l	Aqua bidest/HPLC
<b>Puffer D</b>	80	ml	Acetonitril
	ad 1	l	Aqua bidest/HPLC

### 2.2.3 Zelllinien, cDNA, Plasmide und Vektoren

In Tabelle 2-3 sind die für die Expressionsanalysen und funktionellen *in vitro* Studien verwendeten Zelllinien, cDNA, Plasmide und Vektoren aufgeführt. Die Expressionsanalysen wurden von den Kooperationspartnern Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) und die funktionellen Studien von den Kooperationspartnern Dr. C. Platzer (Institut für Anatomie II, Jena) und Dr. C. Hess/Prof. T. Gudermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg) durchgeführt.

**Tab. 2-3: Für die Expressionsstudien und funktionellen *in vitro* Studien verwendete Zelllinien, cDNA, Plasmide und Vektoren**

Zelllinien, cDNA, Plasmide, Vektoren	Hersteller/Quelle
Humane cDNA Bibliotheken MTC Panel I und II	Clontech Laboratories (Palo Alto, USA)
Humane Präadipozyten Zelllinien SGBS	Wabitsch et al. 2001
Plasmid pCR2.1-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)
Vektor pcDNA3.1	Invitrogen (Karlsruhe)
pGL3-Basic Luciferase Reporter Vector	(Promega, Mannheim)
P12 Ratten Phäochromozytom-Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)

## 2.2.4 Oligonukleotide und Restriktionsenzyme

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind immer in der Transkriptions-Richtung 5'→3' angegeben. Mit f oder r wurden die vorwärts (forward) bzw. rückwärts (reverse) gerichteten Primer gekennzeichnet.

### 2.2.4.1 Primer für das Mutationsscreening

**Tab. 2-4: Primer, Amplikon-Längen und Annealing-Temperaturen für die PCR-Reaktionen im initialen Mutationsscreening\* des *MCHR1*\*\***

Fragment	Primer (5'→3')	Position im Klon Z86090	Amplikon-Länge (bp)	Annealing-Temp. (°C)
5' Region	MCHR-Prom-f/ MCHR-Prom-r AGCCTTTGATTCCCAAGCTA TCCCACAACCGAGCTGAG	99745 - 100304	560	58
Exon1	MCHR-1 long-f/ MCHR-1 long-r AGCCTGGGACTGAAGAAGTT GCTCAGCTCGGTTGTGG	100062 - 100302	241	65
Exon1	MCHR-1-f/MCHR-1-r GCTCAGCTCGGTTGTGG GCAGTTTGGCTCAGGGG	100286 – 100484	199	63
Intron	MCHR-I1a-f/MCHR-I1a-r TGTGGGTGGAAAATGGGAAG CCTCTCCCAGGTGGCAGTAA	100442 - 100841	400	64
Intron	MCHR-I1b-f/MCHR-I1b-r CCCTGGGAAGGGAAGACT CTTTCCTATGTGTAGCCCTGA	100842 - 101242	401	64
Intron	MCHR-I1c-f/MCHR-I1c-r CTTACTTTTGTGTCCCTCTGGCTA GCTGTTTGACATGGGCTTTG	101277 - 101598	322	64
Exon2	MCHR-2a-f/MCHR-2a-r GCCCATGTCAAACAGCCAAC AGGGTGAACCAGTAGAGGTC	101582 – 102169	588	62
Exon2	MCHR-2b-f/MCHR-2b-r TGCCAGACTCATCCCCT TTGGAGGTGTGCAGGGT	102083 – 102632	550	60

\* Mutationsscreening der kodierenden Region erfolgte mittels SSCP und der 5' Region sowie des Introns mittels dHPLC

\*\* *MCHR1* Transkript (AB063174; Shimomura et al. 1999)

## 2.2.4.2 Primer für die Sequenzierung

Tab. 2-5: Primerpaare für die Sequenzierung\* der Varianten in der kodierenden Region des *MCHR1*\*\*

Primerpaar	forward Sequenzierungsprimer	reverse Sequenzierungsprimer
SeqMCHR-1	MCHR 1s-f AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG CTCAGCTCGGTGTGTGG	MCHR 1s-r GAGCGGATAACAATTTTCACACAG GGCAGTTTGGCTCAGGGG
SeqMCHR-2a	MCHR 2as-f AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG CCCATGTCAAACAGCCAAC	MCHR 2as-r GAGCGGATAACAATTTTCACACAG GAGGGTGAACCAGTAGAGGTC
SeqMCHR1-2b	MCHR 2bs-f AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG CCAGACTCATCCCC	MCHR 2bs-r GAGCGGATAACAATTTTCACACAG GTTGGAGGTGTGCAGGGT

\* Sequenzierung der Varianten in der CDS des *MCHR1* erfolgte am LiCor 4200-2; Sequenzierung der Varianten im 5' Bereich des *MCHR1* sowie im Intron erfolgte durch das Sequenzierungslabor (SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH)

\*\* *MCHR1* Transkript (AB063174; Shimomura et al. 1999)

*kursiv:* gelabelte M13 Sequenzen (AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT für die forward-Primer und GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG für die reverse-Primer) wurden an das 5' Ende jedes Primers angehängt

Tab. 2-6: Primerpaare für die genomische Sequenzierung\* des *MCHR1*-Locus\*\* mittels nested PCR\*\*\*

Re-gion	Primer PCR 1	Primer PCR 2	
A	A1f: GCTTCCACCCTACATTGGTC A1r: AGGTCAATCACGAGGTTAGG	A2f: AGCATTAACTCTCCCTGCAC A2r: CCATAATGCCAGCTACACAG  A3f: GTCCAGTAGACATGCTCACC A3r: TACCAAAGTGACTGAGCCTG  A4f: CACTCCTACCATTCAAAGGC A4r: AGGCTCTGTGGATACAGTGG  A5f: GCCATGATTTTGTGAGTCCC A5r: CTGGATGTGCTTACTTAGGG  A6f: ACTATGGCATGTGGAAGAGG A6r: GGGAGAAGTCATGCCTGAAG  A7f: CCCTAAGTAAGCACATCCAGTC A7r: GGAAGTAGTGGTTAGCAGTTGG  A8f: CTCCCAGGTTCAAACGATTC A8f2: AGTCTCACTCTGTGCGAC A8r: GGCTAACACGGTCAAACCTC	
	B	B1f: GCCTGGCTAAAACCTTCTGAC B1r: GCATTGCCCTCAACAATGAC	B2f: GTGCAGTGGTGTGATCTCGG B2f2: AGGTAGCTGAGGCATGAG B2r: GGCTGAGGCAGAAGAATCGC  B3f: GTCTCACTCTGTGCTCAGG B3r: ATGGAGTTGTGGGGGAGGTC

- Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt -

- Fortsetzung der Tabelle 2-6 -

		B4f: CCCTGACTCACTCTGTTCCC B4r: TTCTGCCAGGATCTGCCCAC
		B5f: AGGACTATGGAGTTAGCTGG B5r: CTTTCTTGACCTCTGCAAC
		B5f2: AGTCTCCCTCTGTCACCC B6f: CCAAAGCAACAATGAGAGACCC B6r: GACCCACCTTGTCATGTACC B6r2: GTCCCTTGCTACTTGCGAG
<b>C</b>	C1f: GGCAGAGTCAGATAGCCAGC C1r: CTAGCACCCCTCAAGATCCAC	C2f: TCCTGACTCTTAACACTCGC C2r: CAGTGACATCAAGAGGATGG  C3f: GTCACTGTCAAAGTCAGAGG C3r: GCTGGGACTTACTTAGATGG  C4f: TAGTCTTCTAGGTGGCACTG C4r: TCACCAGTGGAAATCCCATC  C5f: GTAGTGAAGACACTGGTGGG C5r: AGCTACTTGGGAGTCTGAGG C5r2: CACTCCCACACATAGTCC
<b>D</b>	D1f: GGGACTATGTGTGGGAGTGG D1r: CCTGGGTGACAGAACGAG	D2f: GTCACCTATGCTGAAGTGCC D2r: TAGGCACAAGCCACAACG  D3f: CAGAAGTGGATCTTGAGGG D3r: TCCAGTGATCCACCAGCC  D4f: AATCTCACCCTGCACCC D4r: GCATGTTAGGACTGGCTC  D5f: GGCAACATAGTGAGACTCC D5r: TGCCATTACCCTCCAGCC  D6f: GCCAGTCCTAACATGCITC D6r: GTTTGGTGGGAGGTGATTGG
<b>E</b>	E1f: TCAGCTCACTGCAACCCTC E1r: GGAAATTGTCAGTGCAGAGG  E3f: GAGGCAAGAGTCACCACACC E3r: TGAGGTCCCTGAGGTTTGGC	E2f: TAGCTGGGACTACAGGCAC E2r: TGGATTGACTGAGGTCAGG  E4f: AGTAGCTGGGATTACAGG E4r: GGAAATTGTCAGTGCAGAGG  E5f: TGACCTCAGTCAATCCACC E5r: TCACGCCTGAAATCCCAGC  E6f: CTCACTGCAATTTCCACCTC E6r: CATCCTGGCTAACATGGTG  E7f: CTCTCTTGGTATTCCCTGG E7r: GAAGTGAGCTGAGATTGG  E8f: GGTATTACAGGTGTGAGC E8r: GGGTGATTCTGAAGAACAGG  E9f: GCTGGTCTTGAACCTCTG E9r: TTACTACCTGCCAAGCAC
<b>F</b>	F1f: GCITCTCAGTGAGGTCTTCC F1r: CCCTCAGAGCAAAGCAGACC	F2f: ACCTCTGCTGGTATTCAGGG E3r: TGAGGTCCCTGAGGTTTGGC  C3f: CTTAACGCCITTTGCCTCTGC C3r: GAGTCCAGAGGAAACTGTGC

- Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt -

- Fortsetzung der Tabelle 2-6 -

		C4f: AGCGAGATAGTTGGAAGCCG
		C4r: TAACCTCTTCAGTCCCAGGC
		C5f: GGAGATCCCTTTTCCTGATGG
		C5r: CCCAAGCAGTTTGGCTCAGG
<b>G</b>	G1f: CACAGTTTCCCTCTGGACTC G1r: AACTCGTCAGCATAGCCAG	G2f: GCTAAGCCAAGCTGCTCTC G2r: TGCTCCCACAACCGAGCTG
		G3f: CCAGGCTACGGAGGAAGAC G3r: CCTCAGAGCAAAGCAGACC
		G4f: CAGGTGAGTTGACTGGGAG G4r: GTGGCAGTAAGGATGTCTC
		G5f: GTTCCAAAGATGCTTGGCAG G5r: CTATGTGTAGCCCTGAGTG
<b>H</b>	H1f: CTCTACAAGACAGTCACCC H1r: TTCCACAACCAAGTGACCC	H2f: CAGTCACCCACAGATATGC H2r: GAGAACTGACATCCTGCTG
		H3f: ATGGCTCAGGGCACTCTGG H3r: CATTGCCCATGAGCTGGTG
		H4f: ACTCCACGGTCATCTTCGC H4r: AGGTCAGTGTCTGGGTGG
		H5f: TGTATGCCAGACTCATCCC H5r: TTTGCGGAACGTCTCACAG
		H6f: ACCCAGTTGTCCATCAGCC H6r: CAAAGGTCTCATCCTGCTC
		H7f: GACCGCTCGGGAAATGCAG H7r: CCATCGCACCAGTGAGAGGC
		H8f: GTGGAAGGGTACTGACTGG H8r: GTGACTGAGCAAATGTGCC
		H8f: GTGGAAGGGTACTGACTGG H9r: CAGAGTGATGTGGGTGGAG

\* Sequenzierung erfolgte am ABI 377 (ABI; Weiterstadt; Deutschland) durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena)

\*\* *MCHR1* Transkript (AB063174; Shimomura et al. 1999); 2 Exons, Intron und 9808 bp der 5'-Region

\*\*\* Die zu sequenzierende Region von 13378 bp wurde durch 8 überlappende PCR-Produkte abgedeckt, die mit den Buchstaben A-H bezeichnet wurden

## 2.2.4.3 Primer und Restriktionsenzyme für die Genotypisierung von SNPs

Tab. 2-7: Primer, Amplikon-Längen, Annealing-Temperaturen und Restriktionsenzyme für PCR-RFLP zur SNP-Genotypisierung\*

SNP	Primer (5'→3')	Position im Klon Z86090	Amplikon Länge (bp)	Annealing- Temp. (°C)	Restriktions- endo- nuklease	ge- schnitt- enes Allel
rs 133050	MCHR133050-f/MCHR133050-r AGGGGAGAGAGCAACAAGGT TGGATAGAGCAGCACCCCTCT	58631	404	60	<i>XmnI</i>	A
rs 133055	MCHR133055-f/MCHR133055-r GGCAGGCTCATTCTACTC CATTACACCTTGCTGCTGACCA	75541	248	61	<i>Eco130I</i>	G
rs 133062	MCHR133062-f/MCHR133062-r ACTTCACCCATGAGGACCAG TGCATCATCTAGCACCCCTCA	95538	393	61	<i>Cfr13I</i>	G
rs 2031512	MCHR2032512-f/MCHR2032512-r GCCAGAAGTGGATCTTGAGG CCACACCTGGCCTACTCATT	95767	377	62	<i>BamHI</i>	C
rs 133063	MCHR133063-f/MCHR133063-r ATGAGTAGGCCAGGTGTGGT GGACTGGCTCCAGCTACATC	96329	384	63	<i>HpyCH4III</i>	C
SNP 1745616	MCHR1745616-f/MCHR1745616-r ACCTGGCCAGCTACACACTT AGGGGAAGCTTTTTCAGTA	97003	190	58	<i>BglII</i>	G
SNP 1745617	MCHR1745617-f/MCHR1745617-r AGAATCTGCCCTTCCTGCTC CTGAAGGAAGTGAGGAAGCA	97723	498	61	<i>PfIF1</i>	C
SNP 1745618	MCHR1745618-f/MCHR1745618-r CTCCTGAGCTCAAGCAATCC GTGGGGGATAAAGTCCCTGT	98838	415	61	<i>BsrI</i>	C
rs 133068	MCHR133068-f/MCHR133068-r CCTCCACCTCTGCTGGTATT GTGGGGGATAAAGTCCCTGT	99077	150	64	<i>FauI</i>	G
rs 133072	MCHR133072-f/MCHR133072-r GCAGGCATTCAGAAGTGGA AGGTCCATCCAGCCAGTG	100213	302	59	<i>Hpy188III</i>	G
SNP 1745619	MCHR1745619-f/MCHR1745619-r CTTACTTTTGTGTCTTCTGGCTA GAGCCATCTGTCTTGGAAGG	101341	146	65	<i>TfiI</i>	G
rs 133074	MCHR133074-f/MCHR133074-r TCCCAAGCTGGTGGATAATG ACCCAGGTCTCCTTGTITT	103143	181	62	<i>Tsp509I</i>	T
rs 3087592	MCHR3087592-f/MCHR3087592-r AGCCCAGTTTGCTAGGAGGT ACACACGGACACTCAAGCTG	103335	173	61	<i>NlaIII</i>	T

- Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt -

- Fortsetzung der Tabelle 2-7 -

rs 133079	MCHR133079-f/MCHR133079-r CGCTTTATC'TTTGCACACCA TTC GTA GAG ACG GGG TTT TG	111765	197	60	<i>MspI</i>	C
rs 133084	MCHR133084-f/MCHR133084-r AGG GTA CCC AAG GCA TCA CT GCA CCC CAG CCA AAG TAG TA	120628	170	62	<i>Cac8I</i>	C

\* die SNPs rs133068, rs133072 und rs133074 wurden an 525 adipösen Kindern und Jugendlichen (304 weiblich; mittlerer BMI  $32,2 \pm 6,0$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $13,7 \pm 2,8$  Jahre) und ihren Eltern genotypisiert die restlichen 12 SNPs wurden an 61 Trios (adipöse Kinder und ihre Eltern) einer Untergruppe der 525 Trios genotypisiert

**Tab. 2-8: Primer, Schmelz- und Annealing-Temperaturen sowie Amplikon-Längen für eine Tetra-Primer ARMS-PCR zur SNP-Genotypisierung\***

SNP	Position im Klon Z86090	Primer (5'→3')	Schmelz- Temp. (°C)	Annea- ling- Temp. (°C)	Ampli- kon- Länge (bp)
rs 133073	100365	forward innerer Primer (T-Allel) CTGCTGCCCACTGGTCCCAT	70	65	202 (T-Allel)
		reverse innerer Primer (C-Allel) GCCATCAGAGGTGTTGCTGTCTG	67	65	247 (C-Allel)
		forward äußerer Primer GAAGGGAGTGGGGAGGGCAGTT	68	65	406 (beide äußere Primer)
		reverse äußerer Primer GCCCTCAGAGCAAAGCAGACC	68	65	
rs 133069	99132	forward innerer Primer (A-Allel) GGACTTTATCCCCACCCACCCCTCA	74	60	115 (A-Allel)
		reverse innerer Primer (C-Allel) TTTTGCAGTAAAAAAAAAAGAAAAA AGGG	65	60	147 (C-Allel)
		forward äußerer Primer GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCCCA ATACCATGAATTGTC'TTTGAGGGGT	76	60	206 (beide äußere Primer)
		reverse äußerer Primer TTGGGTTTCATCCAACAACATTCATTG A	69	60	

\* der SNP rs133073 wurde an 525 adipösen Kindern und Jugendlichen (304 weiblich; mittlerer BMI  $32,2 \pm 6,0$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $13,7 \pm 2,8$  Jahre) und ihren Eltern genotypisiert  
SNP rs133069 wurde an 61 Trios (adipöse Kinder und Jugendliche und ihre Eltern), einer Untergruppe der 525 Trios genotypisiert

2.2.4.4 Primer für die Expressionsanalysen**Tab. 2-9: Primer für die Expressionsanalysen\* des *MCHR1*-Transkriptes**

MCHR-RT	RT-PCR1	RT-PCR2
mRNA 1* (2 Exons)	rt1f/rt1r TGCAGGCATTCAGAAGTGG ATGCTGATGAAGGAGAGGG	mchr.4if/rt2r CCAGGCTACGGAGGAAGAC CTGGTGAAGTACTATTGGC  rt1f/rt2r TGCAGGCATTCAGAAGTGG CTGGTGAAGTACTATTGGC

\* Expressionsanalysen erfolgten durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena)

2.2.4.5 Primer für die Promoterstudien**Tab. 2-10: Primer für die Promoterstudien\* des *MCHR1***

Amplifizierung der vollständigen kodierenden Sequenz des <i>MCHR1</i>	
PCR 1-F: GGAGATCCCITTCCTGATGG	PCR 1-R: GCCTCTCACTGGTGCGATGG
PCR 1-F: TGCAGGCATTCAGAAGTGG	PCR 1-R: GAGCAGGATGAGACATTTG
Amplifizierung der Fragmente für das Luziferase Assay	
<i>Xho</i> I.f	TGAGGTCTTCCTCGAGGATCAA
<i>Nco</i> I.r	GGCTCCCCTGCCATGGCCTAG

\* Promoterstudien wurden mittels eines Luziferase Reporter-Gen-Assays durch die Kooperationspartnerin Dr. C. Platzer (Institut für Anatomie II, Jena) durchgeführt

### 2.2.5 Geräte

In Tabelle 2-11 sind die verwendeten Geräte mit ihrer Funktion und Hersteller aufgeführt.

**Tab. 2-11: Beschreibung der verwendeten Geräte**

Gerätebezeichnung	Hersteller
Automatischer Sequenzer ABI 377	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Autoklav 3850	Tuttnauer
Zentrifugen Biofuge 13/ Zentrifuge Labfuge	Heraeus instruments (Hanau)
Drehschieberpumpe RZ-2	Vaccubrand (Gießen)
Plattenschwenkgerät Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
ELISA reader (Microplate Reader Elx800)	Bio-Tek Instruments, Inc. (Vermont)
Finn-Pipette	Labsystem (Helsinki, F)
GDS-Kamerasystem	Polaroid (Offenbach)
DNA-Thermozykler Geneamp PCR-System 2400/9600	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Photometer Genequant II	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Horizontalelektrophorese GE-A2	AGS (Heidelberg)
Magnet- Rührgerät Ikamag RH	IKA Labortechnik (Staufen)
DNA- Gradientencycler JMBS 0.2 G	Hybaid (Heidelberg)
Sequenziergerät LiCor 4200-2	MWG Biotech(Ebersberg)
Kühlzentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus instruments (Hanau)
Mikroliterspritze 802, 25	Hamilton (USA)
Mikrowelle	Panasonic (Hamburg)
Milli-Qplus für Aqua bidest	Millipore (Saint-Quentin Yvelines Codex, F)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Elektrische Saugpipette Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Stromaggregat Power-Supply E 452/E 734	Consort (Turnhout, Belgien)
Stromaggregat Power-Supply EPS 301	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Schüttelwasserbad 1083	GFL (Burgwedel)
Eismaschine Scotsman AP-10	Frimont (Mailand, Italien)
DNA- Thermozykler Touch Down	Hybaid, MWG (Ebersberg)
dHPLC-Gerät Transgenomic Wave	Transgenomic (Cheshire, GB)
Trockner FunktionLine	Heraeus instruments (Hanau)
Ultra Low Freezer	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Eisschrank bis -80°C UnigelDryer 4050	Uniequip (Martinsried/München)
Ultraviolett-Lichtquelle Mighty Bright	Hoefer (San Francisco, USA)
Vertikalelektrophorese SE 600 für SSCP	Hoefer (San Francisco, USA)
Schüttelgerät Vortex MS1, RS1	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage SBA,SBC	ScalTec Instruments (Heiligenstadt)

## 3 Methoden

### 3.1 Präparation genomischer DNA

#### 3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut

*Aussalzungsmethode nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988)*

Dieses modifizierte Protokoll (Miller et al. 1988) eignet sich für Volumina von 10-25 ml EDTA-Blut. Zur DNA-Isolierung kann sowohl natives als auch tiefgefrorenes EDTA-Blut eingesetzt werden. Eine höhere Ausbeute wird jedoch mit nativem Blut erzielt.

In einem 50 ml Falcon-Röhrchen werden 10-20 ml antikoaguliertes EDTA-Blut mit 30 ml eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer (RCLB) gut vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und zwischenzeitlich 3-4 mal gemischt. Nach der Lyse der Erythrozyten werden die Leukozyten durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4.000 rpm (Ausschwingrotor #8155, Heraeus Megafuge 2.0 R) sedimentiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Erythrozytentrümmern wird verworfen und das Leukozytensediment mit 25 ml RCLB gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation des Gemisches bei 4000 rpm und 4 °C wird das nun entstandene Pellet in 5,5 ml Pronase-Reaktionsmix gelöst und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad schüttelnd inkubiert bis die Lösung klar ist. Um den proteolytischen Abbau zu beschleunigen, erfolgt nach der Inkubation eine Zugabe von 5 ml SE- Puffer und eine weitere Inkubation bei 55 °C mindestens 10 Minuten lang im Wasserbad bei ständigem Schütteln. Zur Ausfällung der Proteine werden im Anschluss daran 2,5 ml NaCl-Lösung (5 M) zu der klaren Lösung gegeben, umgehend 15 Sekunden lang gevortext und dann 15 Minuten lang bei 4.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch werden die durch die Salzlösung gefällten Proteine sedimentiert. Der DNA enthaltende Überstand wird in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem absolutem Ethanol gefällt und etwa eine halbe Stunde offen stehen gelassen. Anschließend werden die Phasen gemischt. Die ausgefällte DNA wird mit einem Glashaken aufgenommen, kurz in eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend in TE-Puffer (pH 8,0) 1-2 Stunden bei 50 °C im Wasserbad gelöst und im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Nach der Kontrolle der vollständigen Lösung der DNA, erfolgt eine photometrische Konzentrationsbestimmung (siehe 3.1.2). Sollte sich die DNA nicht gelöst haben, erfolgt eine erneute Fällung der Proteine mit NaCl und eine Wiederholung der nachfolgenden Schritte. Zur Extraktion der DNA aus Blut werden die unter 2.2.2.1 aufgeführten Puffer verwendet.

Tabelle 3-1 zeigt die Zusammensetzung des bei der DNA-Extraktion verwendeten Pronase-Reaktionsgemisches. Die lyophilisierte Pronase wird zu einer Konzentration von 10 mg/ml in Aqua bidest gelöst und aliquotiert. Die Aliquots werden bis zu 6 Monaten bei -20 °C gelagert.

**Tab. 3-1: Zusammensetzung des Pronase-Reaktionsgemisches**

Reagenz	Menge pro Einzelprobe
SE-Puffer (pH 8,0)	5 ml
Pronase E (10 mg/ml <sup>1</sup> )	25 µl
SDS 10%	500 µl

<sup>1</sup> Pronase erst kurz vor Verwendung zugeben

#### *QIAmp Blood Kit:*

Mit dem QIAmp Blood Kit (Qiagen) kann auch aus geringen Volumina Blutes oder aus mehrfach aufgetautem EDTA-Blutes genomische DNA isoliert werden. Die DNA wird entsprechend den Herstellerangaben aus 500 µl EDTA-Blut isoliert.

### 3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA, die aus den verschiedenen Blutproben präpariert wird, wird photometrisch bestimmt, um im Anschluss durch entsprechende Verdünnungen einheitliche Konzentrationen für die PCR verwenden zu können.

Die Messung der Extinktion der DNA erfolgt im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Dazu wird ein Aliquot der gelösten DNA mit destilliertem Wasser 1:200 verdünnt und die Extinktion dieser Lösung im Photometer bestimmt. Der Berechnung der DNA-Konzentration liegt folgende Formel zugrunde:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml} \times E_{260\text{nm}}$$

Eine Extinktion von  $E_{260\text{nm}} = 1,0$  ( $E_{260\text{nm}}$  = Extinktion bei 260 nm) entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Die DNA-Konzentration sollte sich zwischen 300 – 1000 µg/ml bewegen. Das Verhältnis der Extinktion  $E_{260}/E_{280}$  (DNA/Protein) gibt den Reinheitsgrad der Probe an. Es sollte darauf geachtet werden, dass dieser Quotient nicht unter einem Wert von 1,5 liegt.

### 3.1.3 Verdünnung der DNA

Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird ein Teil der DNA-Lösungen mit sterilem Aqua bidest auf eine Endkonzentration von 20 ng/µl in 200 ml verdünnt. Sowohl die Verdünnungen als auch die Ursprungslösungen werden bei -80°C gelagert.

### 3.1.4 Herstellung von DNA-Mikrotiterplatten

Um die weitere Verwendung der hergestellten DNA-Verdünnungen zu erleichtern, werden Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Wells gefüllt. Dabei beträgt die Endkonzentration der DNA ebenfalls 20 ng/ $\mu$ l. Die Lagerung der Mikrotiterplatten erfolgt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

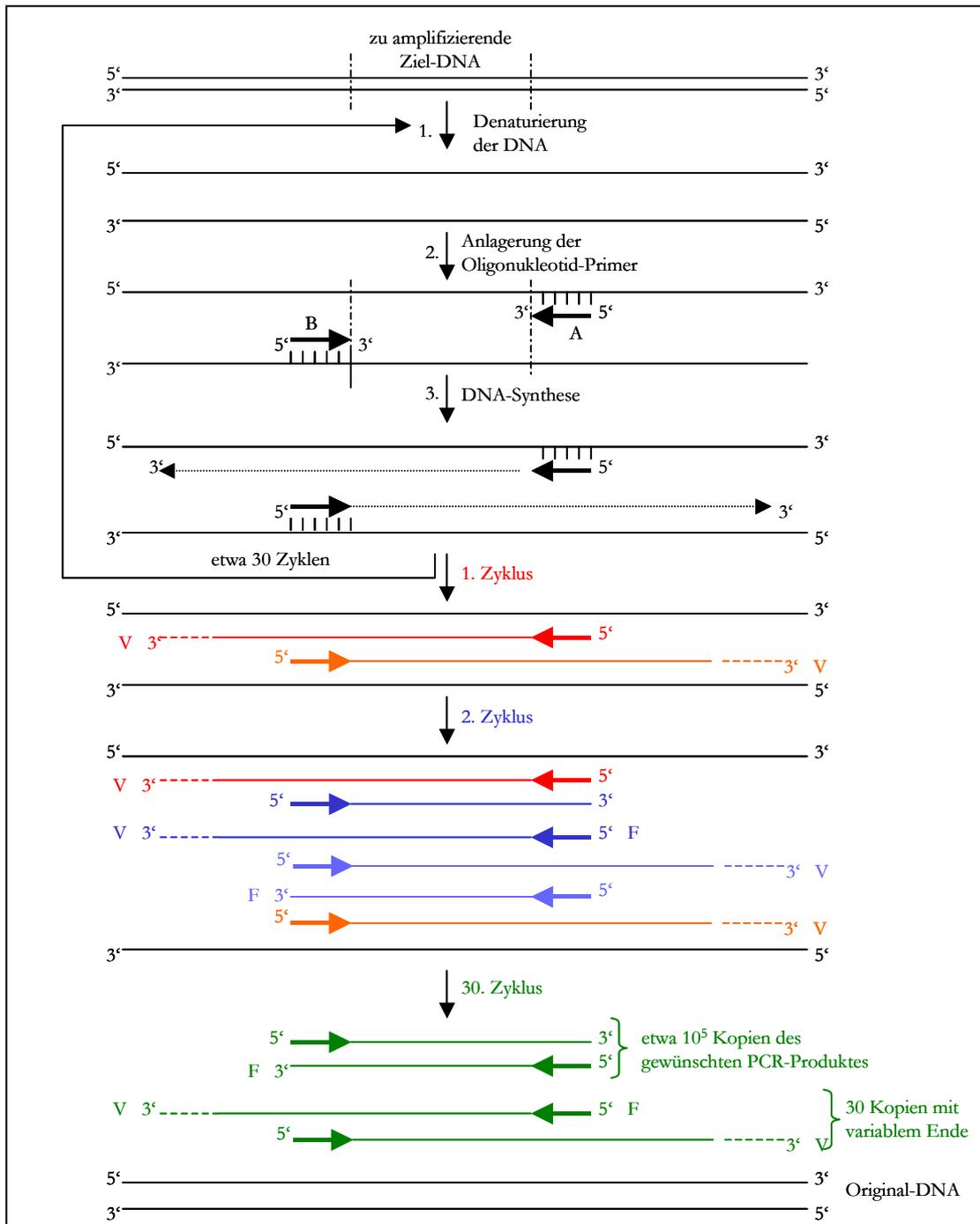
## 3.2 Amplifizierung von DNA

### 3.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR) können definierte Ziel-DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigt werden, sofern die Sequenz der zu vervielfältigenden DNA-Region bekannt ist. Die PCR-Technik wurde durch Dr. Kary Mullis 1983 entwickelt, wofür er 10 Jahre später den Nobelpreis der Chemie erhielt. Die PCR wird als Kettenreaktion bezeichnet, weil neu synthetisierte DNA-Stränge als Vorlage für die weitere DNA-Synthese in den folgenden Zyklen dienen. Für eine PCR-Reaktion wird eine kleine Menge genomischer DNA oder bereits amplifizierter DNA-Fragmente in ein Reaktionsgefäß mit einer Pufferlösung zugegeben, die eine spezielle hitzebeständige DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus*), zwei kurze Oligonukleotid-Primer, eine ausreichende Menge der vier Desoxynucleosid-triphosphate (dNTP) und den Cofaktor  $\text{MgCl}_2$  enthält. Der PCR-Mix durchläuft Wiederholungs-Zyklen, die aus folgenden Schritten bestehen (DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory: <http://www.dnalc.org/resources/BiologyAnimationLibrary.htm>):

1. Denaturierung der DNA-Doppelhelix: eine bis mehrere Minuten lang bei  $94 - 96^{\circ}\text{C}$ , wobei die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge denaturiert wird. Die Denaturierungstemperatur wird um so höher gewählt, je höher der Gehalt an Guanin und Cytosin im zu amplifizierenden Bereich ist.
2. Anlagerung der Primer: eine bis mehrere Minuten bei  $50^{\circ}-65^{\circ}\text{C}$ , während die im Überschuss vorliegenden Primer hybridisieren oder sich an ihre komplementären Sequenzen an jeder Seite der Zielsequenz anlagern (Annealing). Dabei definiert ein Primer das 5' Ende auf dem einen DNA-Strang und der andere Primer das 3' Ende auf dem anderen DNA-Strang.
3. Verlängerung der Primer in Richtung Zielsequenz: eine bis mehrere Minuten bei  $72^{\circ}\text{C}$  (optimierte Temperatur der *Taq*-Polymerase), während dieser Zeit die *Taq*-Polymerase bindet und von jedem Primer aus in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert. Dies geschieht durch Einbau von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) entlang der DNA-Vorlage.

Schon nach dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer entspricht. Ihr Anteil erhöht sich mit jedem Zyklus auf das Doppelte, bis schließlich fast alle neu synthetisierten Abschnitte die richtige Länge haben. So lässt sich der definierte DNA Abschnitt exponentiell amplifizieren ( $2^n$ ;  $n$  = Anzahl der Zyklen). Nach 30 Zyklen liegen etwa  $10^5$  Kopien des amplifizierten PCR-Produktes vor (Strachan und Read 1999). Abbildung 3-1 zeigt ein Schema der PCR.



**Abb. 3-1: Polymerase-Kettenreaktion (PCR).** 1. Denaturierung der DNA-Doppelhelix. 2. Anlagerung der Primer. 3. Verlängerung der Primer in Richtung Zielsequenz. Die neu gebildeten DNA-Stränge dienen in den Folgezyklen wieder als Matrizen, so dass die Zielsequenz wieder von den Primern flankiert und exponentiell vermehrt wird (modifiziert nach Strachan und Read 1999).

### 3.2.2 Primerdesign

Für die Vervielfältigung bestimmter Ziel-DNA-Sequenzen wurden entsprechende synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer bei SIGMA (Darmstadt) bezogen. Bei der Auswahl der Oligonukleotidprimer wurden folgende Regeln beachtet (Strachan und Read 1999):

- (1) Die Oligonukleotidprimer sollten etwa 20 Nukleotide lang sein.
- (2) Komplementäre Sequenzen der Oligonukleotidprimer untereinander und innerhalb eines Primers sollten vermieden werden, um eine Primer-Dimer-Bildung oder Rückfaltung des Primers durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung zu minimieren.
- (3) Durch ungenaues Matchen des 3' Endes der Primer entstehen Nebenprodukte. Besonders am 3' Ende müssen Sequenzen vermieden werden, die dazu neigen, Nebenprodukte zu bilden. Ebenso sind besonders am 3' Ende komplementäre Basen zu meiden. D. h. ein optimaler Ansatz für das 3' Ende des Primers ist sehr wichtig.
- (4) Der Guanin/Cytosin-Gehalt des Oligonukleotidprimers sollte bei 40 - 60 % liegen und bei beiden Primern ähnlich sein.
- (5) Die Primer sollten nur einmal im humanen Genom binden.
- (6) Die Primer werden flankierend zum Exon bzw. zu den zu amplifizierenden Sequenzen gelegt, so dass ein PCR-Produkt von etwa 200 bp amplifiziert wird.

Für die Auswahl der Oligonukleotidprimer wurde das Online-Programm am Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA verwendet ([www-genome.wi.it.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi](http://www-genome.wi.it.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi)).

#### *Kontrolle der Reinheit der Oligonukleotidprimer*

Mit Hilfe der dHPLC am WAVE-Gerät (Transgenomic; Cheshire, GB) kann die Reinheit der Oligonukleotidprimer und deren Konzentration geprüft werden. Bei unzureichender Aufreinigung oder zu geringer Konzentration der Oligonukleotidprimer können Schwierigkeiten bei der Optimierung der PCR auftreten.

#### *Gelabelte Oligonukleotidprimer*

Durch Verwendung von Oligonukleotidprimern, die am 5' Ende mit einer Gruppe gelabelt sind, kann auch die DNA-Zielsequenz mit dieser Gruppe gelabelt werden. Bei dem Einsatz von Oligonukleotiden, die z. B. mit einer M13-Sequenz (s. Tab. 2-5) gelabelt worden sind, entstehen Amplifikate mit einer zum M13-Primer komplementären Sequenz, welche die Verwendung von fluoreszenz-gelabelten Primer bei der Durchführung der Sequenzierung (s.u. 3.3.3) ermöglicht. Bei der Sequenzierung der kodierenden Sequenz des *MCHR1* von DNA-Proben mit auffälligen SSCP-Mustern wurde dies angewendet (s. Tab. 2-5).

### 3.2.3 Optimierung der PCR

Die PCR ermöglicht eine schnelle Amplifizierung einer DNA beispielsweise zum Screening auf unbekannt Mutationen oder für die Genotypisierung von SNPs. Dafür sollte das spezifische Amplifikat mit der gewünschten Sequenz jedoch möglichst geringe Anteile unspezifischer Nebenprodukte enthalten. Zur Vermeidung eines solchen mispriming werden bei der Optimierung der PCR verschiedene Parameter, die einen Einfluss auf die Spezifität und Effektivität haben, variiert (Innis und Gelfand 1990):

#### *pH-Wert und Ionenkonzentration*

Der pH-Wert und die optimale Konzentration von positiv geladenen Ionen haben einen Einfluss auf die Denaturierung der Matrize und die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotidprimer. Außerdem stehen sie in Wechselwirkung zu der enzymatischen Aktivität der Polymerase. Kationen, primär die  $K^+$ - und  $Mg^{2+}$ -Ionenkonzentrationen, vermindern durch Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyribose-Rückgrates die elektrostatischen Abstossungskräfte zwischen den DNA-Strängen, so dass die Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die Matrize forciert wird. Die Magnesiumkonzentration ist zudem bedeutsam für die Aktivität der *Taq*-Polymerase. Bei niedriger Konzentration besteht die Möglichkeit der Inaktivierung der *Taq*-Polymerase, eine hohe Konzentration kann die Bildung unspezifischer DNA-Amplifikate fördern. Da die Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP's) Magnesium-Ionen binden, ist die Konzentration an freiem Magnesium abhängig von der Konzentration der dNTPs. Auch der optimale Gehalt an Kalium-Ionen ist je nach Oligonukleotidprimer und Zielsequenz verschieden. Zur Optimierung der PCR wurden deshalb verschiedene Konzentrationen von  $Mg^{2+}$ -Ionen durch Zugabe von  $MgCl$  und verschiedene Konzentrationen von  $K^+$ -Ionen durch Zugabe des polymerasespezifischen Puffers getestet.

#### *Anlagerungstemperatur für die Primer*

Für die Berechnung der Anlagerungstemperatur des Primers (Annealing-Temperatur) dient folgende Formel (Mullis et al. 1987):

$$TH = 2 \times nA + 2 \times nT + 4 \times nG + 4 \times nC$$

TH = Hybridisierungstemperatur des Primers  
nA = Anzahl der Adenosinbasen im Primer  
nT = Anzahl der Thyminbasen im Primer  
nG = Anzahl der Guaninbasen im Primer  
nC = Anzahl der Cytosinbasen im Primer

Hierbei werden für jedes im Oligonukleotid vorhandene Adenosin oder Thymidin 2 °C und für jedes Guanosin oder Cytidin 4 °C berechnet.

Die Hybridisierungstemperaturen von forward- und reverse-Primer sollten im Idealfall übereinstimmen. Stimmen sie nicht vollständig überein, so ist die optimale Temperatur in der Nähe des Mittelwertes beider errechneter Werte zu erwarten. Wurden bei den Temperaturen viele unspezifische PCR-Produkte amplifiziert, wurde die Annealing-Temperatur in 1 °C-Schritten so lange erhöht, bis die unspezifischen DNA-Amplifikate verschwanden. Die verwendeten Annealing-Temperaturen sind in den Tabellen 2-4, 2-7 und 2-8 bzw. in den im Anhang befindlichen PCR-Protokollen für das Mutationsscreening und die SNP-Genotypisierungen ersichtlich.

#### *Primerkonzentration*

Eine zu hohe Primerkonzentration birgt ebenfalls das Risiko für eine unspezifische Anlagerung (mispriming) an die Matrize und führt oft zu unspezifischen PCR-Produkten. Als Ausgangskonzentration wurden 0,1 - 0,2 µM Primer in dem jeweiligen Reaktionsansatz eingesetzt und je nach Spezifität des PCR-Produktes variiert.

#### *Optimierung der PCR durch spezifitätssteigernde Additive:*

Eine weitere Optimierung kann durch Additive erfolgen, die dem Reaktionsgemisch beigesetzt werden können, wenn mit der Variierung oben genannter Reaktionsparameter keine ausreichende Spezifität des Amplifikats erreicht werden kann.

DNA-Regionen mit stabiler Sekundärstruktur oder sehr hohem G/C-Gehalt lassen sich oft nur mit unspezifischen Nebenprodukten amplifizieren. Die Verwendung von denaturierenden Agenzien, wie DMSO (Hung et al. 1990), Formamid (Sarkar et al. 1990), Glycerin oder 7-deaza-GTP, bewirken eine Auflösung solcher Strukturen, so dass die DNA durch vollständige Strangtrennung der Amplifikation zugänglich gemacht werden kann. Durch den Zusatz von TMAC (Scheinert et al. 1997) lässt sich die Amplifikation von besonders A/T-reichen DNA-Regionen fördern. BSA wirkt als unspezifischer Enzymstabilisator und vermag PCR-Inhibitoren wie EDTA, Heparin oder SDS zu binden (Pääbo et al. 1988).

#### *Vereinfachung bei der Optimierung der PCR:*

Um mehrere Optimierungsschritte zeit- und materialsparend durchführen zu können, wurde ein Gradientencycler (JMBS 0.2G, Hybaid, Heidelberg) verwendet, der es aufgrund eines selbst wählbaren Temperaturgradienten ermöglicht, verschiedene Reaktionsansätze bei bis zu 12 verschiedenen Annealing-Temperaturen gleichzeitig zu testen.

### 3.2.4 Standard PCR

Für die PCR wurde ein 25 µl Ansatz verwendet. In die Reaktionsgefäße wurden je 1 - 2,5 µl DNA (20 ng/µl) (diese Arbeiten erfolgten im „Vor-PCR“-Bereich) oder 0,1 µl PCR-Produkt (PCR-Produkte wurden nur im „Nach-PCR“-Bereich weiter verwendet) vorgelegt. Dazu wurde ein Reaktionsmix gegeben, dessen Zusammensetzung durch die oben genannten Faktoren variabel ist. Der Reaktionsmix setzt sich zusammen aus dem *Taq*-Polymerase spezifischen 10x Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Mix (20 mM), forward-Primer (25 pmol/µl), reverse-Primer (25 pmol/µl) und APUWA (steriles Aqua bidest). Die Polymerase-Kettenreaktion wird auf Eis pipettiert. Die *Taq*-Polymerase wurde dem Reaktionsgemisch zuletzt zugefügt. Zur Kontrolle möglicher Verunreinigungen, z. B. durch andere PCR-Produkte, wurde einem Reaktionsansatz anstelle von DNA APUWA (steriles Aqua bidest) zugegeben. Bei sauberem Arbeiten sollte in dieser Wasser-Probe kein Amplifikat enthalten sein. Der Thermozykler (Touch Down, Hybaid, MWG; Geneamp PCR-System 2400 bzw. 9600, Perkin Elmer) wurde vor dem Pipettieren des Reaktionsansatzes auf die Denaturierungstemperatur vorgeheizt und der fertige Reaktionsansatz sofort in den Zyklus gestellt. Nach Wahl eines spezifischen Programmes laufen die PCR-Zyklen ab, die aufgrund der PCR-Optimierung das gewünschte PCR-Produkt ohne Nebenprodukte amplifizierten. Initial wurde 5 min bei 94 – 95 °C denaturiert und der sich anschließende PCR-Zyklus 25 – 30 x wiederholt. Diese Zyklen bestanden aus einem Denaturierungsschritt für 30 s bei 94 – 95 °C, einer dem Primer entsprechenden Anlagerungstemperatur für 30 s und einer Synthesezeit von 30 s bei 72 °C. Nach weiteren 5 min bei 72 °C zur Elongation wurde der PCR-Ansatz auf 4 °C heruntergekühlt, um dessen Qualitätsverlust bei Lagerung gering zu halten.

Für das Mutationsscreening der kodierenden Region, des Introns und der 317 bp der 5' Region des *MCHR1*, für die Verifizierung detektierter Varianten sowie die Genotypisierung von SNPs wurden die PCRs optimiert. Dabei wurde für das Mutationsscreening der kodierenden Region als auch für die Verifizierung der detektierten Varianten die PCR mit Primern durchgeführt, die das erste Exon (MCHR-1 long-f/ MCHR-1 long-r; MCHR-1-f/MCHR-1-r; s. Tab. 2-4), das zweite Exon (MCHR-2a-f/MCHR-2a-r; MCHR-2b-f/MCHR-2b-r; s. Tab. 2-4) und das Intron (in drei Fragmenten; MCHR-I1a-f/MCHR-I1a-r, MCHR-I1b-f/MCHR-I1b-r und MCHR-I1c-f/MCHR-I1c-r; s. Tab. 2-4) flankierten bzw. die ersten 317 bp der 5' Region des *MCHR1* (MCHR-Prom-f/MCHR-Prom-r; s. Tab. 2-4) amplifizierten. Die entsprechenden PCR-Protokolle mit den eingesetzten Mengen und Konzentrationen der Reagenzien und den gewählten Temperaturschritten in den PCR-Zyklen sind im Anhang aufgeführt.

#### 3.2.4.1 Nested PCR

Durch eine verschachtelte PCR (nested PCR) kann die Vermehrung unspezifischer Produkte auf ein Minimum reduziert werden. Dies war besonders für die Sequenzierungen des *MCHR1*-Locus und der 8,2 kb der 5' Region sinnvoll. Hierbei wurden die Amplifikate aus der ersten PCR als Matrize für eine sich anschließende zweite PCR eingesetzt (Strachan und Read 1999).

#### 3.2.4.2 Touch-down PCR

Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung von mispriming bzw. zur Erhöhung der Spezifität ist die Touch-down PCR. Hierbei wird die Amplifizierung mit einer sinkenden Annealing-Temperatur während der PCR-Zyklen durchgeführt. Die PCR wird mit einer Annealing-Temperatur gestartet, die über der für die Oligonukleotid-Primer erwarteten Temperatur liegt. Durch die hohe Anlagerungstemperatur in den ersten Zyklen wird eine unspezifische Primer-Bindung weitgehend verhindert. Dadurch dominieren die PCR-Produkte mit der Zielsequenz (Strachan und Read 1999).

### **3.2.5 Trennung des Vor- und Nach-PCR-Bereiches**

Da die Polymerase-Kettenreaktion eine Methode ist, die sehr empfindlich auf DNA-Verunreinigung reagiert, wurden die Laborbereiche für Arbeiten vor und nach der PCR räumlich getrennt. Im Vor-PCR-Bereich wurden die DNA-Proben extrahiert und die Reaktionsgemische für die PCR angesetzt. Alle Reagenzien wurden aliquotiert, um einer Kontamination vorzubeugen. Im Nach-PCR-Bereich wurde die DNA-Amplifikation und die Auswertung der PCR durchgeführt.

### **3.2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese**

Die nach Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen erhaltenen DNA-Fragmente können zu analytischen und präparativen Zwecken durch Elektrophorese in horizontalen Agarose-Gelen ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dabei wird das Wanderungsverhalten der anionisch geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld ausgenutzt. Sie wurden in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und wanderten nach Anlegen einer Gleichspannung (100-200 V) in Richtung Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente u.a. von ihrer Größe abhängig. Lineare doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich durch die Agarose-Matrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Die Wanderung der DNA-Fragmente durch das Agarose-Gel

wird ebenso durch die Stromstärke, die Pufferbedingungen und die Agarose-Konzentration beeinflusst. Die Agarosekonzentration des Gels muss entsprechend der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente variiert werden. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit 1.000 bis zu 15.000 bp ist z. B. ein Gel mit einer Agarose-Konzentration von 0,5 % geeignet (Knippers 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die Auftrennung der PCR-Produkte (150 bis 500 bp) in der Regel eine 2,5 %ige Agarosekonzentration gewählt.

#### 3.2.6.1 Herstellung von Agarose-Gelen

Zur Herstellung des 2,5 %igen Agarose-Gels werden 5 g Agarose mit 200 ml 1 x TAE-Puffer (s.u. 2.2.2.2) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Mischung mit 20 µl Ethidium-Bromid (1 %ige Lösung) wird das Gemisch in die Gel-Elektrophorese-Kammer gegossen. In die Kammer werden nun Kämme eingesetzt, die als Platzhalter für die später benötigten Geltaschen dienen.

#### 3.2.6.2 Durchführung der Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gele werden in eine horizontale Gel-Elektrophorese-Kammer, die zuvor mit 1 x TAE-Laufpuffer gefüllt wurde, gelegt. Die Proben werden, versetzt mit Auftragspuffer (1/6 des Probenvolumens, s.u. 2.2.2.2), in die Geltaschen gefüllt. Der Auftragspuffer dient dabei der Beschwerung der Fragmente, um ein Herausdiffundieren zu verhindern sowie der Abschätzung der Laufweite des PCR-Produktes. In eine flankierende Geltasche wird ein Längenstandard (123 bp DNA ladder, Gibco BRL) aufgetragen, um die Fragmentlänge des PCR-Produktes abschätzen zu können. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei einer Spannung von 100 V (0,5 l Gelkammervolumen) oder 200 V (3 l Gelkammervolumen) für 15 – 45 min. Eine zufällige Diffusion der DNA-Fragmente wird durch die Gelmatrix verhindert und ermöglicht so die Ausbildung von Banden, welche durch den in die DNA-Helix interkalierten Farbstoff Ethidium-Bromid unter UV-Licht als orange-floureszierende Bande sichtbar gemacht werden können. Die Dokumentation des Gels erfolgt unter UV-Licht mit einem digitalen GDS Kamerasystem (Polaroid, Offenbach).

### 3.3 Detektion unbekannter Sequenzvarianten

#### 3.3.1 Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)

##### 3.3.1.1 Prinzip der SSCP

Die Einzelstrang-Konformationsanalyse (single-stranded conformation polymorphism analysis, SSCP) wurde erstmalig von Orita et al. (1989) beschrieben. Diese Methode dient der Erkennung von Sequenzveränderungen in bestimmten Genabschnitten. Dabei wird die Eigenschaft der DNA ausgenutzt, nach der Denaturierung des Doppelstranges zur Einzelstrangform eine bestimmte Tertiärstruktur einzunehmen, die auf der Primärstruktur des jeweiligen Stranges beruht und somit spezifisch für die entsprechende Basenabfolge ist. Schon bei Veränderung einer einzigen Base in dieser Abfolge ist in den meisten Fällen eine veränderte Tertiärstruktur im Vergleich zur Wildtyp-DNA zu beobachten.

Je nach Tertiärstruktur wandern die Einzelstränge unterschiedlich schnell entlang des Spannungsgradienten durch ein Polyacrylamid-Gel. DNA-Einzelstränge mit gleicher Basensequenz legen also in einer bestimmten Zeit eine bestimmte Wegstrecke im Gel zurück und werden somit in gleicher Höhe des Gels nach einer Färbung sichtbar. Nach der Färbung wird bei der mutierten Probe ein Bandenmuster sichtbar, welches sich deutlich von dem der Wildtyp-DNA unterscheidet. Da von dem veränderten Bandenmuster umgekehrt jedoch nicht auf die zugrunde liegende Änderung in der Primärstruktur geschlossen werden kann, folgt als weiterer Schritt die Sequenzierung des Genabschnitts, um die Basenänderungen zu spezifizieren. Die SSCP ist eine sehr sensitive Methode, mit der 70 - 95 % der Sequenzvarianten in entsprechend amplifizierten Genabschnitten entdeckt werden können. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch die maximale Amplifikatlänge von 200 Basenpaaren (Übersicht Hayashi 1991). Entscheidend für die Detektion dieser Einzelstrang-Banden sind neben der Größe des PCR-Fragmentes die gewählten Laufbedingungen (Sheffield et al. 1993). So kann die Sensitivität der SSCP durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Lauftemperaturen (4 °C und RT) für das jeweilige Fragment erhöht werden (Sheffield et al. 1993). Weitere Parameter, die neben dem G/C-Gehalt und der Länge des Fragmentes, die Bandenschärfe entscheidend beeinflussen sind: die Gelmatrix (Prozent Acrylamidmonomer und Vernetzungsgrad), zusätzliche Additive (Glyzerin, Polyethylenglykol), das Puffersystem, die angelegte Spannung und die Dauer des Laufes (Glavac und Dean 1993).

### 3.3.1.2 Durchführung der SSCP

Die SSCP-Methode wurde für das Mutationsscreening in der kodierenden Region des *MCHR1* sowie für die Genotypisierung des SNP rs133073 im Exon 1 des *MCHR1* in einem Teil der 620 genotypisierten Kinder und Jugendlichen sowie der 525 Eltern-Paare (Studien-Gruppe 1) angewendet. Standardisiert wurden die Läufe in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Hoefler SE 600; Hoefler Scientific Instruments) bei Raumtemperatur und 4 °C mit 0,5 x TBE als Laufpuffer und einer Fragmentgröße unter 250 bp durchgeführt. Größere Fragmente wurden zuvor mit Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente zerlegt. Die PCR-Produkte für das erste Fragment des Exons 2 (MCHR-2a-f/MCHR-2a-r; Primer Tab. 2-4) wurden mit den Restriktionsenzymen *AfuI* und *MspI* (Fermentas, St. Leon Rot) und für das zweite Fragment des Exons 2 (MCHR-2b-f/MCHR-2b-r; Primer Tab. 2-4) mit dem Restriktionsenzym *CrfI3I* (Fermentas, St. Leon Rot) geschnitten. Die PCR-Produkte für die beiden Fragmente des Exons 1 mit jeweils weniger als 250 bp (s. Tab. 2-4) mussten nicht in kleinere Fragmente zerlegt werden. Die Parameter Gelmatrix, Spannung und Laufdauer wurden experimentell bestimmt. Bei der Optimierung der SSCP-Bedingungen für das Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des *MCHR1* garantierte ein 21 %iges Polyacrylamid-Gel (37.5:1, Q Biogene, Heidelberg) bei beiden Temperaturen scharfe Bandenmuster, die eine Detektion von Sequenzvarianten ermöglichten. Das Polyacrylamid-Gel wurde wie folgt angesetzt:

<b>21 % Polyacrylamid-Gel</b>	26,5	ml	Acrylamid-Bis-Acrylamid (37,5:1)
(50 ml-Ansatz)	2,5	ml	10 x TBE
	ad 50	ml	Aqua bidest/HPLC
	500	µl	Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10 %)
	34	µl	Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED)

Durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10 %) und Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED) zum Acrylamid-Bis-Acrylamid-Gemisch wird die Polymerisation gestartet und das noch flüssige Gemisch zwischen zwei Glasplatten mit einer Schichtdicke von 0,75 mm und einer Länge von 16 cm gegossen. Als Platzhalter für die benötigten Geltaschen dienen dabei eingesetzte Kämmen. Nach einer Polymerisationszeit von zwei Stunden kann das Gel mit den Proben beladen werden.

Dafür wird der Proben-Mix bestehend aus 4 – 6 µl mit Restriktionsenzym geschnittene oder kurze PCR-Produkte sowie 8 µl Auftragspuffer (s.u. 2.2.2.2) mit sterilem Aqua bidest zu 16 µl aufgefüllt und bei 95 °C fünf Minuten lang denaturiert und umgehend auf Eis gestellt, um das Renaturieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Von jedem Proben-Mix werden jeweils

7,5 µl in die entsprechenden Taschen des SSCP-Gels aufgetragen. Nach der Auftrennung der DNA-Einzelstränge unter optimierten Laufbedingungen (s. Tab. 3-2) und in 10 x TBE-Puffer (s.u. 2.2.2.2) wird die DNA mittels einer Silberfärbung der Gele sichtbar gemacht (s.u. 3.3.1.3). Für das Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des *MCHR1* fanden die in Tabelle 3-2 beschriebenen SSCP-Bedingungen Anwendung.

**Tab. 3-2: SSCP-Bedingungen für das Mutationsscreening der kodierenden Region des *MCHR1***

Fragment	Lauftemperatur	Verwendetes Gel	Laufzeit	Angelegte Spannung
Exon 1 (MCHR-1-f/ MCHR-1-r)	Raumtemperatur	21 % Polyacrylamid	17 h	400 V
	4 °C	21 % Polyacrylamid	18 h	500 V
Exon 1 (MCHR-1 long-f/ MCHR-1 long-r)	Raumtemperatur	21 % Polyacrylamid	17 h	400 V
	4 °C	21 % Polyacrylamid	18 h	500 V
Exon 2 (MCHR-2a-f/ MCHR-2a-r)	Raumtemperatur	21 % Polyacrylamid	17 h	400 V
	4 °C	21 % Polyacrylamid	18 h	500 V
Exon 2 (MCHR-2b-f/ MCHR-2b-r)	Raumtemperatur	21 % Polyacrylamid	17 h	400 V
	4 °C	21 % Polyacrylamid	18 h	500 V

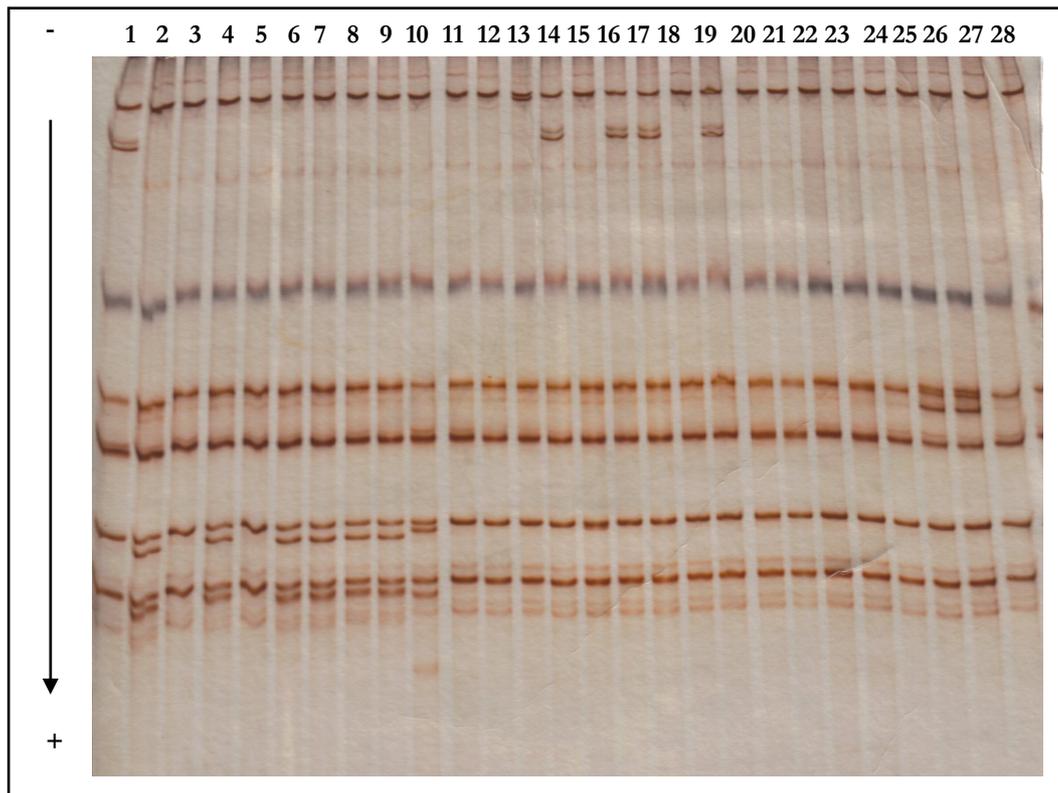
### 3.3.1.3 Silberfärbung

Nach Abschluss der Gelelektrophorese werden die Gele mit Silbernitrat gefärbt und anschließend getrocknet. Die Silberfärbung wurde nach einem modifizierten Protokoll von Budowle et al. (1991) wie folgt durchgeführt.

1. Waschen des Gels für 5 min in Aqua bidest
2. Fixieren des Gels im Fixierer (s.u. 2.2.2.3) für mindestens fünf Minuten
2. Oxidation durch zehnmütiges Schwenken in 1 %iger Salpetersäure und anschließender Waschvorgang mit Aqua bidest.
3. Färbung für 20-30 min in einer 12 mM Silbernitrat-Lösung, bei der sich Silberionen an die DNA anlagern. Es folgt ein erneuter Waschvorgang mit Aqua bidest.
4. Reduktion des Silbers mit einer Entwickler-Lösung (s.u. 2.2.2.3), welche nach einem bräunlichen Farbumschlag umgehend ausgewechselt wird.
5. Sobald diskrete Banden sichtbar werden, wird die Entwicklung mit 10 %iger Essigsäure gestoppt.
6. Um Gel-Einrisse beim Trocknen zu vermeiden, wird das Gel 5 min in 3 %iger Glycerin-Lösung geschwenkt.
7. Abschließend wird das Gel auf ein Blatt Papier transferiert und auf Filterpapier in einem Vakuum-Geltrockner (Vaccubrand, Gießen) bei etwa 37 °C etwa eine Stunde lang getrock

net. Ein Beispiel eines silbergefärbten SSCP-Gel ist in Abb. 3-2 dargestellt.

Die PCR Produkte derjenigen Individuen, die ein auffälliges SSCP-Muster aufwiesen, wurden zur Identifizierung der zugrunde liegenden Sequenzvariante am Automatischen Sequenzer LiCor 4200-2 unter Verwendung der Base ImagIR 4.0 Software (MWG Biotech) bzw. durch ein kommerzielles Sequenzierungslabor (SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH) sequenziert (s.u. 3.3.3).



**Abb. 3-2: SSCP-Gel mit aufgetrennten Fragmenten des zweiten Exons des *MCHR1*.** Jede Spur entspricht einem Probanden. Die PCR-Produkte des zweiten Fragmentes des Exon 2 (*MCHR1*-2b) wurden mit dem Restriktionsenzym *Crf13I* geschnitten und nach Denaturierung jeweils in die Geltaschen aufgetragen. Die DNA-Proben liefen in einem elektrischen Feld (400 V, 17 h) von oben nach unten und zeigen ein für das amplifizierte Fragment typisches Bandenmuster. Spuren 3, 5, 11, 12, 15, 18, 20-24 und 27: unauffällige Bandenmuster entsprechend der Wildtyp-Sequenz. Spuren 1, 2, 4, 6-10, 13, 14, 16, 17, 19, 25 und 26: auffällige Bandenmuster mit ein oder zwei zusätzlichen Banden.

### 3.3.2 Denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC)

Täglich steigt die Anzahl neu identifizierter Gene an. Insbesondere im Zuge der Untersuchung komplexer und polygen verursachter Erkrankungen wie der Adipositas, wächst zunehmend die Entwicklung und Anwendung von Hochdurchsatz-Methoden für die Suche nach Mutationen und Polymorphismen. Mit der Anschaffung des WAVE® DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Cheshire, GB) stand eine schnelle und einfach zu bedienende Hochdurchsatz-Technologie für einen Teil des Mutationsscreenings des *MCHR1* zur Verfügung.

#### 3.3.2.1 Prinzip der dHPLC

Das WAVE® DNA fragment analysis system kombiniert eine Heteroduplexanalyse mit der Säulenchromatographie in einem hochautomatisierten System. Das Prinzip basiert auf der Änderung der physikalischen Eigenschaften von DNA-Molekülen bei der Bildung von Heteroduplices aufgrund des Reannealing von Wildtyp- und Mutanten-DNA nach Denaturierung der PCR-Produkte (Oefner und Underhill 1998; Übersicht Xiao und Oefner 2001).

1. Heteroduplex-Bildung: Individuen, die heterozygot für einen Polymorphismus sind, weisen Wildtyp-Formen und mutierte Formen der DNA in einem Verhältnis von 1:1 auf. Werden die PCR-Produkte solch eines Individuums auf 95 °C erhitzt und langsam abgekühlt, lagern sich die DNA-Stränge zufällig zusammen, wobei 3 Formen entstehen: Mutierte Homoduplices, Heteroduplices und Wildtyp-Homoduplices (s. Abb. 3-3). Veränderte physikalische Eigenschaften der Heteroduplices im Vergleich zu den Homoduplices bedingen eine unterschiedliche Verweildauer an der stationären Phase der Säulen-Chromatographie. Im Bereich des Basenpaar-Mismatches bildet eine „Blase“ einen kurzen linearen Bereich zweier DNA-Einzelstränge. Diese Strukturveränderung kann experimentell genutzt werden, um Heteroduplices von Homoduplices zu unterscheiden und zu trennen und somit den Polymorphismus zu detektieren.

2. Trennung von Homo- und Heteroduplices: Die DNA lagert sich mit ihren negativ geladenen Phosphat-Gruppen an die positiv geladenen Triethylammonium-Ionen auf der stationären Phase der Säule an. Im so genannten Gradientenverlauf ändert sich die Konzentration der einzelnen Puffer unter Zunahme des Acetonitrils. Damit wird das Lösungsmittel polarer als die Matrix, wodurch sich die DNA-Fragmente von der Säule ablösen. Je länger die DNA-Fragmente sind, desto später lösen sie sich von der Säule ab. Aufgrund der „Blasen“-bildung sind die Wechselwirkungen zwischen Säulenmatrix und Heteroduplices schwächer ausgebildet als die zwischen Säulenmatrix und Homoduplices. Die Homoduplices werden somit länger an der Matrix gehalten als die Heteroduplices, was zur Trennung beider Spezies führt.

Mittels UV-Lampe, UV-Detektor und WAVEmaker Software werden die Daten in Form von Peaks sichtbar gemacht.

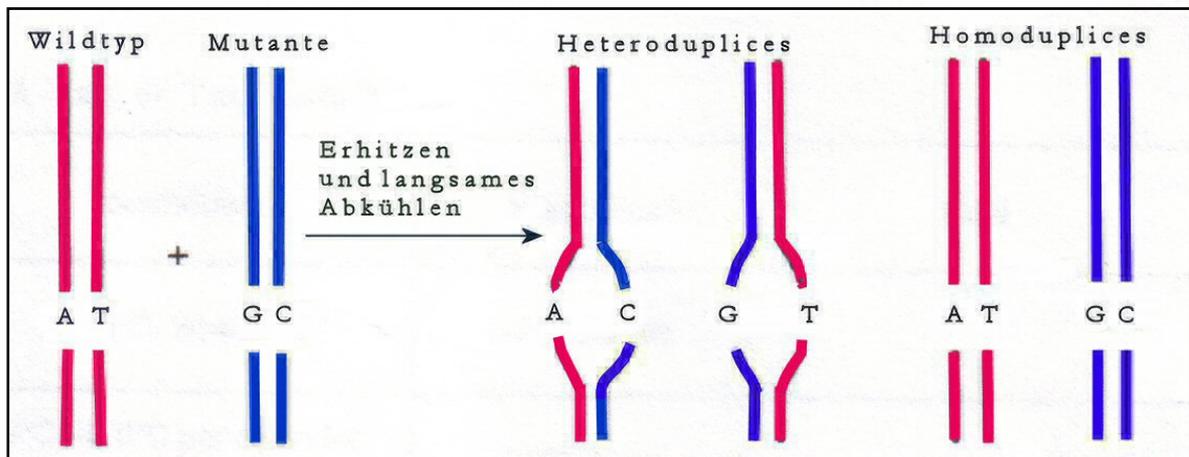


Abb. 3-3: Bildung von Heteroduplices und Homoduplices nach Denaturierung und anschließendem Re-annealing der Doppelhelix (modifiziert nach Transgenomic; Cheshire, GB).

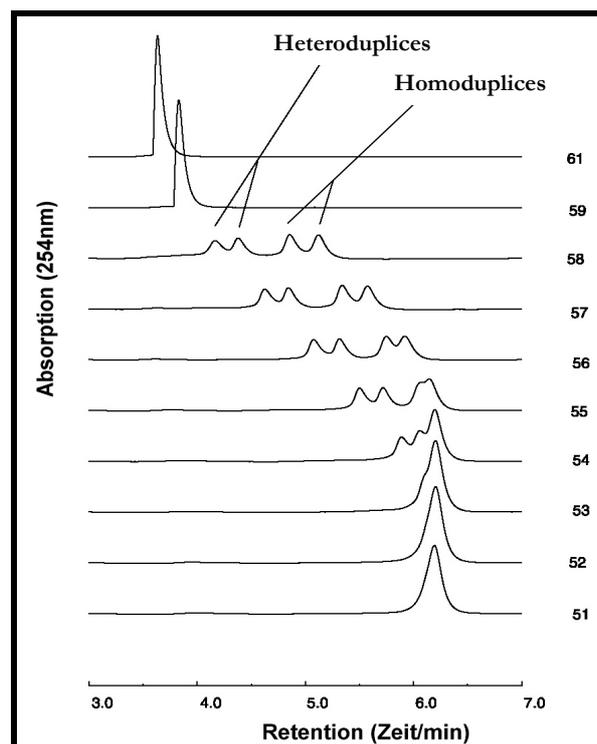


Abb. 3-4: Temperaturabhängige Auflösung von Homoduplices und Heteroduplices mit dhPLC (WAVE®); modifiziert nach Transgenomic (Cheshire, GB). Die Auftrennung von Homoduplices und Heteroduplices und damit die Detektion einer Variante sind nur in einem bestimmten Temperaturbereich, der Schmelztemperatur des entsprechenden DNA-Fragmentes möglich. Am Beispiel eines Probanden mit einer Mutation auf dem Y-Chromosoms wird die Temperaturabhängigkeit deutlich. Bei niedrigen Temperaturen ist kein Unterschied zwischen mutierten und nicht mutierten Allelen ersichtlich. Oberhalb einer Temperatur von 54 °C beginnen die heterozygoten DNA-Fragmente an der Stelle der fehlerhaften Basenpaarung zu denaturieren (modifiziert nach Taylor et al. 1998 und 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde das WAVE<sup>®</sup> System als neue, die SSCP ergänzende, Methode zum Mutationsscreening des *MCHR1* angewandt. Die genomische Sequenzierung des gesamten *MCHR1*-Locus sowie von 9.808 bp seiner 5' Region durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) ermöglichte eine Einschätzung der Sensitivität sowie der Qualität der Anwendung des neuen WAVE<sup>®</sup> DNA fragment analysis systems.

### 3.3.2.2 Durchführung der dHPLC

Das WAVE<sup>®</sup> DNA fragment analysis system wurde für das Mutationsscreening des Introns sowie der ersten 317 bp der 5' Region des *MCHR1* verwendet. Die Schmelztemperaturen für die optimale Trennung der Homo- und Heteroduplices (s. Abb. 3-4) wurden von dem Schmelzprofil für die DNA Sequenz jedes Amplikons unter Verwendung der WAVEmaker Software, Version 4.0 (Transgenomic; Cheshire, GB) bestimmt. Für die Durchführung der dHPLC wurden PCR-Reaktionen unter Verwendung von 12 ng DNA optimiert (s.u. 3.2.3.). Dafür kamen Primerpaare zur Anwendung, die das Intron zwischen den beiden Exons in drei Fragmenten MCHR-I1a-f/MCHR-I1a-r, MCHR-I1b-f/MCHR-I1b-r und MCHR-I1c-f/MCHR-I1c-r amplifizierten sowie mit einem Primerpaar MCHR-Prom-f/MCHR-Prom-r, das die ersten 317 bp der 5' Region des *MCHR1* amplifizierte (s. Tab. 2-4). Nach Ablauf der PCR-Zyklen wurden die PCR-Produkte bei 95 °C denaturiert und durch langsame Abkühlung auf Raumtemperatur in einem Thermozykler (Touch Down, Hybaid MWG, Ebersberg) wieder aneinander gelagert. Die PCR-Protokolle sind im Anhang aufgeführt. Fünf Mikroliter nicht aufgereinigter PCR-Produkte wurden auf die vorgeheizte Säule (DNASep Column Transgenomic; Cheshire, GB) geladen und mithilfe eines linearen Acetonitril-Gradienten in einem 0,1 M Triethylammonium Acetat Puffer (TEAA), pH-Wert 7,0 mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min von der Säule wieder gelöst (Puffer s.u. 2.2.2.4). Der Gradient wird durch die Mischung der beiden Puffer A (0,1 M TEAA) und B (0,1 M TEAA, 25 % Azetonitril) erzeugt. Für die Analyse des Introns und der 317 bp der 5' Region des *MCHR1* wurden die PCR-Produkte mit ansteigender Konzentration des Pufferes B mit 10 % pro Minute über 30 Sekunden und 2 % pro Minute über 4,5 Minuten von der Säule gelöst (Intron 1a und Intron 1b: 52 % auf 57 % B und 57 % auf 66 % B; Intron 1c: 50 % auf 55 % B und 55 % auf 64 % B; Promoter: 54 % auf 59 % B und 59 % auf 68 % B). Nach der Reinigung der Säule mit 100 % des Pufferes B über 30 Sekunden wurde die Säule durch Mischung der Puffer A und B entsprechend der Start-Bedingungen equilibriert. Die Chromatogramme wurden mit den als Negativ-Kontrolle mitgelaufenen Wildtyp-Proben verglichen. PCR-Amplifikate von Individuen, deren Chromatogramme von denen des Wildtyps abwichen, wurden im Sequenzierlabor SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) sequenziert.

### 3.3.3 Sequenzierung

#### 3.3.3.1 Prinzip der Sequenzierung

Die sensitivste, aber bei hohem Probendurchsatz sehr zeitaufwendige Methode zur Mutationsdetektion ist die Ermittlung der DNA-Sequenz nach der von Sanger et al. (1992) entwickelten Kettenabbruchmethode. Dieses Verfahren nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, *in vitro* eine komplementäre Kopie eines vorliegenden DNA-Einzelstranges zu synthetisieren. Die Synthese wird durch ein Oligonukleotid mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe initiiert, das sich an die komplementäre Sequenz des vorliegenden DNA-Einzelstranges anlagert. In den vier basenspezifischen Sequenzierungsansätzen wird ein Gemisch aus allen vier 2'-Desoxynukleotiden und aus den vier geringer konzentrierten ddNTPs (2', 3'-Dideoxynukleotide) eingesetzt. Die ddNTPs unterscheiden sich von den dNTPs darin, dass sie, wie an dem 2'-C-Atom, auch an dem 3'-C-Atom anstelle der Hydroxylgruppe ein Wasserstoffatom tragen. Die Kettenverlängerung erfolgt über eine Phosphordiesterbindung zwischen der Hydroxylgruppe des 5'-Kohlenstoffatoms des dNTPs oder ddNTPs und dem 3'-Kohlenstoffatom des zuvor eingebauten Nukleotids. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe der ddNTPs am 3'-Kohlenstoffatom können die in die wachsende Kette eingebauten ddNTPs zu keiner Phosphordiesterbindung an ihrem 3' Kohlenstoffatom beitragen und verursachen somit einen Kettenabbruch. Somit entsteht in jeder der 4 basenspezifischen Reaktionen eine Ansammlung von gelabelten DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge mit identischen 5'-Enden (durch den Sequenzierungsprimer festgelegt) und bezüglich der Länge variierenden 3'-Enden (festgelegt durch das jeweilige ddNTP). Die Fragmente, die sich in ihrer Länge auch nur in einem Nukleotid unterscheiden, können in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel getrennt werden. Zur Detektion der unterschiedlich langen DNA-Fragmente können die Primer am 5'-Ende oder auch die vier ddNTPs z. B. radioaktiv ( $^{33}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$ ) markiert werden (Strachan und Read 1999).

#### 3.3.3.2 Durchführung der automatischen Sequenzierung am LiCor 4200

Die automatische Sequenzierung (LiCor 4200-2, MWG Biotech, Ebersberg) basiert darauf, dass entweder ddNTPs oder die Primer basenspezifisch mit Fluorophoren gekoppelt werden. Diese emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlänge, wenn sie durch einen Laser an einem bestimmten Punkt im unteren Gelbereich angeregt werden. Ein Detektor misst diese Signale und zeichnet sie auf.

Für die Aufklärung der auffälligen SSCP-Muster des Mutationsscreenings der kodierenden Region des *MCHR1* durch die Sequenzierung am LiCor 4200-2 wurden die 5' Enden der forward- und reverse-Primer mit speziellen M13-Sequenzen versehen (s. Tab. 2-5). Vor der Sequenzierung wurde das zu sequenzierende DNA-Fragment in einer PCR-Reaktion unter Verwendung dieser mit der M13-Sequenz gelabelten Sequenzierungsprimer amplifiziert. Die entstandenen Amplifikate wurden somit mit einer zum M13-Primer komplementären Sequenz versehen, welche die Verwendung der fluoreszenz-gelabelten Primer (F-Primers wurden mit IRD 700 gelabelt und R-Primers mit IRD 800; MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) ermöglichte. Vor der Sequenzreaktion erfolgte eine Aufreinigung der Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden).

Danach wurde die Konzentration der DNA-Fragmente visuell durch Vergleich der Intensität der fluoreszierenden Banden mit der entsprechenden Bande des DNA-Längenstandards ermittelt. Hierfür wurden je 4 µl aufgereinigte DNA-Amplifikate mit 4 µl Ladungspuffer auf ein 2,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt. Ein in einer flankierenden Geltasche mitlaufender DNA-Längenstandard (2 µl low DNA mass ladder, Gibco BRL) diente als Maßstab für die Intensitätsbestimmung der Banden unter UV-Licht. Die Konzentrationen der DNA-Amplifikate konnten so nach Herstellerangaben (Gibco BRL, Eggenstein) abgeschätzt werden.

Das 'Thermo sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP' (Amersham, Braunschweig, Germany) wurde für das cycle-sequencing entsprechend der Protokolle des Herstellers verwendet. Zur Sequenzreaktion wurden für jedes DNA-Fragment zwei getrennte Reaktionsgemische für den forward- und reverse-Primer angesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 75 ng aufgereinigte Matrizen-DNA, 1 pmol forward- oder reverse-Primer, 0,7 µl DMSO sowie APUWA (steriles Aqua bidest) ad 12 µl. In vier getrennten Reaktionsgefäßen wurden jeweils 2,5 µl des Gemisches mit entweder 1 µl ddATP, ddTTP, ddGTP bzw. ddCTP (Reaktionsmische mit dNTPs und einem der Dideoxynukleotid) versetzt. Das 'cycle sequencing' beinhaltet folgende Schritte: Initiale Denaturierung 3 min 95 °C, 25 Zyklen mit je 30 sec 95 °C, 30 sec entsprechender Annealing-Temperatur des Primers, 30 sec 70 °C sowie die Elongation 3 min 72 °C. Durch Zugabe von 2,5 µl Formamid loading dye wurde die Sequenzierung nach Ablauf der Zyklen im Thermozykler gestoppt. Um die entstandenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde ein 6 %iges Long-Ranger-Sequenzgel (4,5 ml Long Ranger 50 %; 3,75 ml Harnstoff; 15,75 g 10xTBE; APUWA, steriles Aqua bidest ad 37,5 ml) verwendet. Das Gel wurde in eine Form (41 cm Kantenlänge und 0,25 mm Plattenabstand) gegossen, nachdem die Polymerisation des Gels durch Zugabe von 260 µl APS (10 %) und 37,5 µl TEMED gestartet wurde. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens zwei Stunden konnte das Gel mit den Proben beladen werden.

Der folgenden Sequenzdetektion wurde zunächst ein Vorlauf mit Laufpuffer (1 x TBE) für etwa 30 min vorangestellt. Die Geltaschen wurden dann mit jeweils 7 µl der DNA-Fragment-Proben beladen und bei einer Spannung von 1500 V aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignale der forward-Sequenzen wurden bei einer Wellenlänge von 700 nm, die der reverse-Sequenzen bei 800 nm gemessen. Die von dem Sequenziergerät erhaltenen Daten wurden mit entsprechender Software (Base ImagIR 4.0 von LiCor, Lincoln, Nebraska, USA und Image Analysis von Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) gespeichert, analysiert und bearbeitet.

#### 3.3.3.3 Durchführung der automatischen Sequenzierung am ABI 377

Für die genomische Sequenzierung des *MCHR1*-Locus sowie von 9.808 bp seiner 5' Region durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) wurden die PCRs entsprechend dem Prinzip der nested und seminested PCR (s. 3.2.4.1) optimiert. Dabei wurden die 13.378 bp durch acht sich überlappende PCR-Produkte mit der Bezeichnung A bis H abgedeckt (s. Tab. 2-6). Vier bis acht nested/seminested PCRs wurden in jeder Region durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung der Primer und des BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Kits (Applied Biosystems) am automatischen Sequenzer ABI 377 sequenziert. Die Auswertung erfolgte visuell mithilfe der Software gap4 (Bonfield et al. 1995).

Die Genotypisierung von 4 SNPs in der 5' Region des *MCHR1* (SNP001745614, rs133063, rs133064 und SNP001745615) erfolgte ebenso über die Sequenzierung am automatischen Sequenzer ABI 377 durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena).

### **3.4 Mutationsverifizierung und Genotypisierung von SNPs**

Für die sich an das Mutationscreening anschließenden Assoziations- und Kopplungsanalysen wurden zusätzliche Probanden aus größeren Studiengruppen auf bekannte und neu detektierte Mutationen oder Polymorphismen getestet. Um den Genotyp schnell und zuverlässig zu bestimmen, wurde die auf der PCR basierende Methode – die PCR-RFLP angewandt.

### 3.4.1 PCR – Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP)

Die Methode des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (PCR-RFLP) eignet sich zum Nachweis von Punktmutationen, welche eine Restriktionsschnittstelle erzeugen oder zerstören. Durch Restriktionsspaltung von PCR-amplifizierter DNA und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte können die zwei Allele des PCR-RFLP bestimmt werden. Die PCR-RFLP wurde für die Verifizierung von seltenen Varianten (s. Tab. 3-3) und die Genotypisierung von 15 SNPs (s. Tab. 2-7) im *MCHR1*-Locus sowie in 9.808 bp seiner 5' Region bzw. 21 kb seiner 3' Region angewendet.

Die PCR-RFLP wurde mit den in Tabelle 2-7 aufgeführten Primern und Restriktionsenzymen für die Genotypisierung der SNPs rs133050, rs133055, rs133062, rs2032512, rs133063, SNP001745616, SNP001745617, SNP001745618, rs133068, rs133072, SNP001745619, rs133074, rs3087592, rs133079 und rs133084 durchgeführt. Die entsprechenden PCR-RFLP-Protokolle für die eingesetzten Mengen und Konzentrationen der Reagenzien und die einzelnen Temperaturschritte in den PCR-Zyklen sind im Anhang aufgeführt. Die Genotypisierung des SNP rs133072 in 4 weiteren Populationen aus Berlin, Kopenhagen, Paris und Philadelphia (Studiengruppen 5, 7, 8 und 9) für den Versuch der Bestätigung der positiven Assoziation bzw. TDTs in den „Marburger“ Kollektiven wurde über PCR-RFLP nach dem im Anhang aufgeführten Protokoll durchgeführt. Während eines Arbeitsaufenthaltes in Berlin in der Abteilung für pädiatrische Endokrinologie des Kinderkrankenhauses der Berliner Charité erfolgte die Genotypisierung in der Studiengruppe 5. Die DNA-Proben aus Kopenhagen (Studiengruppe 7) wurden in Marburg im Labor der Klinischen Forschergruppe genotypisiert. Die Genotypisierungen des SNP rs133072 wurden durch die französischen Kooperationspartner PhD stud. D. Eberle/Dr. K. Clément (Hotel Dieu, Laboratoire de Nutrition, Paris, Frankreich) in den Populationen aus Paris (Studiengruppe 8) und durch die Kooperationspartner PhD stud. W.-D. Li/ Prof. R. A. Price (Center for Neurobiology and Behavior, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) in den Populationen aus Philadelphia (Studiengruppe 9) nach demselben PCR-RFLP-Protokoll durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen zur Verifizierung der identifizierten seltenen Varianten in der kodierenden Sequenz des *MCHR1* entsprechen denen, die zur Amplifizierung der Fragmente zum Mutationsscreening verwendet wurden (s. u. Anhang Genotypisierungsprotokolle). Die in Tabelle 3-3 aufgeführten Restriktionsenzyme ermöglichten die Verifizierung der über SSCP und dHPLC identifizierten seltenen Varianten über die PCR-RFLP.

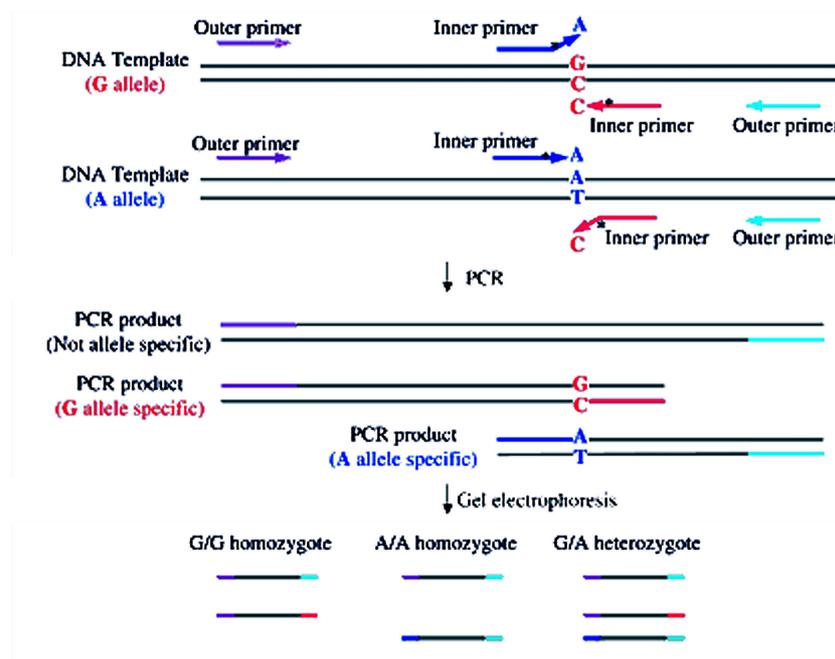
**Tab. 3-3: Restriktionsenzyme zur Verifizierung der durch SSCP und dHPLC identifizierten Varianten im *MCHR1***

Fragment	Variante	Restriktions- enzym	geschnittenes Allel	Konzentra- tion	Temperatur
Exon1	100193 C>T (T25M)	<i>Van91I (PflMI)</i>	T	10 U/ $\mu$ l	37 °C
	100202 A>T (D28V)	<i>BbsI</i>	A	10 U/ $\mu$ l	37 °C
Exon2	101962 G>A (R210H)	<i>Van91I (PflMI)</i>	A	10 U/ $\mu$ l	37 °C
	101966 C>T	<i>BstNI</i>	C	10 U/ $\mu$ l	60 °C
	102218 C>T	<i>AluI</i>	T	10 U/ $\mu$ l	37 °C
	102247 C>T (T305M)	<i>Msp17I</i>	C	10 U/ $\mu$ l	37 °C
	102283 G>A (R317Q)	<i>AluI</i>	A	10 U/ $\mu$ l	37 °C
	102491 G>A	<i>TaqI (MaeII)</i>	G	5 U/ $\mu$ l	65 °C
	102515 G>A	<i>HpbI</i>	G	5 U/ $\mu$ l	37 °C

Die Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen der DNA und schneiden beide Stränge der Helix an definierten Stellen. Die meisten dieser Enzyme erkennen Sequenzen aus vier bis acht Basenpaaren und spalten in dieser Region in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung. Die erkannten Sequenzen sind dabei oft Palindrome, sie zeigen also von beiden Seiten abgelesen die gleiche Sequenz, und die Schnittstellen sind meist symmetrisch angeordnet. Durch die Auswahl eines Enzyms können die durch die Restriktionsspaltung entstehenden DNA-Fragmentlängen experimentell variiert werden. Es wurden von den zu untersuchenden Sequenzabschnitten Restriktionskarten mit dem Online-Programm NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) erstellt, um zu ermitteln, ob ein PCR-RFLP zur Verifizierung der seltenen Varianten bzw. zur SNP-Genotypisierung anwendbar ist. Für die Genotypisierung der SNPs wurden die Oligonukleotidprimer flankierend zu der polymorphen Restriktionsschnittstelle so gewählt, dass sich die entstehenden Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe auftrennen ließen. Zu 15  $\mu$ l des jeweiligen PCR-Produktes wurden jeweils 1–3 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, 3  $\mu$ l Puffer und APUWA (steriles Aqua bidest) bis zu einem Endvolumen von 30  $\mu$ l pipettiert. Dieses Gemisch wurde mindestens 1 Stunde lang bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Größenauftrennung der Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese. Die Restriktionsspaltung wurde mit der DNA eines bekannten Genotypes kontrolliert.

### 3.4.2 Allelspezifische Amplifikation (Tetra-Primer ARMS-PCR)

Punktmutationen, die keine Restriktionsschnittstelle erzeugen oder zerstören, können über die Tetra-Primer amplification refractory mutation system-PCR (Tetra-Primer ARMS-PCR; Ye et al. 2001) nachgewiesen werden. Hierbei werden zwei allelspezifische Amplifikate unter Verwendung von zwei Primerpaaren, einem inneren und einem äußeren, erzeugt (s. Abb. 3-5). Ein äußerer forward-Primer und ein innerer reverse-Primer, der an das Wildtyp-Allel des SNPs bindet, bilden ein Amplifikat, welches das Wildtyp-Allel repräsentiert. Der innere forward-Primer, der durch ein Mismatch der zwischen seiner 3' terminalen Base und des Wildtyp-Allels des SNP gekennzeichnet ist, und der äußere reverse-Primer bilden ein Amplifikat mit dem Mutations-Allel. Um die Allelspezifität zu verbessern, wurde ein zweites Mismatch an der zweiten Position des 3' terminalen Endes der beiden inneren Primers eingeführt. Durch die Anlagerung der beiden äußeren Primer in unterschiedlichen Entfernungen von dem polymorphen Nukleotid unterscheiden sich die beiden allelspezifischen Amplifikate in ihrer Länge und sind mittels Gel-Elektrophorese auftrennbar und unterscheidbar (Ye et al. 2001).



**Abb. 3-5: Schematische Darstellung der Methode der Tetra-Primer ARMS-PCR (nach Ye et al. 2001).** Der SNP in diesem Beispiel führt zu einem Nukleotid-Austausch G/A. Unter Verwendung zweier Primerpaare werden zwei allelspezifische Amplifikate erzeugt. Dabei generiert ein Primerpaar (violette und rote Pfeile) ein Amplifikat mit dem G-Allel und das andere Primerpaar (blaue und türkisfarbene Pfeile) ein Amplifikat mit dem A-Allel. Die Allelspezifität entsteht durch ein Mismatch zwischen der 3' terminalen Base eines inneren Primers und der DNA-Matrize. Ein zweites Mismatch (\*) wird an Position -2 von dem 3' Ende aus in die inneren Primer eingebaut (Ye et al. 2001).

Für die Genotypisierung der SNPs rs133073 und rs133069 wurden Tetra-Primer ARMS-PCRs mit den in Tabelle 2-8 aufgeführten Primern optimiert. Die Primerpaare wurden mit dem Online-Programm [http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public\\_html/primer1.html](http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html) erstellt. Die entsprechenden Tetra-Primer ARMS-PCR-Protokolle, die die eingesetzten Mengen und Konzentrationen der Reagenzien und die einzelnen Temperaturschritte in den PCR-Zyklen angeben, sind im Anhang aufgeführt.

### 3.4.3 Hochdurchsatzgenotypisierung

Die Genotypisierung des SNP rs133072 in der KORAS2000 Population (Studiengruppe 6), die 4.056 Individuen umfasst, erfolgte im Institut für Epidemiologie des GSF-Nationalen Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg durch die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. H.-E. Wichmann und Dr. T. Illig. Im Anschluss an eine PCR wurden eine MassEXTEND Reaktion und danach eine MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry) Analyse entsprechend des Hersteller-Protokolls (hME™ Sequenom, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

## 3.5 Expressionsanalysen

Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena):

Für die *in silico* Analysen, wurden die über BLAST Suche (GenBank release date 01/12, version 127.0; Übersicht Altschul et al. 1997) identifizierten ESTs assembliert und mit dem Datenbankeintrag Z86090 (genomischer Klon, der *MCHR1* enthält) sowie dem Datenbankeintrag AB063174 (mRNA von *MCHR1*) unter Verwendung von gap4 (Bonfield et al. 1995) verglichen. Für nested and seminested RT-PCRs wurden die humanen cDNA Bibliotheken Panel MTC Panel I and II und humane Präadipozyten Zelllinien SGBS (Wabitsch et al. 2001) im undifferenzierten (1 d) und differenzierten (14 d) Stadium verwendet (s. Tab. 2-3 und 2-9). Die PCR Produkte wurden wie oben beschrieben sequenziert, assembliert und visuell ausgewertet.

## 3.6 Promoter-Vorhersage

Die Promoter-Vorhersage wurde in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) durchgeführt:

Es wurden die Programme FirstEF ("first exon finder", <http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF>; Davuluri et al. 2001), NNPP ("neural network promotor prediction", <http://www.fruitfly.org>; Waibel et al. 1989; Reese and Eeckman 1995), PromoterInspector und ELDorado (<http://www.genomatix.de>) verwendet.

## 3.7 Funktionelle *in vitro* Studien

### 3.7.1 Pharmakologische Studien

Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena):

*Plasmide:* Für die pharmakologischen Studien wurde eine nested RT-PCR in einer gepoolten humanen cDNA Bibliothek, kombiniert mit allen Geweben des MTC Panels I, durchgeführt (s. Tab. 2-10). Das PCR-Produkt wurde in das Plasmid pCR2.1-TOPO (s. Tab. 2-3) kloniert. Alle rekombinanten Plasmide wurden wie oben beschrieben resequenziert.

Kooperationspartner: Dr. C. Hess/Prof. T. Gudermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg):

Später wurde die kodierende Sequenz des *MCHR1*, beginnend mit Met<sup>1</sup> in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (s. Tab. 2-3) kloniert. Um eine immunologische Detektierung zu ermöglichen, wurden die *MCHR1*-Klone nach dem Met<sup>1</sup> mit einem N-terminalen Epitop aus 9 Aminosäureresten (YPYDVPDYA) markiert, der vom Influenza Virus Hämagglutinin-Protein (HA-tag) stammt.

*Zellkultur und Transfektion:* COS-7 Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) kultiviert, das mit 10 %igem fetalen Kälber-Serum, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde. HEK293 Zellen wurden auf Earle's modified Eagle Medium (Earle's MEM) mit denselben Supplementen kultiviert. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte bei 37°C und in einem Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub>. Für die funktionellen Assays, wurden COS-7 und HEK293 Zellen unter Verwendung von METAFECTENE, einem Transfektionsreagenz, transient transfiziert.

*Inositol Phosphat-Assay:* Um die Inositol-Phosphat Bildung zu messen, wurden transfizierte COS-7 Zellen mit 2 µCi/ml Myo-[2-<sup>3</sup>H] Inositol (15,0 Ci/mmol) für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit einer serumfreien DMEM-Lösung, die 10 mM LiCl enthält, gewaschen und mit 10<sup>-11</sup> – 10<sup>-5</sup> MCH für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die durch den Agonisten MCH induzierten Anstiege der intrazellulären Inositol-Phosphat-Spiegel wurden wie von Wittau et al. (2000) beschrieben, bestimmt.

*cAMP-Assay:* Für die cyclischen AMP Assays wurden die HEK293 Zellen entweder mit dem  $\beta_2$ adrenergen Rezeptor ( $\beta_2AR$ ) zusammen mit *MCHR1* oder zusammen mit dem *M<sub>2</sub> muscarinischen Acetylcholin Rezeptor* (*M<sub>2</sub>R*) (0,5 µg/Well für jedes Konstrukt, 12-Well-Platte) kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 2 µCi/ml von [2,8-<sup>3</sup>H]-adenine (24,2 Ci/mmol)

markiert und über Nacht inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden einmal in serumfreiem Earle's MEM, das 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine enthält, gewaschen und für 20 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte 1 Stunde lang eine Stimulierung mit 10 µM Isoproterenol und 1 µM MCH bzw. 100 µM Carbachol. Die Reaktionen wurden durch Aspiration des Mediums und Zugabe von 1 ml 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Der cAMP-Gehalt der Zellextrakte wurde mittels Chromatographie bestimmt (Salomon et al. 1974). Die Bildung von cAMP wird als Prozent des Mittelwertes der isoproterenol-stimulierten cAMP-Bildung (100 %) ausgedrückt. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten, wovon jedes doppelt durchgeführt wurde, dargestellt.

*Immunologische Studien:* Um die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche, der mit einem N-terminalen HA-tag markiert ist, zu bestimmen, wurde ein indirekter zellulärer Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA; Schöneberg et al. 1997) verwendet, der "cell surface ELISA" genannt wird. Hierfür wurden COS-7 Zellen in 24-Well-Platten eingesetzt, transient transfiziert (0,2 µg der Plasmid DNA und 0,6 µl von METAFECTENE/Well), vorsichtig ohne die Zellmembran zu zerstören mit Formaldehyd fixiert, und mit Peroxidase-markierten Anti-HA monoklonalen Antikörpern inkubiert. Nach dem Entfernen des Überschusses ungebundener AK wurde eine gebrauchsfertige 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin-Substrat-Lösung zur Entstehung des Farbkomplexes zugegeben. Nach 20 min wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Farbentwicklung bei 450 nm unter Verwendung eines ELISA Leseegerätes (Microplate Reader Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont) gemessen.

### 3.7.2 Promoter-Studien

Kooperationspartner: Dr. C. Platzer (Institut für Anatomie II, Jena):

Genomische Fragmente von 1.181 bp Länge (Pos. 98943-100122 im Datenbankeintrag Z86090, stromaufwärts von Met<sup>1</sup>) wurden über eine PCR mit Primern amplifiziert, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nco*I bzw. *Xba*I einfügen (s. Tab. 2-10) und direkt in den pGL3-Basic Luziferase Reporter Vector kloniert. PC12 Ratten Pheochromocytom Zellen wurden von der 'Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' (Braunschweig, Deutschland; s. Tab. 2-3) bezogen und in RPMI 1640-Medium mit 10 %igem Pferdeserum und mit mycoplasmen- und endotoxinfreiem fetalen Kälber-Serum (5 %) in Kollagen-beschichteten Flaschen kultiviert. Die Transfektionen und Luziferase Assays wurden wie von Brenner et al. (2003) beschrieben, durchgeführt und berechnet. Variiert wurde jedoch die Elektroporation, die mit 3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 0,15 ml durchgeführt wurde und die Induktion, für die 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml/Well in Abwesenheit oder in Gegenwart von 500 µM dibutyryl-cAMP (dbcAMP) für 24 h kultiviert wurden.

### 3.8 Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten durch die Kooperationspartner PhD stud. F. Geller/ Prof. H. Schäfer (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg).

Zur Einschätzung der Relevanz neu identifizierter Varianten in dem Kandidatengen *MCHR1* oder von in verschiedenen Studiengruppen und Populationen genotypisierten SNPs wurden verschiedene statistische Ansätze verwendet. Sie bestimmen eine mögliche Abweichung vom Mendelschen Gesetz der unabhängigen Vererbung.

#### 3.8.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beschreibt die Genotyphäufigkeiten aus den Anteilen der verschiedenen Allele eines Gens in einer Population. Mit dieser Formel lassen sich die Häufigkeiten der drei möglichen Genotypen (homozygot Allel 1; heterozygot Allel 1 und Allel 2; homozygot Allel 2) in einer Population mit Hilfe der experimentell bestimmten Allelfrequenz berechnen. Die berechneten Genotypfrequenzen sollten mit den experimentell gefundenen Häufigkeiten übereinstimmen (Strachan und Read 1999).

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: $1 = p^2 + 2pq + q^2$ p: Allelhäufigkeit des Allels $A_1$ und q: Allelhäufigkeit des Allels $A_2$
--

Folgende Ursachen können eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bewirken: Auslese durch nicht zufällige Paarung ('assortative mating'), Inzucht, Spontanmutationen, Selektion, genetische Drift, Gründereffekt und Migration oder experimentelle Fehler bei der Genotypisierung (Strachan und Read 1999).

#### 3.8.2 Assoziation

Eine Assoziation liegt vor, wenn ein merkmalsverursachendes Allel eines genetischen Markers signifikant häufiger in der Gruppe der Merkmalsträger als in der Gruppe der Kontrollpersonen auftritt (Übersicht Lander und Schork 1994). Eine positive Assoziation zwischen einem Phänotyp und einem bestimmten Allel eines Markers kann verschiedene Ursachen haben (Strachan und Read 1999):

- a) Direkte Ursache: Das Vorkommen eines Allels A erhöht die Empfänglichkeit für eine Krankheit D. Der Besitz von Allel A ist weder notwendig noch ausreichend, um die Krankheit D zu entwickeln, aber es erhöht die Wahrscheinlichkeit. In diesem Fall würde man die gleiche Assoziation des Allels A mit der Krankheit in jeder untersuchten Population erwarten, sofern nicht die Ursachen für die Krankheit in den Populationen variieren.
- b) Natürliche Selektion: Personen mit der Krankheit D haben höhere Überlebenschancen und können sich fortpflanzen, wenn sie Träger des Allels A sind.
- c) Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium): Dies setzt voraus, dass die meisten Chromosomen mit Krankheitsallelen in der Bevölkerung von einem oder wenigen Chromosomen der Vorfahren abstammen. Das untersuchte Allel verursacht zwar nicht den Phänotyp, wird aber gemeinsam mit der merkmalsverursachenden Mutation vererbt. Das Allel liegt also mit einem zweiten, dem Phänotyp verursachenden Allel im Kopplungsungleichgewicht. So könnte ein Gen in der Nähe des Allel A – Locus' Mutationen bei Menschen mit der Krankheit D tragen. Das spezielle Allel am A-Locus, das mit der Krankheit D assoziiert ist, könnte in verschiedenen Populationen unterschiedlich sein.
- d) Bevölkerungs-Stratifikation (population stratification, admixture) beruht auf einem Fehler bei der Auswahl der zu vergleichenden Populationen. Diese findet man z. B. in großen gemischten Populationen mit verschiedenen ethnischen Gruppen. Sowohl die Krankheit als auch das Allel A kommen in einer ethnischen Gruppe besonders häufig vor. Lander und Schork (1994) führen hierfür ein Beispiel an: Der Phänotyp ‚Fähigkeit mit Stäbchen essen zu können‘ wird in Zusammenhang mit einem HLA-Locus (‘human leukocyte antigen system’) gestellt. Asiaten weisen jedoch eine völlig andere Allelverteilung der HLA-Allele auf als die kaukasische Bevölkerung. Natürlich wird eine Assoziation gefunden, die aber kaum etwas über den Phänotyp ‚Fähigkeit mit Stäbchen essen zu können‘ aussagt, sondern lediglich auf unterschiedlichen Verteilungen der HLA-Allele in beiden ethnischen Gruppen beruht.
- e) Statistische Artefakte: Assoziationsanalysen werden oftmals an einer großen Anzahl von Loci durchgeführt, jeweils mit verschiedenen Allelen, um eine Assoziation mit einer Krankheit finden zu können. Die p-Werte müssen demnach für die Anzahl der Tests korrigiert werden. Häufig erfolgen keine oder nur unzureichende Korrekturen, sodass gelegentlich Assoziationen publiziert werden, die in Folgestudien nicht repliziert werden können.

Bei einer aufgefundenen Assoziation kann u. U. nicht zwischen einer allelischen Assoziation mit dem merkmalsstragendem Locus und einer Assoziation durch unangemessen ausgewählte Kontrollgruppen unterschieden werden. Korrekt eingesetzte Kontroll-Gruppen sollten bis auf das zu untersuchende Merkmal in allen Eigenschaften mit der Fallgruppe gleich sein. Um das Stratifizierungsproblem umgehen zu können, können Assoziationsstudien mit internen Kontrollen verwendet werden. Die zwei prinzipiellen Methoden sind der Haplotype Relative Risk-Test (HRR) und der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT; Strachan und Read 1999; s. u. 2.8.3.2.).

### 3.8.2.1 Durchführung einer statistischen Assoziationsanalyse

Allel-basierende Methoden haben den Vorteil, dass ihnen keine Modellannahme des Erbganges vorausgeht. Sie vergleichen nicht-verwandte Merkmalsträger mit nicht-verwandten Kontroll-Personen innerhalb einer Population. Infolgedessen können in der statistischen Berechnung Nicht-parametrische Tests, die zwei unabhängige relative Häufigkeiten vergleichen, wie etwa der Chi-Quadrat Test ( $\chi^2$ ; Vierfeldertafel, siehe Tab. 3-4), angewandt werden. Die Durchführung eines statistischen Tests umfasst die folgenden Schritte:

**Formulierung der Hypothese und Formulierung der Verteilungsannahmen:** Es wurde eine Null-Hypothese ( $H_0: p_1 = p_2$ ) und eine zweiseitige Alternativ-Hypothese ( $H_1: p_1 \neq p_2$ ) aufgestellt. Die Häufigkeiten  $p_{1,2}$  stehen für die jeweiligen Anteile der Grundgesamtheiten mit einer bestimmten Ausprägung des Phänotyps; z. B. der gesunden Probanden ( $p_1$ ) und Erkrankten ( $p_2$ ). Die Null-Hypothese nimmt daher an, dass die Verteilung der Allele unabhängig von dem Phänotyp ist, während die Alternativ-Hypothese annimmt, dass die Verteilung der Allele von dem Phänotyp abhängig ist, dass also eine Assoziation vorliegt. Da explorative Untersuchungen durchgeführt wurden, war kein Vorwissen bezüglich der Allelverteilung, des genetischen Modells, etc. vorhanden. Infolgedessen wurde die Alternativ-Hypothese zweiseitig formuliert, da kein Wissen über die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer  $p_{1,2}$  bestand ( $p_1 < p_2$  oder  $p_1 > p_2$ ). Nach einer initialen Assoziationsstudie wurden für den Versuch der Bestätigung der Assoziation unabhängige Populationen untersucht, bei denen die Alternativ-Hypothese einseitig formuliert werden konnte.

**Wahl der Stichproben:** Es wurde entschieden, welche Stichproben der verschiedenen Phänotypen zum Einsatz kommen, und ob einzelne Probanden oder Familien untersucht werden.

**Wahl der Teststatistik:** Die Teststatistiken wurden mittels  $\chi^2$ -Test durchgeführt (s. Tab. 3-4). Diese Vierfeldertafeln haben einen Freiheitsgrad; d. h. bei gegebenen Randsummen kann nur ein Feld frei gewählt werden.

**Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  (Signifikanzniveau) und kritischer  $\chi^2$ -Wert:** Das Signifikanzniveau begrenzt den Fehler erster Art, nämlich die Null-Hypothese  $H_0$  abzulehnen, obwohl diese richtig ist. Es wurde immer  $\alpha = 0,05$  vorgegeben.

**Durchführung der Teststatistiken und Interpretation der Ergebnisse:** Der errechnete  $\chi^2$ -Wert indiziert, ob der Unterschied zwischen den zwei beobachteten relativen Häufigkeiten mit der Null-Hypothese verträglich ist oder nicht. Die kritische Grenze für den  $\chi^2$ -Wert bei einem Freiheitsgrad und einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,05$  liegt bei 3,84. Werte von  $\chi^2 > 3,84$  sprechen gegen die Null-Hypothese und führen zu ihrer Verwerfung. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit für die Null-Hypothese an und wird mit einem p-Wert  $< 0,05$  als signifikant angesehen (Sachs 1974, S. 270 ff). Er gibt die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums an.

### 3.8.2.2 Teststatistiken

#### $\chi^2$ -Test

Mit dem  $\chi^2$ -Test wurden folgende Hypothesen geprüft:

$H_0$  = Die Verteilung der Allele ist unabhängig von dem Phänotyp.

$H_1$  = Die Verteilung der Allele ist abhängig vom Phänotyp (Assoziation).

**Tab. 3-4: Schema einer Vierfeldertafel beim  $\chi^2$ -Test**

		Merkmal 1 (Allel)	
		Allel A <sub>1</sub>	Allel A <sub>2</sub>
Merkmal 2 (Gewicht)	Fälle	a	b
	Kontrollen	c	d

Die festgestellten Häufigkeiten der Allele in den einzelnen Stichproben wurden in eine Vierfeldertafel (s. Tab. 3-4) eingetragen.

*Asymptotischer  $\chi^2$ -Test nach Pearson*

Für den Test auf Assoziation der Allele wurde der  $\chi^2$ -Test nach Pearson verwendet.

$$\chi^2 \text{ Test nach Pearson: } \chi^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

*Cochran-Armitage Trend Test*

Bei festgestellter Signifikanz des asymptotischen  $\chi^2$ -Test nach Pearson wurden nachfolgend die Unterschiede zwischen den Genotypen mit dem Cochran-Armitage Trend Test untersucht.

*Hierarchisches Test-Verfahren*

Für die initialen, confirmatorischen und *post hoc* Vergleiche der Allel- und Genotypfrequenzen wurde ein hierarchisches Test-Verfahren angewendet. Assoziationstests wurden nach der Genotypisierung von SNPs in der kodierenden Region des *MCHR1* in einer adipösen Studiengruppe und einer nicht-adipösen Kontrollgruppe durchgeführt. Bei festgestellter signifikanter Assoziation des initialen zweiseitigen Assoziationstests wurden zur Bestätigung der initial festgestellten Assoziation zusätzliche einseitige Assoziationsanalysen an unabhängigen Studiengruppen durchgeführt. Bei Bestätigung der initialen Assoziationsbefunde durch den zweiten unabhängigen Assoziationstest wurde eine große Anzahl an adipösen und nicht-adipösen Studiengruppen genotypisiert und in einem *post hoc* Test die Allel- und Genotypfrequenzen aller an dem betreffenden SNP genotypisierten Individuen in einem weiteren zweiseitigen Assoziationstest verglichen.

*Explorative Assoziationstests*

Angesichts der Hyperaktivität, des verminderten Körpergewichts und Körperfettgehalts sowie der verminderten Empfänglichkeit für eine diät-induzierte Adipositas (Marsh et al. 2002) vorzugsweise bei männlichen *MCHR1* Knockout-Mäusen (Chen et al. 2002) wurden geschlechtsspezifische *post hoc* Tests bei den untersuchten adipösen Kindern und Jugendlichen (Studiengruppe 1) durchgeführt für: a) das in einem Fragebogen durch die Mütter angegebene Niveau der motorischen Aktivität ihres adipösen Kindes in verschiedenen Altersstufen b) den prozentualen Körperfettanteil und c) den prozentualen Fettanteil an der Gesamtenergieaufnahme.

Die Mütter von 399 der insgesamt 525 genotypisierten Kinder und Jugendlichen von den familien-basierenden Studien (Untergruppe der Studiengruppe 1) wurden zu altersabhängigen (Altersgruppen < 1, 1-6, 7-10, 11-14 und > 15 Jahre) motorischen Aktivitäts-Niveaus ihrer

Kinder in einem Fragebogen-Interview befragt. Die Mütter wurden gebeten, die motorische Aktivität ihres Kindes als höher, ähnlich oder geringer im Vergleich zu Kindern gleichen Alters einzuschätzen.

Die prozentuale Körperfettmasse wurde über die Körper-Impedanz-Analyse (Data Input 2000-S) bei 491 adipösen Kindern und Jugendlichen bestimmt. Der prozentuale Fettanteil an der Gesamtenergieaufnahme wurde mithilfe des Leeds Food Frequency Questionnaire (L-FFQ; Leeds Food and Nutrition Survey; Cooling und Blundell 1998) bei 140 adipösen Kindern und Jugendlichen beurteilt.

#### *Haplotypfrequenzen*

Die Frequenzen der aus vier SNPs (rs133068, rs133072, rs133073 und rs133074) bei 525 Trios (Studiengruppe 1) gebildeten Haplotypen wurden bestimmt und das Kopplungs-Ungleichgewicht zwischen diesen SNPs wurde mit dem Programm EH, Version 1.11 (Xie und Ott 1993) ermittelt.

### **3.8.3 Kopplung**

Kopplung ist im Gegensatz zur Assoziation eine spezifische genetische Beziehung von Genloci (nicht Allelen oder Phänotypen). Kopplung an sich führt zwar innerhalb von Familien zu einer Assoziation, nicht jedoch in der Allgemeinbevölkerung, d. h. bei nicht verwandten Personen. Unter der Annahme, dass zwei angeblich nicht verwandte Personen eine Krankheit D von einem fernen gemeinsamen Vorfahren geerbt haben, können sie dazu tendieren, spezielle miteinander verwandte Allele zu teilen, die stark mit der Krankheit D gekoppelt sind. Wo sich Populationen zusammenschließen, schließen sich auch Kopplung und Assoziation zusammen (Strachan und Read 1999).

Kopplung liegt somit vor, wenn zwei oder mehrere Gene, die auf benachbarten Genloci zu finden sind, gemeinsam vererbt werden. Je geringer ihr Abstand zueinander ist, desto häufiger werden sie gekoppelt vererbt. Dabei wird von etwa 1 % Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen zwei Genloci ausgegangen, die 1 cM voneinander entfernt liegen. Ist die gemeinsame Vererbung dieser Genloci überzufällig häufiger als es nach einer unabhängigen Vererbung beider Loci zu erwarten wäre, liegt Kopplung vor. Um statistische Signifikanz mit einem p-Wert  $< 0,05$  zu erreichen, nimmt man Kopplung an, wenn die Wahrscheinlichkeit für Kopplung gegenüber der Wahrscheinlichkeit gegen Kopplung mindestens 1000 : 1 beträgt. Dieses Verhältnis entspricht umgerechnet einem LOD-Score von 3,0 (Passarge et al. 2001).

### 3.8.3.1 Durchführung von statistischen Kopplungsanalysen

Für die Berechnung der Kopplung wird die Vererbung von Genotyp und Phänotyp innerhalb von Familien und Stammbäumen untersucht. Tests zur Berechnung von Kopplung finden andererseits Verwendung, um Stratifikationsprobleme (s.u. 3.8.2) umgehen zu können. Berechnungen von Kopplung erfolgen ebenso im Rahmen der Durchführung von Genom-Scans zur Suche nach der genomischen Region, in der mit großer Wahrscheinlichkeit das Kandidatengen liegt, das den zu untersuchenden Phänotyp verursacht. Da Adipositas eine polygene Krankheit ist, muss nach Kopplung in mehreren chromosomalen Regionen gesucht werden. Die Stärke des Einflusses einzelner Gene auf die Ausprägung des Phänotyps wird bei polygenen Erkrankungen schwächer eingeschätzt als die der Gene, die für monogene Erkrankungen verantwortlich sind. Daraus werden die Schwierigkeiten ersichtlich, die sich bei der Suche nach Kandidatengen für polygene Erkrankungen, wie der Adipositas, ergeben.

### 3.8.3.2 Teststatistiken

#### *Haplotype Relative Risk-Test (HRR)*

Die Methode des Haplotype Relative Risk-Test (HRR; Falk und Rubinstein 1987) ist eine der so genannten Assoziationsstudien mit internen Kontrollen. Im Gegensatz zur normalen Fall-Kontroll-Studie werden hier 3 Personen einer Familie für einen Marker genotypisiert – der Patient und die beiden Eltern. Die Daten werden wie bei einer herkömmlichen Fall-Kontroll-Studie behandelt, ausgenommen der Tatsache, dass die Kontrolle durch keine reale Person verkörpert wird, sondern durch die zwei Allele, die die Eltern nicht an ihr erkranktes Kind weitergegeben haben (Strachan und Read 1999). Damit wird Populationsstratifikation vermieden und eventuelle Fehltypisierungen durch Segregationsmustervergleich können erkannt werden.

#### *Transmission-Disequilibrium-Test (TDT)*

Die am häufigsten zur Vermeidung von Stratifikationsproblemen angewendete Methode der Assoziationsstudien mit internen Kontrollen ist der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT; Spielman et al. 1993; Schaid 1998). Der TDT nutzt die Assoziationsinformation der elterlichen Allele, die nicht an das erkrankte Kind weitervererbt wurden. Zum anderen nutzt er zusätzlich die Kopplungsinformation der Verteilung der elterlichen Allele bei der Vererbung (Segregation; Spielman et al. 1993). Der TDT etablierte sich als ein wichtiger Test für die gleichzeitige Überprüfung von Assoziation und Kopplungsungleichgewicht für ein Markerallel (Schaid und Sommer 1994).

Es werden Familien mit einem oder mehreren von der Krankheit betroffenen Nachkommen für einen SNP typisiert. Dabei ist es irrelevant, ob jedes Elternteil betroffen ist oder nicht. Um zu testen, ob das Markerallel  $M_1$  mit der Krankheit assoziiert ist, werden diejenigen Eltern ausgewählt, die heterozygot sind. Je geringer jedoch die Allelfrequenz des Markers ist, desto seltener sind heterozygote Eltern und umso größer ist die für einen aussagekräftigen Hinweis erforderliche Fallzahl. Der Test vergleicht die Transmissionsrate des untersuchten Allels  $M_1$  mit der Rate der Nicht-Transmission des untersuchten Allels  $M_1$ . Die Häufigkeiten der transmittierten und nicht-transmittierten elterlichen Allele werden in eine Vierfeldertafel eingetragen (s. Tab. 3-5).

Zu Beginn werden folgende Hypothesen aufgestellt:

$H_0$ : Allel  $A_1$  wird ebenso häufig transmittiert wie nicht transmittiert, d. h. Allel  $A_1$  hat keinen Einfluss auf den Phänotyp.

$H_1$ : Die Transmissionsrate und die Rate der Nicht-Transmission für das Allel  $A_1$  sind unterschiedlich. Es liegt ein Transmissions-Ungleichgewicht vor.

Diesen Hypothesen liegt der Grundgedanke zugrunde, dass ein Markerallel, das mit einem Krankheitsallel gekoppelt ist, überzufällig häufig gemeinsam mit dem Krankheitsallel an ein erkranktes Kind vererbt wird. Wenn keine Kopplung vorliegt, wird das Markerallel nach den Mendelschen Regeln mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % weitervererbt.

**Tab. 3-5: Schema einer Vierfeldertafel beim TDT**

		Transmittiert	
		Allel $M_1$	Allel $M_2$
Nicht- Transmittiert	Allel $M_1$	a	b
	Allel $M_2$	c	d

Da nur die Daten der heterozygoten Eltern verwendet werden, wurde das Transmissions-Ungleichgewicht ( $\chi^2$ -Wert) nach folgender Gleichung berechnet (Terwilliger und Ott 1992):

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

Wenn sowohl Kopplung als auch Assoziation zwischen Marker und Allel bestehen, sind b und c verschieden groß. B stellt dann die Häufigkeit der transmittierten  $M_1$ -Allele (welche den mutmaßlich mit der Krankheit gekoppelten Marker darstellen) und c die Häufigkeit der transmittierten  $M_2$ -Allele (welche mutmaßlich nicht mit dem Krankheitsallel gekoppelt sind), dar.

Nach festgestellter positiver Assoziation an zwei SNPs im kodierenden Bereich des *MCHR1* in initialer, bestätigender und *post hoc* Analyse wurden an denselben sowie zwei weiteren SNPs zusätzlich die Eltern der adipösen Kinder und Jugendlichen typisiert. Nachdem auch in den initialen TDT-Analysen Transmissions-Ungleichgewichte festgestellt werden konnten, wurden zur Bestätigung der Transmissions-Ungleichgewichte ein weiterer TDT in einer unabhängigen Stichprobe sowie ein *post hoc* TDT bei insgesamt 525 Familien durchgeführt. Die TDT-Berechnungen an den deutschen (Studiengruppe 1) und amerikanischen Familien (Studiengruppe 9) wurden unter Verwendung des Programms Genehunter, Version 2.0 beta (Kruglyak et al. 1996) durchgeführt. Ebenso wurden Haplotyp-TDTs mit bis zu vier SNPs für alle 525 Trios (Studiengruppe 1) durchgeführt.

#### 3.8.4 Individuelle und epidemiologische Risikoberechnung

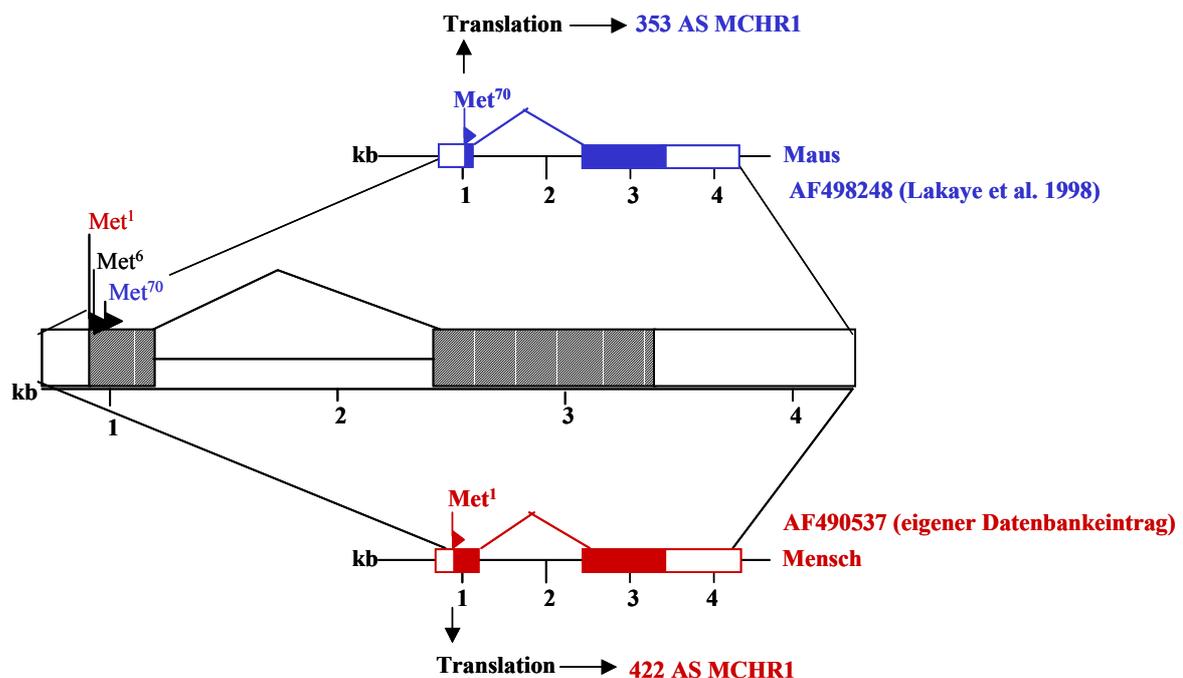
Die Berechnungen des individuellen und epidemiologischen Risikos erfolgte durch den Kooperationspartner Prof. H. Schäfer (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg):

Für den mutmaßlich kodierenden SNP rs133072 des *MCHR1* wurden das relative genotypische Risiko Adipositas ( $\text{BMI} \geq 90.$  Perzentile) zu entwickeln, die Frequenz des "Risiko"-Allels sowie das attributable Risiko in dem Kollektiv aller für diesen SNP typisierten 525 Trios (Untergruppe der Studiengruppe 1) mittels Berechnung der höchsten Wahrscheinlichkeit geschätzt (Schaid and Sommer, 1993). Diese Schätzungen sind nur unter der Annahme von randomisierter (Zufalls-) Paarbildung und des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts valide. Weil diese Annahmen für extrem adipöse Individuen aufgrund des vermuteten ‚assortative mating‘ bei adipösen Menschen nicht valide sein können (Hebebrand et al. 2000), wurden die Schätzungen des relativen genotypischen Risikos auch in Abhängigkeit von den elterlichen Genotypen berechnet (Schaid and Sommer 1993). Die Konfidenzintervalle für das relative genotypische Risiko wurden, wie bereits durch Schaid und Sommer (1993) beschrieben, berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kandidatengen *Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons*

Das Melanin-konzentrierende Hormon-System stellt einen zentralen Signalweg dar, der wie unter 1.6 ausführlich beschrieben, einen entscheidenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und die Energiehomöostase hat. Damit ist das Gen für den *Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons (MCHR1)* ein plausibles Kandidatengen für die Gewichtsregulation (s.u. 1.3.2). Zu Beginn einer eingehenden Untersuchung eines Gens muss eine Aufklärung der Struktur des betreffenden Gens anhand der in genomischen Datenbanken verfügbaren Informationen erfolgen. Hierfür wurden v. a. folgende Datenbanken verwendet: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), UCSC (<http://cedar.genetics.soton.ac.uk>) und ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>).



**Abb. 4-1: *MCHR1* bei Mensch und Maus.** Mitte: Struktur des *MCHR1* mit drei potentiellen Kodons für den Translationsstart (Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup>, Met<sup>70</sup>). Oben: *MCHR1* der Maus auf Chromosom 15. Translationsstart bei der Maus ab dem Methionin, das dem humanen Met<sup>70</sup> entspricht. Der mRNA-Datenbankeintrag für die Maus (AF 498247) enthält nur die CDS (1.062 bp). Die 5'UTR und 3'UTR wurde durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/ Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) ermittelt. Alle ESTs (74) des Unigene Klusters Mm.221060 wurden unter Verwendung des gap4 assembliert. Die resultierende Konsens-Sequenz wurde mit der genomischen DNA (AY049011, CAAA01177985.1 aus der UCSC Maus Datenbank Stand: Feb. 2003) verglichen. Unten: *MCHR1* des Menschen auf Chromosom 22q13.2. Das Gen wurde im Vergleich des mRNA Eintrages AF490537 mit der genomischen DNA (Z86090) dargestellt. Beim Menschen existieren drei potentielle Kodons für den Translationsstart (Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup>, Met<sup>70</sup>). Die CDS, die mit dem Met<sup>1</sup> beginnt, entspricht einem 422 Aminosäuren-MCHR1 (JC7080).

*MCHR1* (auch bekannt als *GPR24* oder *SLC1*) wurde beim Menschen auf Chromosom 22q13.2 lokalisiert (Kolakowski et al. 1996). Zur Zeit existieren vier humane *MCHR1* mRNA Datenbankeinträge: a) AF490537 (Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer: Abteilung für Genom Analyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena; s. u. 4.5), b) AB063174 (Shimomura et al. 1999), c) BC001736 d) BC021146 (s. Abb. 4-1). Jede der *MCHR1* mRNAs enthält drei potentielle Startkodons, Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup> und Met<sup>70</sup>, die zu Proteinen mit 422 Aminosäuren (Shimomura et al. 1999), 417 Aminosäuren bzw. 353 Aminosäuren korrespondieren (s. Abb. 4-1). Die Kodons für den Translationsstart bei Maus (AF498248; Ehringer et al. 2001) und Ratte (AF008650; Lakaye et al. 1998) entsprechen dem humanen Met<sup>70</sup>, wodurch bei diesen beiden Spezies ein MCHR1 Protein von 353 Aminosäuren entsteht. Aus diesem Grund sind MCHR1 Proteine mit 422 Aminosäuren bzw. 417 Aminosäuren, sofern sie existieren, für den Menschen spezifisch. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Translationsstart ab dem ersten Methionin (Met<sup>1</sup>) angenommen (s. u. Anhang: Genomische Struktur des *MCHR1* mit Sequenzvarianten) und damit ein 422 Aminosäuren-MCHR1 aufgrund der Expressionsergebnisse der Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena; AF490537, s. u. 4.5) postuliert.

Das humane *MCHR1* mit insgesamt 3.583 bp besteht aus zwei Exons und einem Intron. Das Exon 1 umfasst 502 bp, das Intron 1.214 bp und das zweite Exon 1.867 bp. Die 5' untranslatierte Region (UTR) umfasst 213 bp und die 3' UTR mit 887 bp enthält drei PolyA-Signale. Die humane mRNA mit 2.369 bp Länge umfasst somit eine CDS von 1.269 bp (AF490537; Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer [Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena]; s. u. 4.5).



**Abb. 4-2: *MCHR1* und 10 kb der 5' Region beim Menschen. Darstellung der für das Mutationsscreening verwendeten Methoden:** 1. SSCP (blau): 1.269 bp CDS; 2. dHPLC (rot): 213 bp 5' UTR, 162 bp 5' Region sowie 1.214 bp Intron; 3. Sequenzierung (grün) durch die Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena): 9.807 bp der 5' Region, 844 bp des 3' UTR sowie alle rot und blau markierte Regionen zur Verifizierung der mittels SSCP und dHPLC ermittelten Ergebnisse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der erste bislang beschriebene Mutationsscreen am *MCHR1* durchgeführt (s. Abb. 4-2). Aufgrund der publizierten Befunde bei Maus und Ratte zum MCH und MCHR1 (s. u. 1.6) wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine eventuell zu detektierende loss-of-function Mutation mit Untergewicht assoziiert bzw. eine gain-of-function Mutation mit Übergewicht assoziiert sein müsste.

## 4.2 Mutationsscreening des *MCHR1*

### 4.2.1 Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des *MCHR1*

Für das Mutationsscreening der kodierenden Sequenz (CDS) des *MCHR1*, die sich aus dem Exon 1 mit 289 bp und dem Exon 2 mit 980 bp zusammensetzt, wurde die Methode der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP; s. u. 3.3.1) angewendet. Bei dem Mutationsscreening der kodierenden Sequenz des Gens für den *Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons* (*MCHR1*) beginnend mit Met<sup>1</sup> von 215 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen (Untergruppe der Studiengruppe 1, s. Tab. 2-1) und 230 untergewichtigen Studenten (Studiengruppe 2, s. Tab. 2-1) konnten heterozygote Träger von vier stummen und sieben Missense-Varianten (6 nicht-konservative Aminosäuren-Austausche; Allelfrequenzen < 1 %) sowie zwei bereits bekannte SNPs rs133072 und rs133073 im Exon 1 detektiert werden (s. Tab. 4.1; s. u. Anhang: Genomische Struktur des *MCHR1* mit Sequenzvarianten).

Zur Verifizierung der seltenen Varianten und der SNPs wurden verschiedene Methoden angewendet. Nach der Sequenzierung der Proben mit auffälligem SSCP-Muster wurden die gefundenen Varianten unter Verwendung einer alternativen Methode noch einmal bestätigt. Die PCR-RFLP (s. u. 3.4.1) wurde für den kodierenden SNP rs133072 (s. Tab. 2-7) sowie die seltenen Varianten T25M, D28V, R210H, 101966 C>T, 102218 C>T, T305M, R317Q, 102491 G>A und 102515 G>A (s. Tab. 3-3) angewendet. Die Varianten P377S und T411M ließen keine Schnittstelle eines Restriktionsenzym verschwinden bzw. entstehen und der Versuch des Nachweises über Tetra-Primer ARMS-PCR scheiterte aufgrund von nicht löslichen Problemen bei der Optimierung der PCR. Aus diesem Grund erfolgte neben dem Nachweis über die Sequenzierung ein zusätzliches Screening der PCR-Fragmente mittels dHPLC (s. u. 3.3.2). Für den SNP rs133073 (s. Tab. 2-8) eignete sich als Methode zur Verifizierung und Genotypisierung in größeren Studiengruppen die Tetra-Primer ARMS-PCR (s. u. 3.4.2).

Außer den beiden SNPs rs133072 und rs133073 wurde nur eine Missense-Variante (D28V, s. Abb. 4-12 bis 4-14) sowohl bei übergewichtigen als auch bei untergewichtigen Personen detektiert (s. Tab. 4-1). Vier seltene Missense-Varianten: T25M (s. Abb. 4-16 bis 4-18), T305M (s. Abb. 4-3 bis 4-5), R317Q (s. Abb. 4-6 bis 4-8) und T411M (s. Abb. 4-12, 4-13 und 4-15) wurden ausschließlich bei adipösen Probanden und zwei nur bei untergewichtigen Kontroll-Personen identifiziert: R210H (s. Abb. 4-19 bis 4-21) und P377S (s. Abb. 4-9 bis 4-11; s. Tab. 4-1).

Tab. 4.1: Seltene Varianten und die SNPs rs133072 und rs133073 im *MCHR1* bei 215 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 230 untergewichtigen Studenten

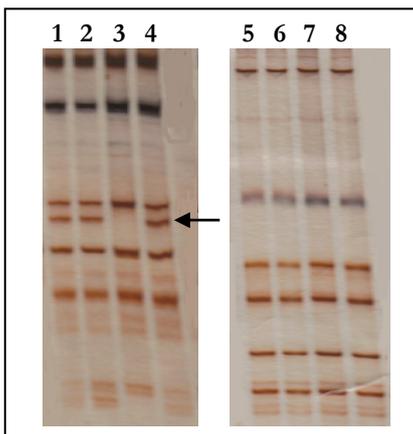
Studien- gruppe	Basenposition <sup>+</sup>	Exon (E)	Einfluss auf die Aminosäure- sequenz <sup>++</sup>	Position im <i>MCHR1</i> <sup>*</sup>	Frequenz der Hetero- zygoten <sup>#</sup>
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n = 215)	100193 C>T	E 1	T25M	N-ter ED	0.005
	100202 A>T	E 1	D28V**	N-ter ED	0.014
	101966 C>T	E 2	stumm	IL 2	0.005
	102218 C>T	E 2	stumm	TM 5	0.009
	102247 C>T	E 2	T305M	IL 3	0.005
	102283 G>A	E 2	R317Q	IL 3	0.005
	102491 G>A	E 2	stumm	C-ter	0.005
	102565 C>T	E 2	T411M**	C-ter	0.014
	100213 G>A	E 1	D32N	N-ter ED	0.507
	100365 T>C	E 1	stumm	N-ter ED	0.535
gesunde unter- gewichtige Studenten (n = 230)	100202 A>T	E 1	D28V	N-ter ED	0.009
	101962 G>A	E 2	R210H	IL 2	0.004
	102462 C>T	E 2	P377S	TM7	0.004
	102515 G>A	E 2	stumm	C-ter	0.004
	100213 G>A	E 1	D32N	N-ter ED	0.465
	100365 T>C	E 1	stumm	N-ter ED	0.491

<sup>+</sup> humaner BAC, der *MCHR1* (Z86090) enthält; <sup>++</sup> humaner *MCHR1* (Jc7080); \* entsprechend [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/protview?peptide=ENSP00000249016](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/protview?peptide=ENSP00000249016); # die Genotyp-Frequenzen weichen nicht vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ab; \*\* drei Probanden mit einem Haplotyp [D28V;T411M]; grau hinterlegt: SNPs rs133072 (100213 G>A) und rs133073 (100365 T>C); ED: extrazelluläre Domäne, N-ter: N-terminal, TM: Transmembrandomäne, IL: intrazelluläre Schleife, EL: extrazelluläre Schleife, C-ter: C-terminal

#### 4.2.1.1 Nicht-konservative Missense-Varianten an konservierten Aminosäurepositionen zwischen verschiedenen Species

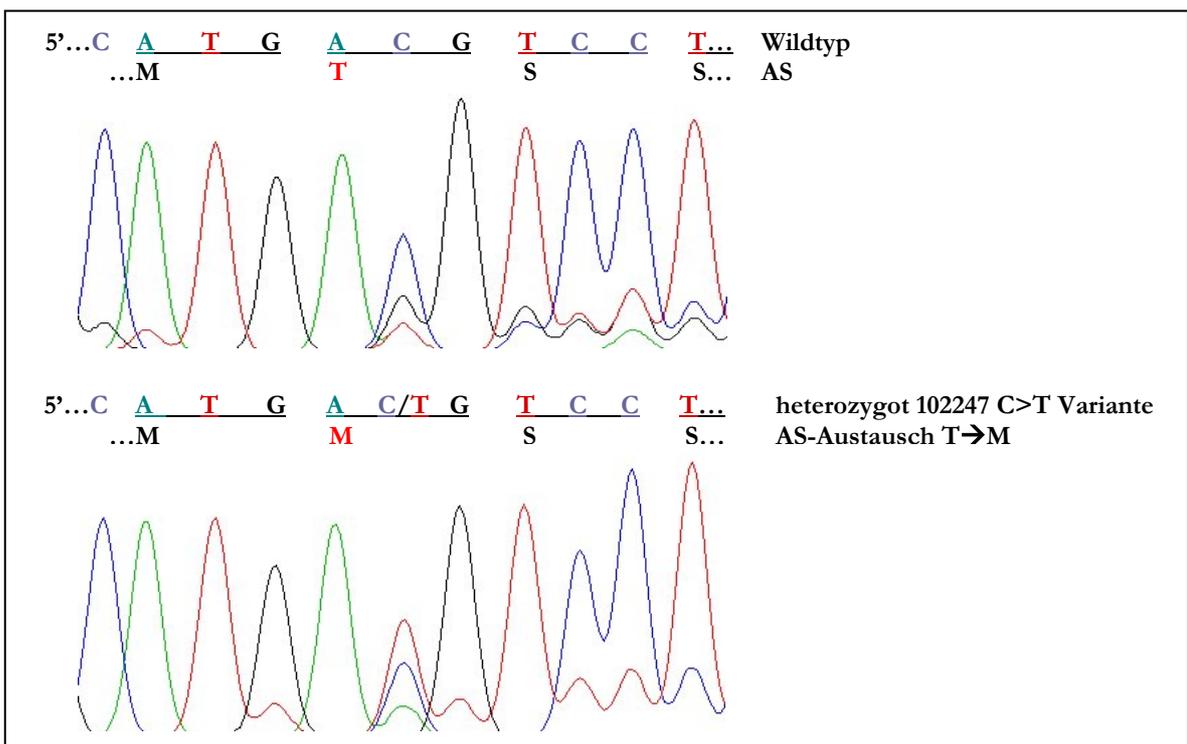
Vier der insgesamt sechs seltenen nicht-konservativen Missense-Varianten befinden sich an Aminosäurepositionen, die zwischen Menschen, Mäusen und Ratten konserviert sind: T305M (s. Abb. 4-3 bis 4-5), R317Q (s. Abb. 4-6 bis 4-8), P377S (s. Abb. 4-9 und 4-11) und T411M (s. Abb. 4-12, 4-13 und 4-15).

Die Genotypisierung der DNA der Eltern und der Schwester des extrem adipösen Mädchens (BMI 43,3 kg/m<sup>2</sup>, ≥99. BMI-Perzentile; 13,1 Jahre) mit der T305M Variante (s. Abb. 4-3 bis 4-5) ergab, dass sowohl der Vater (BMI 36,1 kg/m<sup>2</sup>, ≥99. BMI-Perzentile) als auch die Schwester (BMI 25,1 kg/m<sup>2</sup>, 99. BMI-Perzentile; 10,7 Jahre) Träger der T305M Variante und extrem adipös waren. Die Mutter (BMI 25,6 kg/m<sup>2</sup>, 80. BMI-Perzentile) trug diese Variante nicht.

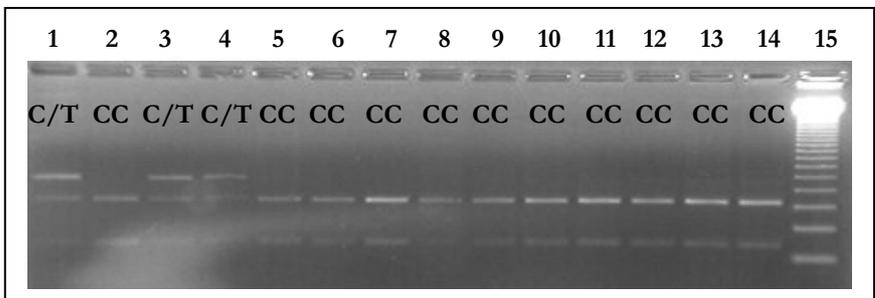


**Abb. 4-3: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante T305M (102247 C>T).**

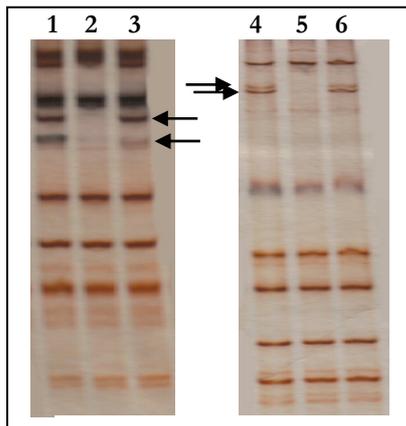
Ein Nachweis ist nur bei 4°C möglich.  
 Links 4°C: Spur 4: extrem adipöses Mädchen mit zusätzlicher Bande; Spur 3: Mutter ohne auffälliges Bandenmuster; Spur 2: Vater mit zusätzlicher Bande; Spur 1: Geschwisterkind mit zusätzlicher Bande.  
 Rechts RT: Spuren 5-8: die selbe Familie in derselben Anordnung ohne verändertes Bandenmuster.



**Abb. 4-4: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante T305M (102247 C>T).**  
 Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 909-915; unten: Sequenz der Träger der Variante T305M, die an Position des Kodons 305 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot C/T ist.



**Abb. 4-5: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante T305M (102247 C>T).** Enzym *Msp17I* schneidet das C-(Wildtyp)-Allel (GA↓CGTC) an Position des Kodons 305 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: extrem adipöses Mädchen heterozygot C/T; Spur 2: Mutter homozygot CC; Spur 3: Vater heterozygot C/T; Spur 4: Geschwisterkind heterozygot C/T; Spur 5-14: Kontroll-Personen homozygot CC; Spur 15 123 bp Längenmarker.

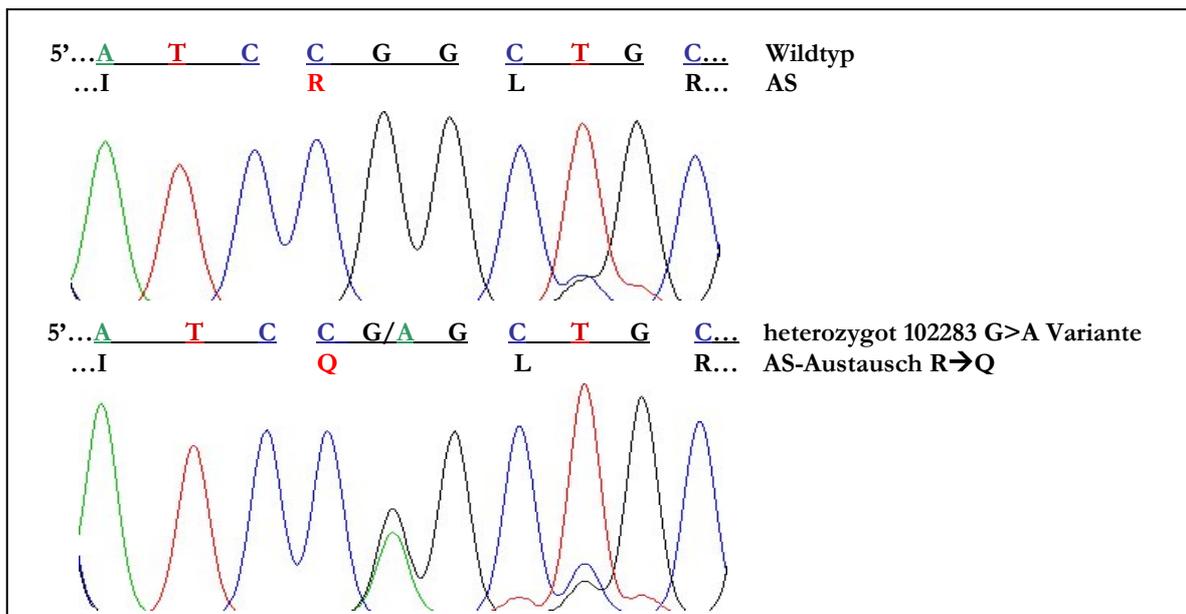


**Abb. 4-6: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante R317Q (102283 G>A).**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.

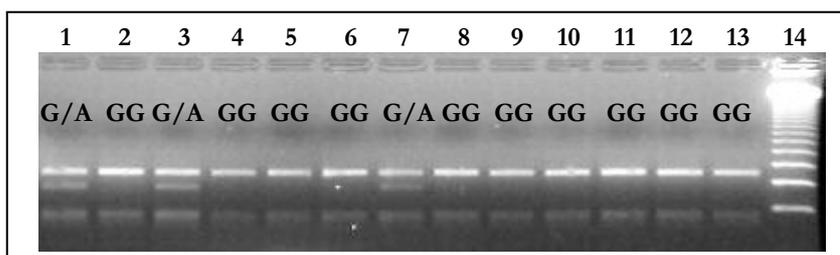
Links 4°C: Spur 3: extrem adipöses Mädchen mit zwei zusätzlichen Banden; Spur 2: Mutter ohne auffälliges Bandenmuster; Spur 1: Vater mit zwei zusätzlichen Banden.

Rechts RT: Spur 6: extrem adipöses Mädchen mit zwei zusätzlichen Banden; Spur 5: Mutter ohne auffälliges Bandenmuster; Spur 4: Vater mit zwei zusätzlichen Banden.



**Abb. 4-7: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante R317Q (102283 G>A).**

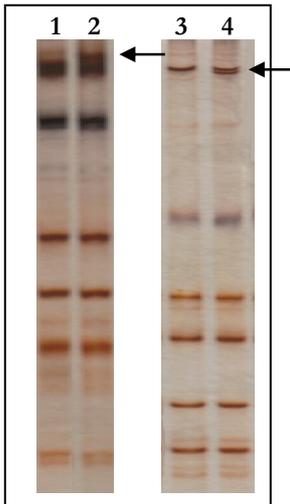
Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 946-955; Unten: Sequenz der Trägerin der Variante R317Q, die an Position des Kodons 317 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot G/A ist.



**Abb. 4-8: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante R317Q (102283 G>A).**

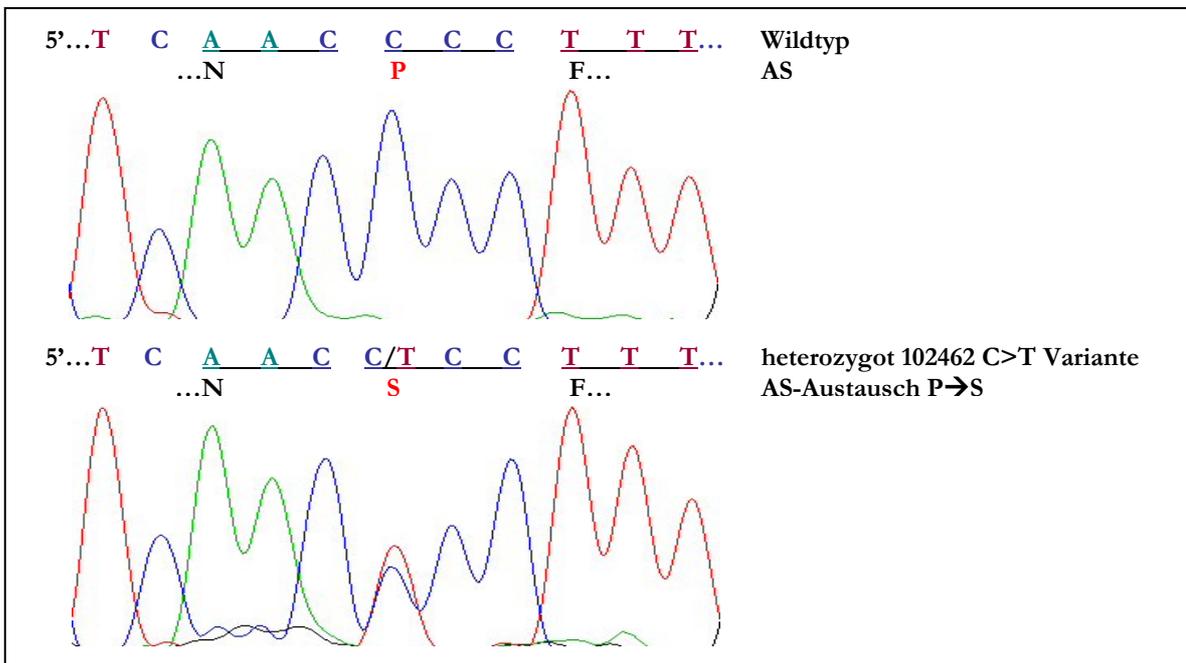
Enzym *AluI* schneidet das A-Allel (AG↓CT) an Position des Kodons 317 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: extrem adipöses Mädchen heterozygot G>A; Spur 2: Mutter homozygot GG; Spur 3: Vater heterozygot G/A; Spur 7: laborinterne Kontroll-Person heterozygot G/A; Spur 4-6, 8-13 Kontroll-Personen homozygot GG; Spur 14: 123 bp Längenmarker.

Der Vater (BMI 44,7 kg/m<sup>2</sup>; ≥99. BMI-Perzentile) des extrem adipösen Jugendlichen (BMI 43,2 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile; 15,3 Jahre) mit der R317Q Variante (s. Abb. 4-6 bis 4-8) hatte diese Variante transmittiert. Die Mutter (BMI 40,8 kg/m<sup>2</sup>, ≥99. BMI-Perzentile) trug diese Variante nicht.

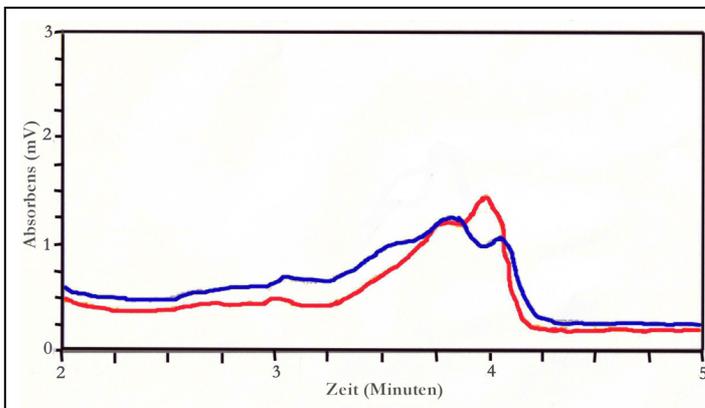


**Abb. 4-9: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante P377S (102462 C>T).**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.  
 Links 4°C: Spur 1: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster;  
 Spur 2: untergewichtige Studentin mit zusätzlicher Bande.  
 Rechts RT: Spur 3: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster;  
 Spur 4: untergewichtige Studentin mit zusätzlicher Bande.



**Abb. 4-10: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante P377S (102462 C>T).**  
 Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 1124-1134; unten: Sequenz der Trägerin der Variante P377S, die an Position des Kodons 377 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot C/T ist.



**Abb. 4-11: dHPLC Analyse mittels WAVE (Transgenomic).**

dHPLC Peak der untergewichtigen Studentin (blau), die an der Position der Variante P377S (102462 C>T) heterozygot C/T ist. Er weicht von dem Peak der Kontroll-Person (rot) ab, die an der Position der Variante P377S (102462 C>T) homozygot für C ist.

Von den Eltern der untergewichtigen Trägerin (BMI 16,55 kg/m<sup>2</sup>, 0. Perzentile; 23,40 Jahre) der P377S Variante (s. Abb. 4-8 bis 4-11) war keine DNA verfügbar.

Drei extrem adipöse Jugendliche (BMI 44,6 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile, 18,83 Jahre; BMI 35,8 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile, 16,6 Jahre; BMI 41,3 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile; 15,3 Jahre) trugen zwei der Missense-Varianten (D28V und T411M; s. Abb. 4-12 bis 4-15). Zwei von ihnen hatten beide Varianten von ihrer Mutter geerbt, weshalb die beiden Mutationen offensichtlich einen Haplotyp [D28V; T411M] bilden. Die Genotypisierung der DNA der Eltern von zwei adipösen Probanden mit dem Haplotyp [D28V; T411M] (die DNA der Eltern des dritten Trägers dieses Haplotyps war nicht verfügbar) ergab, dass eine adipöse Mutter (BMI 35,2 kg/m<sup>2</sup>; 99. -Perzentile) und eine normalgewichtige Mutter (BMI 22,6 kg/m<sup>2</sup>; 55. Perzentile) jeweils den Haplotyp [D28V; T411M] auf ihr Kind übertragen hatten. Der Vater (BMI 25,0 kg/m<sup>2</sup>; 54. BMI-Perzentile) der zweiten adipösen Probandin war nicht Träger dieser Variante.

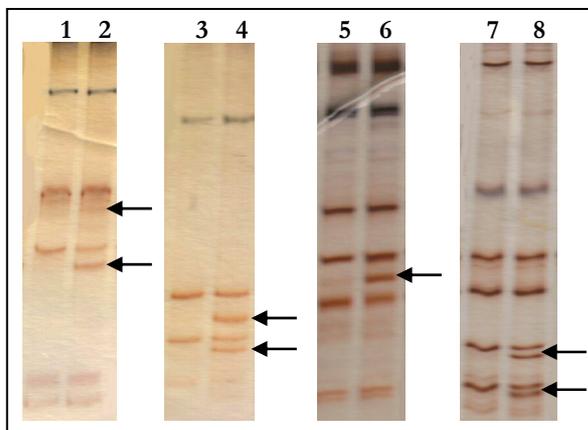


Abb. 4-12: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit den Varianten D28V (100202 A>T; zwei linke Gele) und T411M (102565 C>T; zwei rechte Gele).

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.

Spur 1 (4°C) und Spur 3 (RT): Kontrolle ohne auffälliges Bandenmuster; Spur 2 (4°C) und Spur 4 (RT): Proband mit zwei zusätzlichen Banden; Spur 5 (4°C) und Spur 7 (RT): Kontrolle ohne auffälliges Bandenmuster; Spur 6 (4°C) Proband mit zusätzlicher Bande; Spur 8: Proband mit 2 zusätzlichen Banden.

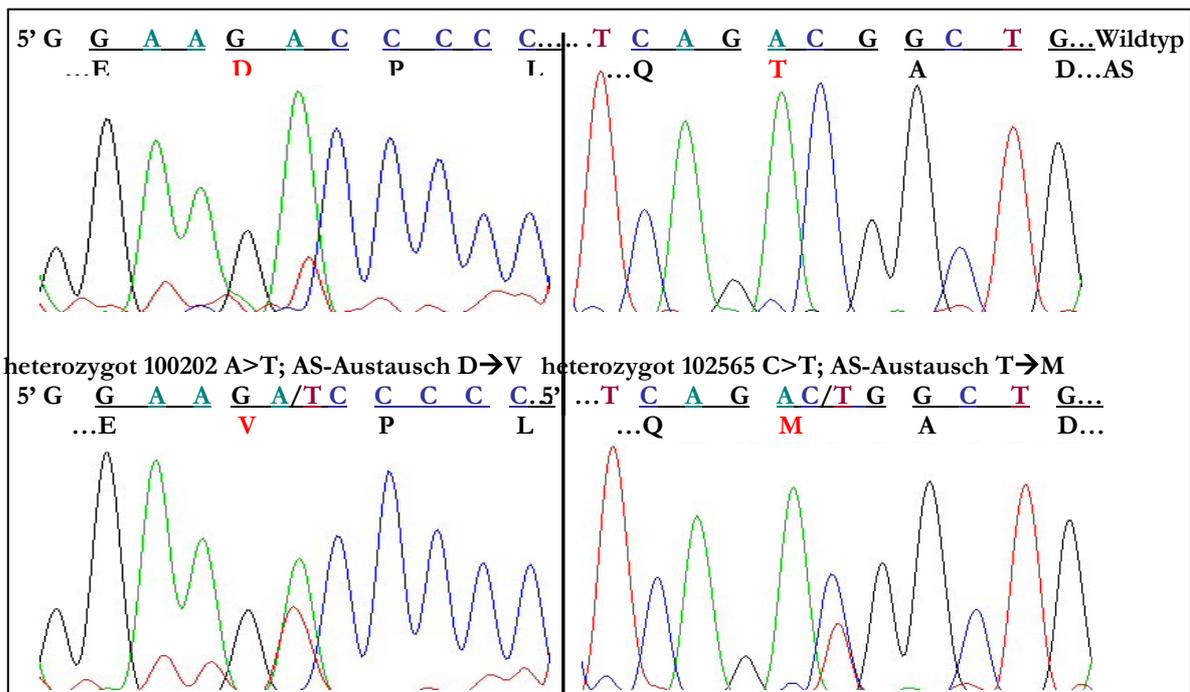
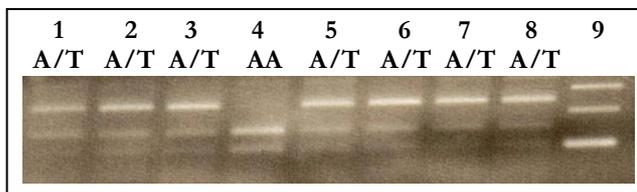
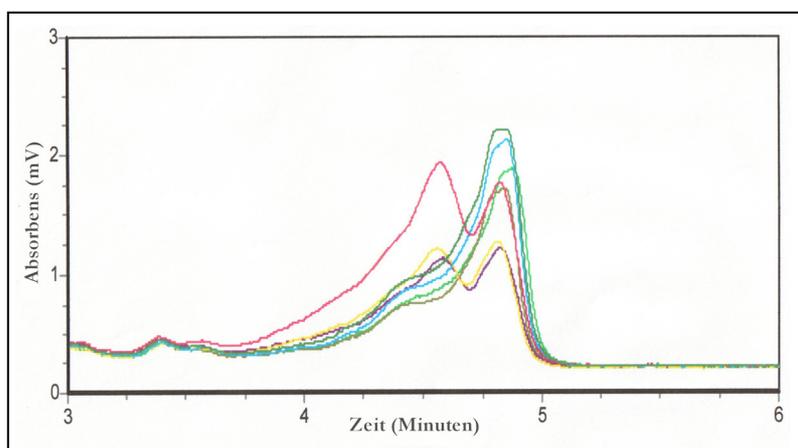


Abb. 4-13: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Varianten D28V (100202 A>T; links) und T411M (102565 C>T; rechts). Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 78-88 bzw. 1227-1237; unten: Sequenz der drei Träger der Varianten D28V (100202 A>T) und T411M (102565 C>T), die an Position des Kodons 28 (bezüglich Met<sup>1</sup>) heterozygot A/T bzw. des Kodons 411 heterozygot C/T sind.

Im Gegensatz dazu trugen zwei untergewichtige Kontroll-Personen (BMI 19,2 kg/m<sup>2</sup>, 3. BMI-Perzentile, 22,80 Jahre; BMI 16,8 kg/m<sup>2</sup>, 0. BMI-Perzentile, 23,16 Jahre) nur die D28V-Variante.



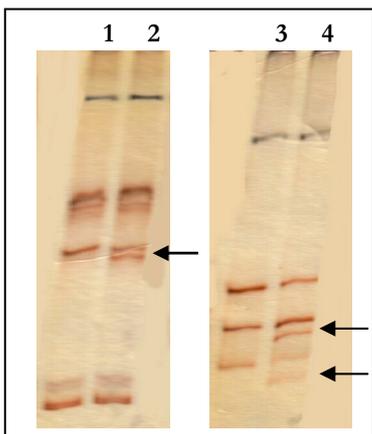
**Abb. 4-14: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante D28V (100202 A>T).** Enzym *Bbs*I schneidet das A-Allel (GAAGACCC↓CC) an Position des Kodons 29 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des *MCHR1*. Spur 1: extrem adipöser Jugendlicher heterozygot A/T; Spur 2: extrem adipöse Jugendliche heterozygot A/T; Spur 3: Mutter heterozygot A/T; Spur 4: Vater homozygot AA; Spur 5: extrem adipöser Jugendlicher heterozygot A/T; Spur 6: Mutter heterozygot A/T; Spur 7 und 8: untergewichtige Kontroll-Personen heterozygot A/T; Spur 9: 123 bp Längenmarker.



**Abb. 4-15: dHPLC Typisierung mittels WAVE (Transgenomic; Cheshire, GB).** dHPLC Peaks der drei extrem adipösen Jugendlichen (rot, gelb, violett), die an der Position der Variante T411M (102565 C>T) heterozygot C/T sind. Sie weichen von den Peaks derjenigen Kontroll-Personen ab, die an dieser Position homozygot für C sind (dunkelgrün, türkis, hellgrün, grau).

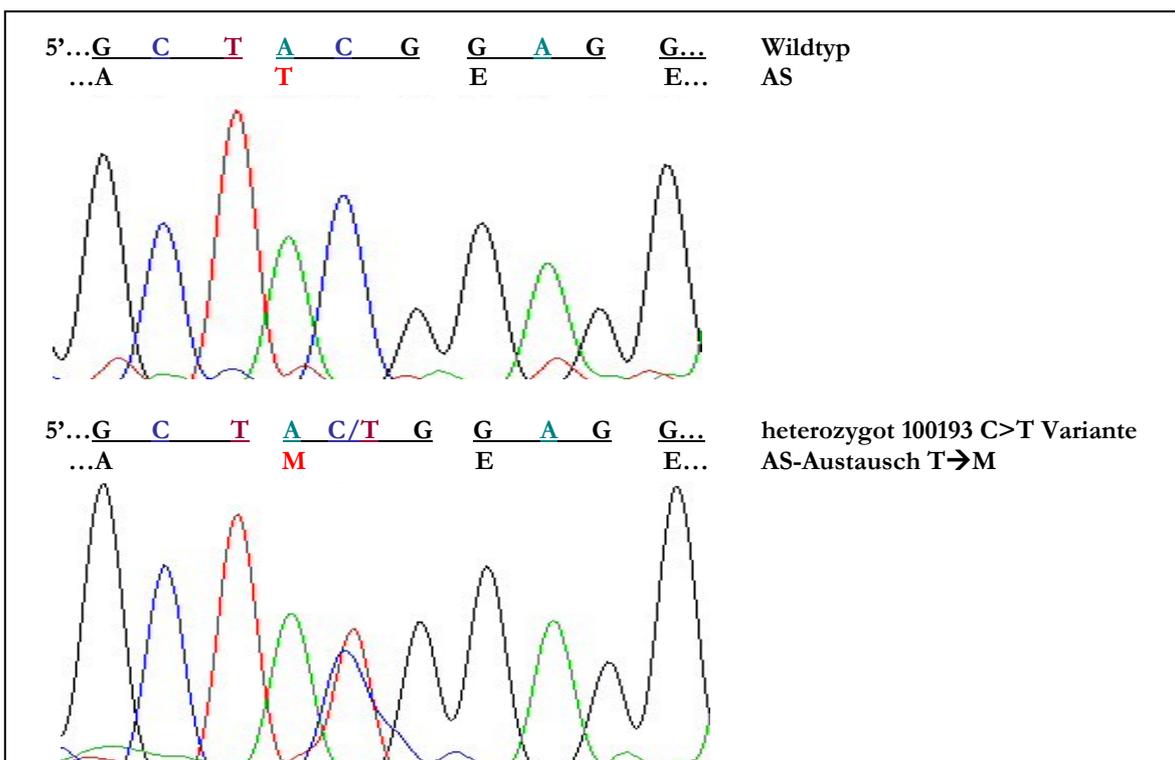
#### 4.2.1.2 Eine nicht-konservative Missense-Variante an einer Aminosäureposition, die nicht zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist

Die sechste seltene nicht-konservative Missense-Variante T25M (s. Abb. 4-16 bis 4-18) befindet sich an einer Aminosäureposition, die zwischen Menschen, Mäusen und Ratten nicht konserviert ist. Sie wurde nur bei einem extrem adipösen Jugendlichen (39,3 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile; 17,1 Jahre) und seinem Vater (BMI 22,3 kg/m<sup>2</sup>, 10. Perzentile) detektiert. Die Mutter mit einem BMI von 22,2 kg/m<sup>2</sup> (44. Perzentile) trug diese Variante nicht.

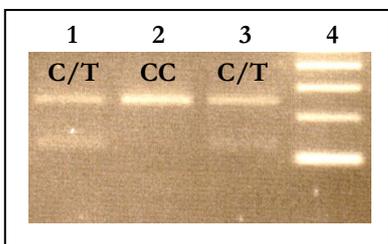


**Abb. 4-16: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante T25M (100193 C>T).**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.  
 Links 4°C: Spur 1: Kontrolle ohne auffälliges Bandenmuster;  
 Spur 2: extrem adipöser Jugendlicher mit zusätzlicher Bande.  
 Rechts RT: Spur 3: Kontrolle ohne auffälliges Bandenmuster;  
 Spur 4: extrem adipöser Jugendlicher mit 2 zusätzlichen Banden.



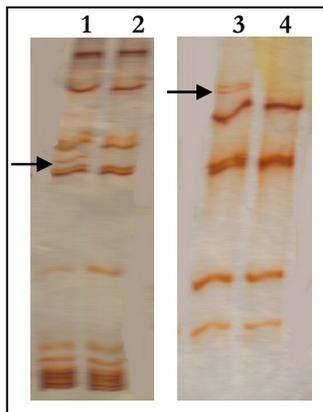
**Abb. 4-17: Sequenzanalyse der nicht-konservativen Missense-Variante T25M (100193 C>T).**  
 Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 70-79; unten: Sequenz des Trägers der Variante T25M, der an Position des Kodons 25 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot C/T ist.



**Abb. 4-18: PCR-RFLP Typisierung der nicht-konservativen Missense-Variante T25M (100193 C>T).** Enzym PfuMI schneidet das T-Allel (CCANNNN↓NTGG) an Position des Kodons 24 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: extrem adipöser Jugendlicher heterozygot C/T; Spur 2: Mutter homozygot CC; Spur 3: Vater heterozygot C/T; Spur 4: 123 bp Längenmarker.

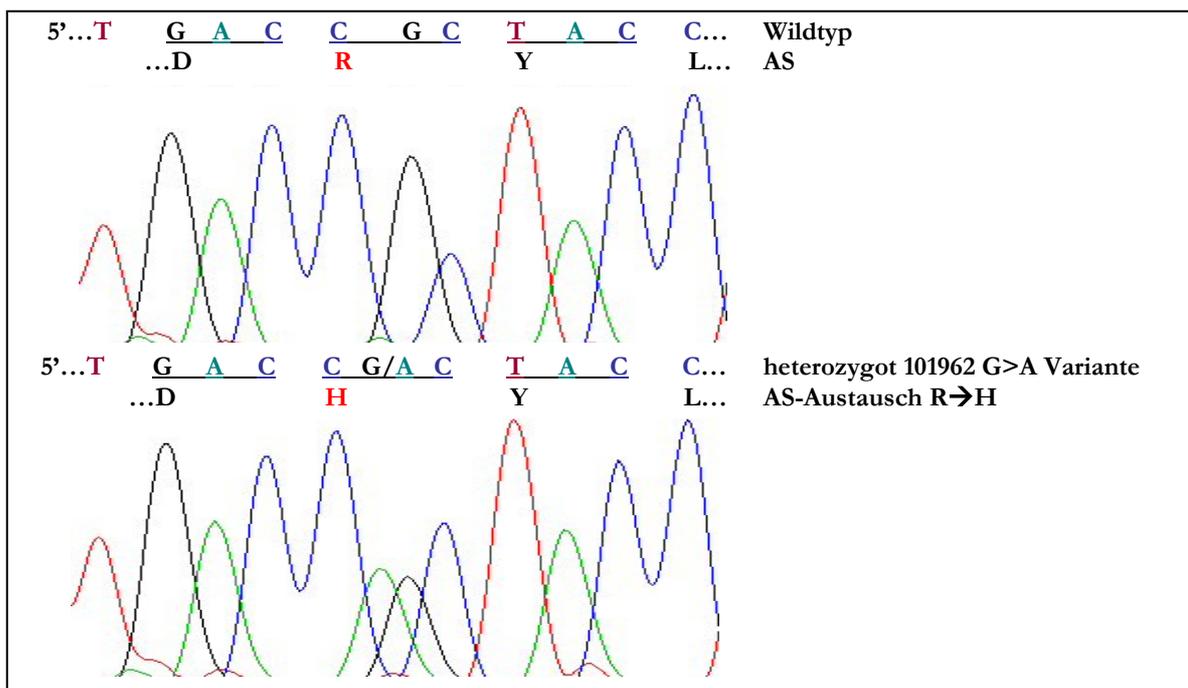
4.2.1.3 Eine konservative Missense-Variante an einer Aminosäureposition, die zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist

Die siebente Missense-Variante (R210H), die zu einem konservativen AS-Austausch führt, befindet sich an einer AS-Position, die zwischen Menschen, Mäusen und Ratten konserviert ist. Sie wurde bei einer untergewichtigen Kontrollperson (19,1 kg/m<sup>2</sup>, 5. Perzentile; 21,9 Jahre) detektiert (s. Abb. 4-19 bis 4-21). Die DNA der Eltern des Trägers war nicht verfügbar.

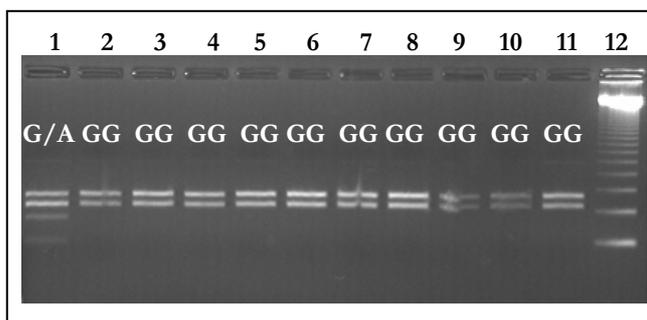


**Abb. 4-19: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante R210H (101962 G>A).**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich. Links 4°C: Spur 1: untergewichtige Person mit zusätzlicher Bande; Spur 2: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster. Rechts RT: Spur 3: untergewichtige Person mit zusätzlicher Bande; Spur 4: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster.



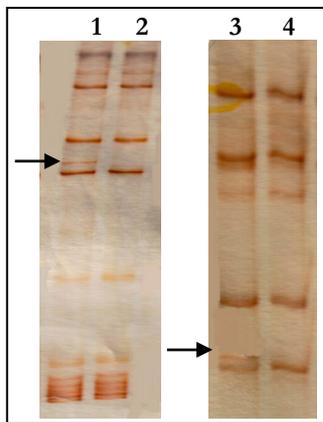
**Abb. 4-20: Sequenzanalyse der konservativen Missense-Variante R210H (101962 G>A).** Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 624-634; unten: Sequenz des Trägers der Variante R210H, der an Position des Kodons 210 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot G/A ist.



**Abb. 4-21: PCR-RFLP Typisierung der konservativen Missense-Variante R210H (101962 G>A).** Enzym *Van91I* (*Pf*/MI) schneidet das A-Allel (CCANNNN↓NTGG) an Position des Kodons 211 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: untergewichtige Kontroll-Person heterozygot G/A; Spuren 2-11 Kontroll-Person homozygot GG; Spur 12: 123 bp Längenmarker.

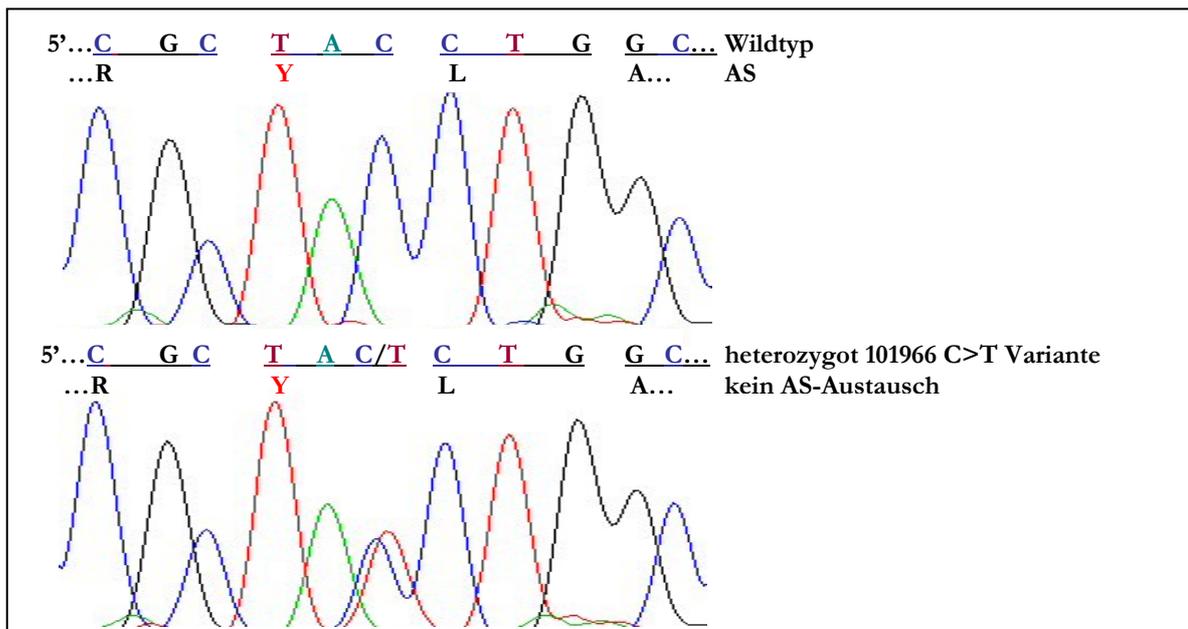
4.2.1.4 Stumme Varianten

Die vier stummen Varianten sind 101966 C>T (s. Abb.4-22 bis 4-24), 102218 C>T (s. Abb. 4-25 bis 4-27), 102491 G>A (s. Abb. 4-28 bis 4-30) und 102515 G>A (s. Abb. 4-31 bis 4-33). Die stumme Variante 101966 C>T wurde bei einem extrem adipösen Jugendlichen (BMI 45,6 kg/m<sup>2</sup>, 99. Perzentile; 24,7 Jahre) detektiert (Abb. 4-22 bis 4-24).

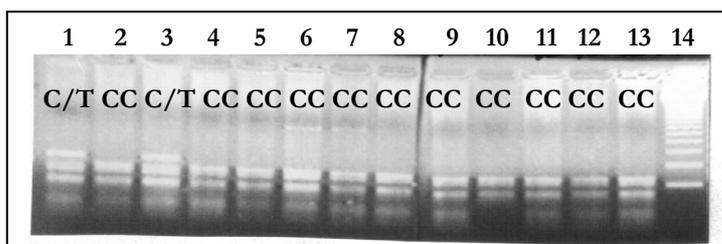


**Abb. 4-22: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 101966 C>T.**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.  
 Links 4°C: Spur 1: extrem adipöser Jugendlicher mit zusätzlicher Bande; Spur 2: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster.  
 Rechts RT: Spur 3: extrem adipöser Jugendlicher mit zusätzlicher Bande; Spur 4: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster.

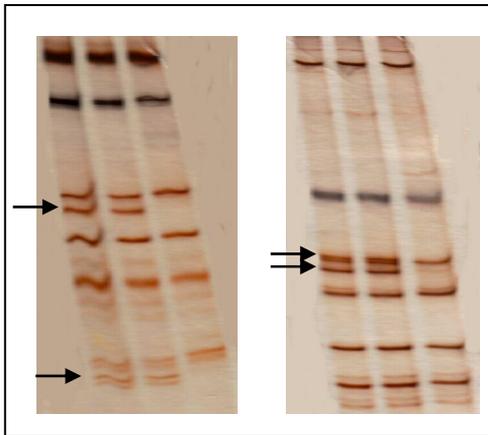


**Abb. 4-23: Sequenzanalyse der stummen Variante 101966 C>T.** Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 628-638; unten: Sequenz des Trägers der Variante 101966 C>T, der an Position des Kodons 211 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot C/T ist.



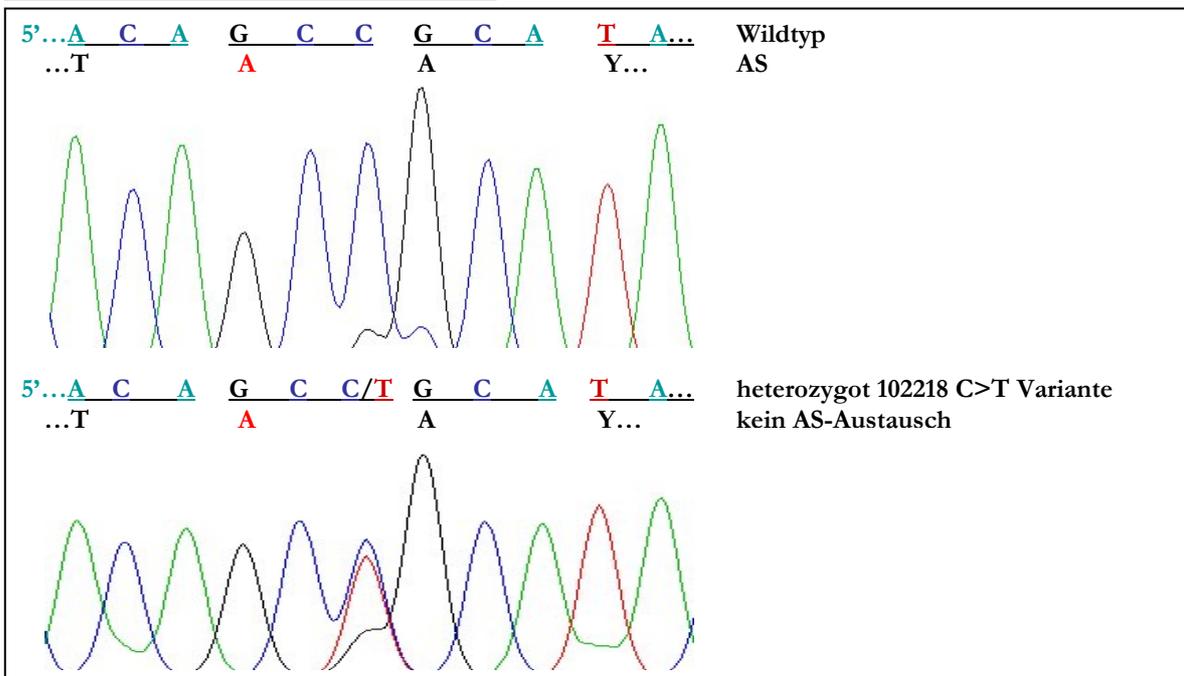
**Abb. 4-24: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 101966 C>T.** Enzym *Bst*NI schneidet das C-Allel (CC↓WGG) an Position des Kodons 212 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: extrem adipöser Jugendlicher heterozygot C/T; Spur 2: Mutter homozygot CC; Spur 3: Vater heterozygot C/T; Spur 4-13 Kontroll-Personen homozygot CC; Spur 14: 123 bp Längenmarker.

Die stumme Variante 102218 C>T wurde bei zwei extrem adipösen jugendlichen Mädchen (BMI 40,9 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile; 16,3 Jahre und BMI 34,3 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile; 16,0 Jahre) detektiert (s. Abb. 4-25 bis 4-28).

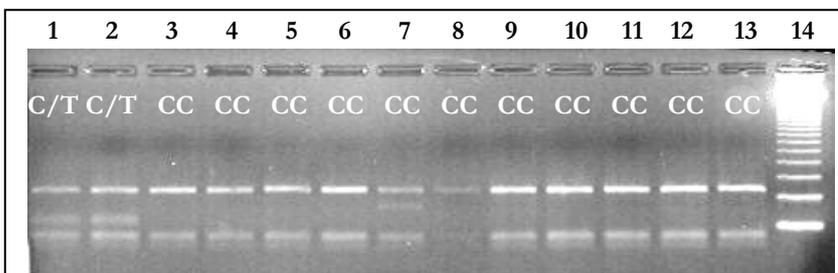


**Abb. 4-25: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 102218 C>T.**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.  
 Links: 4°C: Spur 1 und 2 extrem adipöse Probanden mit 2 zusätzlichen Banden; Spur 3: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster.  
 Rechts: RT: Spur 4 und 5 extrem adipöse Probanden mit 2 zusätzlichen Banden; Spur 6: Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster.

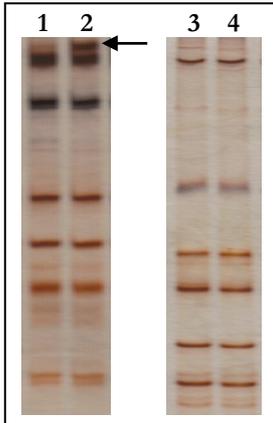


**Abb. 4-26: Sequenzanalyse der stummen Variante 102218 C>T.** Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 880-890; unten: Sequenz der Träger der Variante 102218 C>T, die an Position des Kodons 295 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot C/T sind.



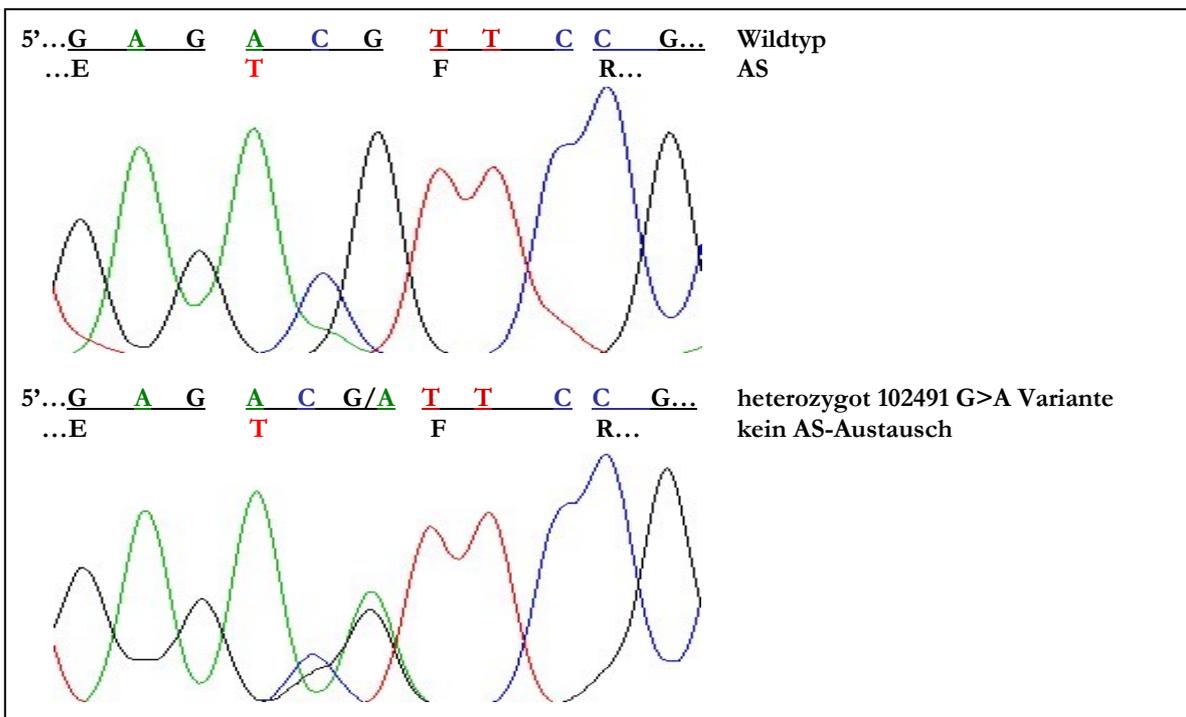
**Abb. 4-27: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 102218 C>T.** Enzym *AluI* schneidet das T-Allel (AG↓CT) an Position des Kodons 295 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1 und Spur 2: extrem adipöse Jugendliche heterozygot C/T; Spur 3: Mutter homozygot CC; Spur 7: laborinterne Kontroll-Person mit der Variante R317Q an Position 950, durch die eine Schnittstelle für das Enzym *AluI* entsteht (GGCT zu AG↓CT); Spur 4-6; 8-13 Kontroll-Personen homozygot CC; Spur 14: 123 bp Längenmarker.

Die stumme Variante 102491 G>A wurde bei einer extrem adipösen Jugendlichen (BMI 54,0 kg/m<sup>2</sup>, ≥ 99. Perzentile; 24,4 Jahre) identifiziert (s. Abb. 4-28 bis 4-30).

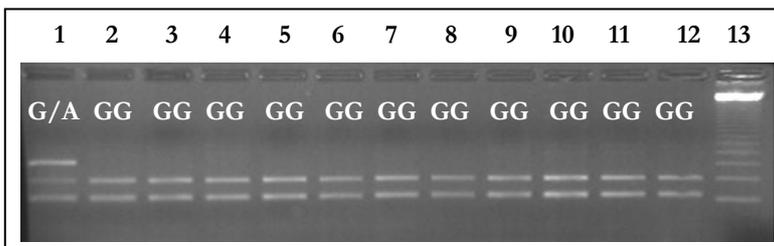


**Abb. 4-28: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 102491 G>A.**

Ein Nachweis ist nur bei 4°C möglich.  
 Links 4°C: Spur 1: Mutter ohne auffälliges Bandenmuster; Spur 2: extrem adipöse Jugendliche mit zusätzlicher Bande.  
 Rechts RT: Spur 3 (Mutter) und 4 (extrem adipöse Jugendliche): ohne auffälliges Bandenmuster.

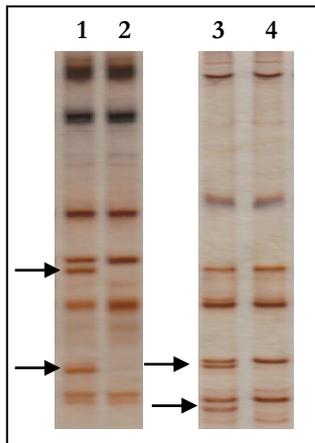


**Abb. 4-29: Sequenzanalyse der stummen Variante 102491 G>A.** Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 1153-1163; unten: Sequenz des Trägers der Variante 102491 G>A, der an Position des Kodons 386 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot G/A ist.



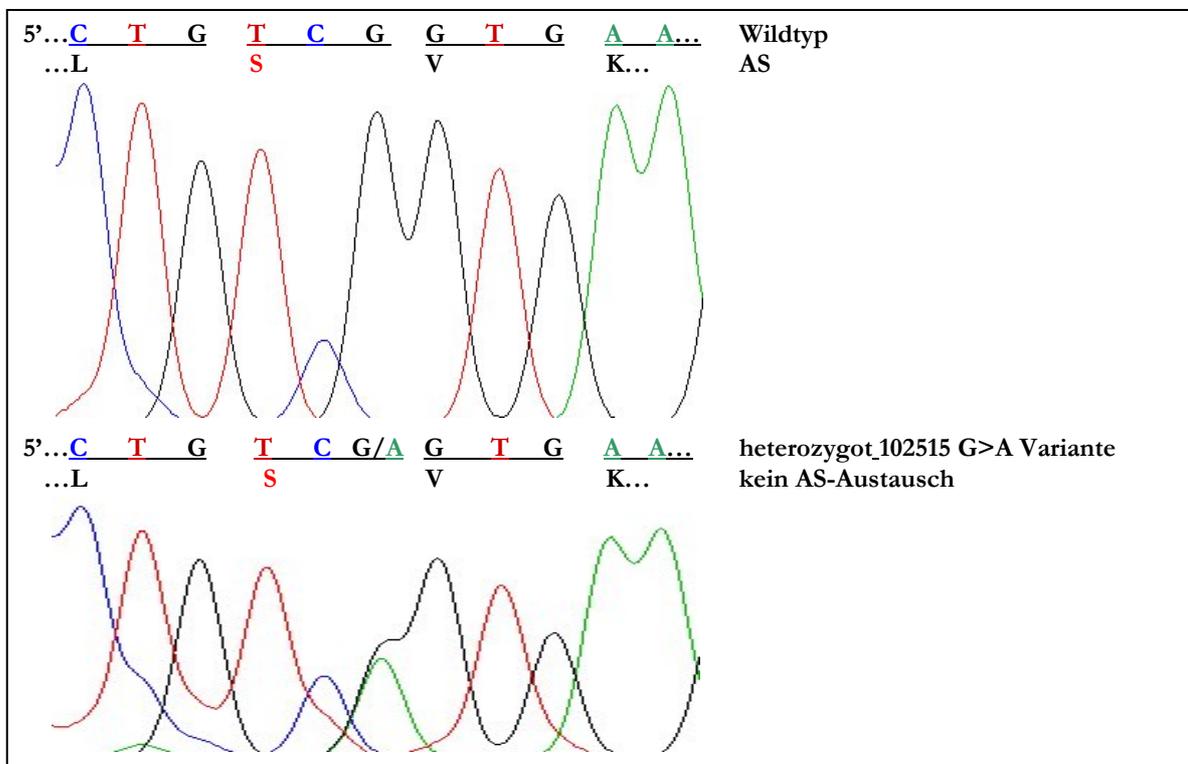
**Abb. 4-30: PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 102491 G>A.** Enzym *TaiI* (*MaeII*) schneidet das G-Allel (ACGT↓) an Position des Kodons 387 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: extrem adipöse Jugendliche heterozygot G/A; Spur 2: Mutter homozygot GG; Spur 3-12 Kontroll-Personen homozygot GG; Spur 13: 123 bp Längenmarker.

Die stumme Variante 102515 G>A wurde bei einem untergewichtigen Studenten (BMI 19,6 kg/m<sup>2</sup>, 5. Perzentile; 23,1 Jahre) detektiert (s. Abb. 4-31 bis 4-33).

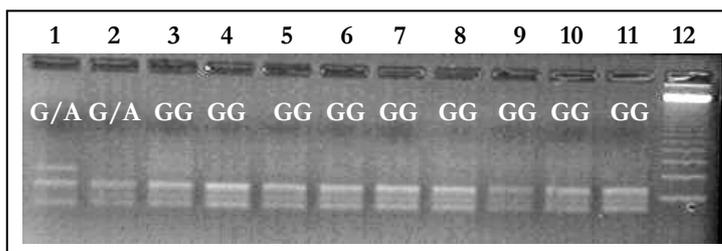


**Abb. 4-31: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit der Variante 102515 G>A.**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich. Spur 1 (4°C) bzw. Spur 3 (RT): untergewichtiger Jugendlicher mit zwei zusätzlichen Banden; Spur 2 (4°C) bzw. Spur 4 (RT): Kontroll-Person ohne auffälliges Bandenmuster.



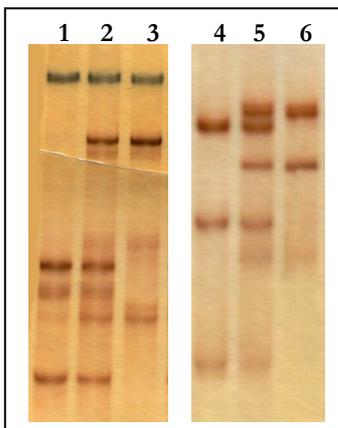
**Abb. 4-32: Sequenzanalyse der stummen Variante 102515 G>A.** Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 1177-1187; unten: Sequenz des untergewichtigen Trägers der Variante 102515 G>A, der an Position des Kodons 394 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 heterozygot G/A ist.



**Abb. 4-33 PCR-RFLP Typisierung der stummen Variante 102515 G>A.** Enzym *HpaI* schneidet das G-Allel (GGTGA[N]<sub>8</sub>) an Position des Kodons 398 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1. Spur 1: untergewichtiger Jugendlicher heterozygot G/A; Spur 2-11 Kontroll-Personen homozygot GG; Spur 12: 123 bp Längenmarker.

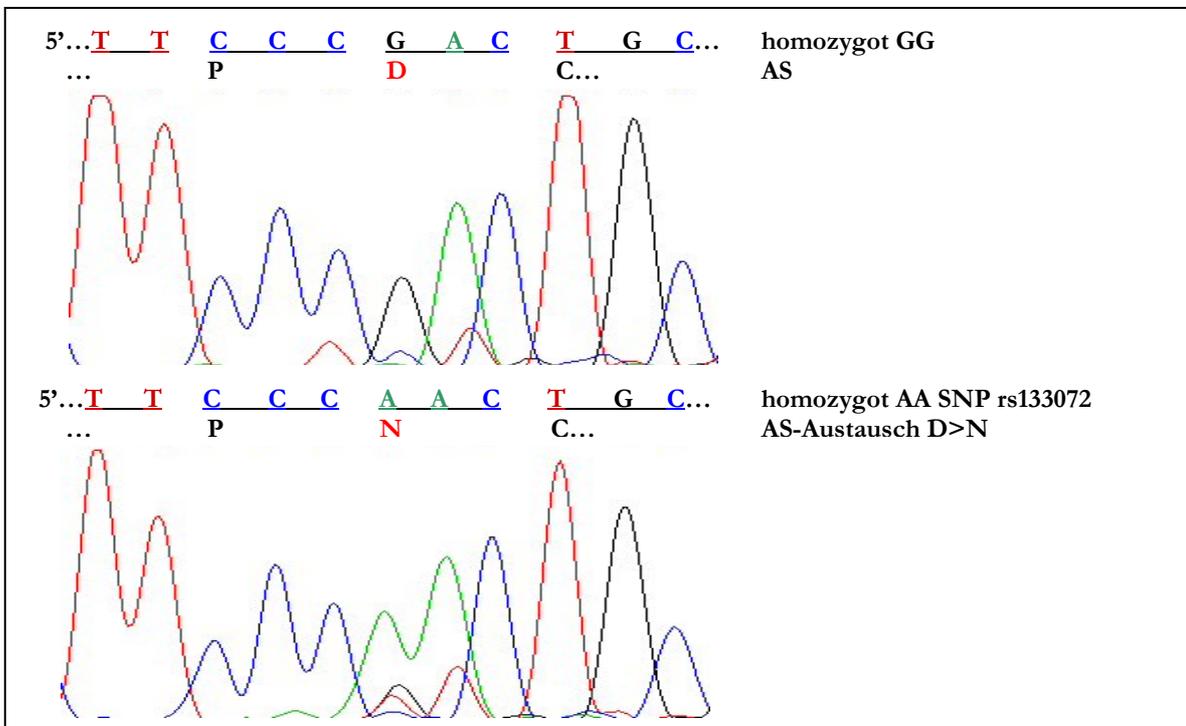
4.2.1.5 Polymorphismen

Der im Exon 1 des MCHR1 detektierte Polymorphismus rs133072 (G/A) führt zu einem nicht-konservativen Austausch der 32. Aminosäure Aspartat zu Asparagin im N-Terminus des Rezeptors (D32N; bezüglich Met<sup>1</sup>). Dieser SNP war als regelmäßig wiederkehrendes variierendes Bandenmuster auf den SSCP-Gelen erkennbar (s. Abb. 4-34), wurde über die Sequenzierung (SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH) als SNP rs133072 identifiziert (s. Abb. 4-35) und über eine spezifische PCR-RFLP in einem Kollektiv von 719 adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 326 nicht-adipösen Probanden (s. Tab. 2-1; Studiengruppen 1-4) genotypisiert (s. Abb. 4-36).



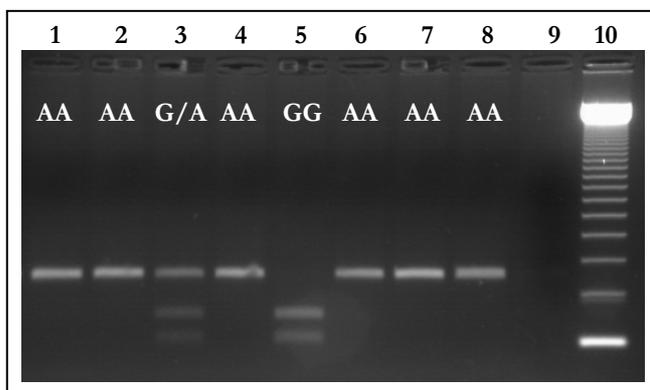
**Abb. 4-34: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit dem SNP rs133072 C>T.**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich.  
 Spur 1 (4°C) bzw. Spur 4 (RT): homozygot GG; Spur 2 (4°C) bzw. Spur 5 (RT): heterozygot G/A; Spur 3 (4°C) bzw. Spur 6 (RT): homozygot AA.



**Abb. 4-35: Sequenzanalyse des SNP rs133072 G>A (D28N) im Exon 1 des MCHR1.** Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 89-99; unten: Sequenz eines adipösen Probanden, der an Position des Kodons 28 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des MCHR1 homozygot für das A-Allel ist.

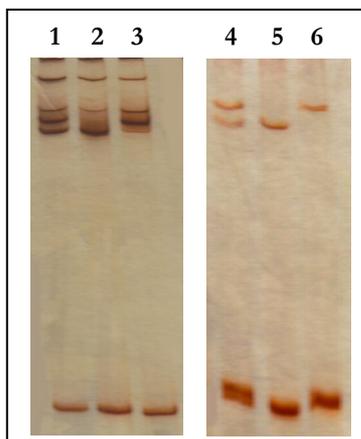
Der SNP rs133072 wurde zusätzlich in weiteren Kollektiven bei insgesamt 427 adipösen und 417 nicht adipösen Individuen (Studiengruppen 5 und 7, s. u. 2.1.2) genotypisiert (s. u. 4-10). In Frankreich und den USA wurde der SNP rs133072 nach demselben PCR-RFLP Protokoll (s. u. Anhang Genotypisierungsprotokolle) durch die entsprechenden Kooperationspartner bei 468 adipösen und 322 nicht-adipösen Erwachsenen (Studiengruppe 8, s. u. 2.1.1; Kooperationspartner: PhD stud. D. Eberle/Dr. K. Clément (Hotel Dieu, Laboratoire de Nutrition, Paris, Frankreich) sowie bei 187 adipösen Erwachsenen und deren 374 Eltern genotypisiert (Studiengruppe 9, s. u. 2.1.1; Kooperationspartner: PhD stud. W.-D. Li/Prof. R. A. Price (Center for Neurobiology and Behavior, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA).



**Abb. 4-36: PCR-RFLP Typisierung des SNPs rs133072 G>A (D32N).**

Enzym *Hpy*188III schneidet das G-Allel (TC↓NNGA) an Position des Kodons 31 (bezgl. Met<sup>1</sup>) des *MCHR1*. Spur 1, 2, 4, 6-8 homozygot AA; Spur 3: heterozygot G/A; Spur 5: homozygot GG; Spur 9: Wasserprobe; Spur 10: 123 bp Längenmarker.

Der zweite im Exon 1 des *MCHR1* detektierte SNP rs133073 (T/C) ist stumm. Dieser SNP war wie der SNP rs133072, als regelmäßig wiederkehrendes variierendes Bandenmuster auf den SSCP-Gelen erkennbar (s. Abb. 4-37) und konnte über die Sequenzierung am LiCor 4200 (s. u. 3.3.3.2; s. Abb. 4-38) als SNP rs133073 identifiziert werden. Da durch den Austausch von T zu C am SNP rs133073 keine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym entsteht bzw. verschwindet, war die Methode der PCR-RFLP zur Genotypisierung dieses SNP ungeeignet. Aus diesem Grund erfolgte die Genotypisierung in einem Kollektiv von 719 adipösen Kindern und Jugendlichen, 326 nicht-adipösen Probanden (Studiengruppen 1-4 s. Tab. 2-1) über SSCP (s. u. 3.3.1) und Tetra-Primer ARMS-PCR (s. u. 3.4.2, s. Abb. 4-39).



**Abb. 4-37: Ausschnitt aus SSCP-Gelen mit dem SNP rs133073 C>T.**

Ein Nachweis ist sowohl bei 4°C als auch bei RT möglich. Spur 1 (4°C) bzw. Spur 4 (RT): heterozygot C/T; Spur 2 untergewichtiger Jugendlicher mit zwei zusätzlichen Banden; Spur 2 (4°C) bzw. Spur 5 (RT): homozygot TT; Spur 3 (4°C) bzw. Spur 6 (RT): homozygot CC.

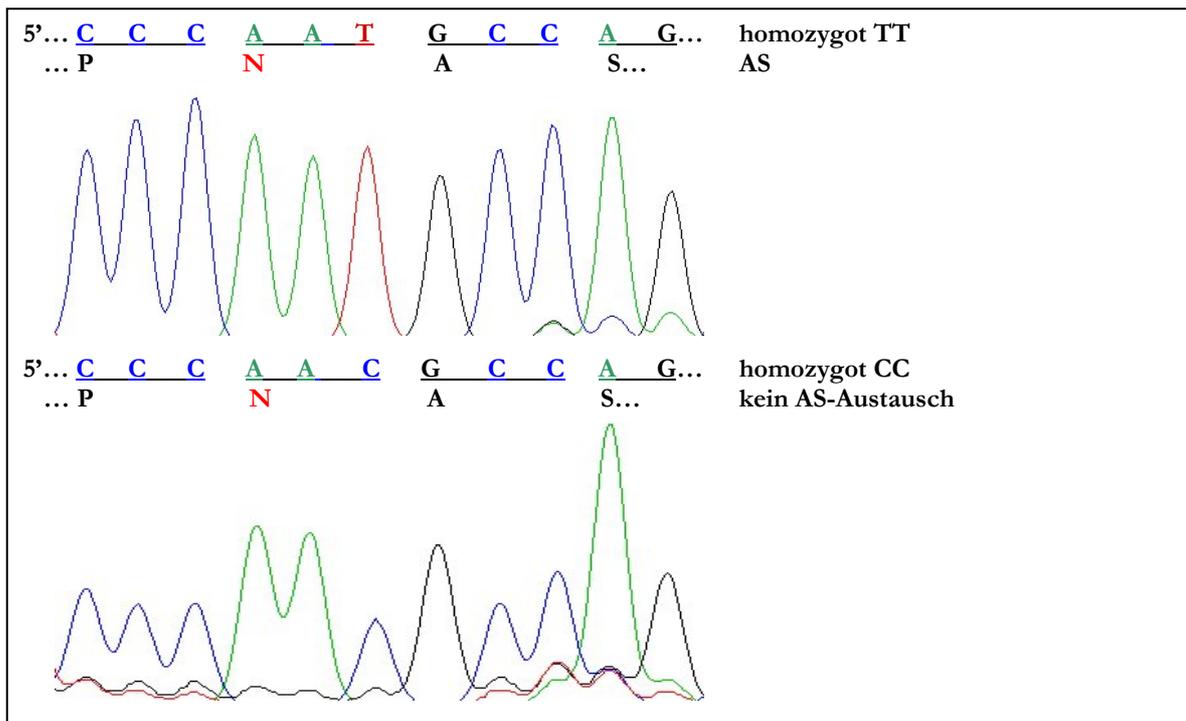


Abb. 4-38: Sequenzanalyse des SNP rs133073 T>C im Exon 1 des *MCHR1*. Oben: Wildtyp-Sequenz Nukleotide 241-251; unten: Sequenz eines adipösen Probanden, der an Position des Kodons 81 (bezüglich Met<sup>1</sup>) des *MCHR1* homozygot für das C-Allel ist.

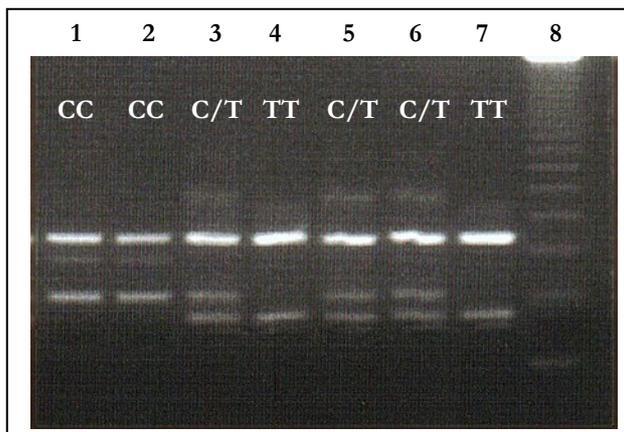
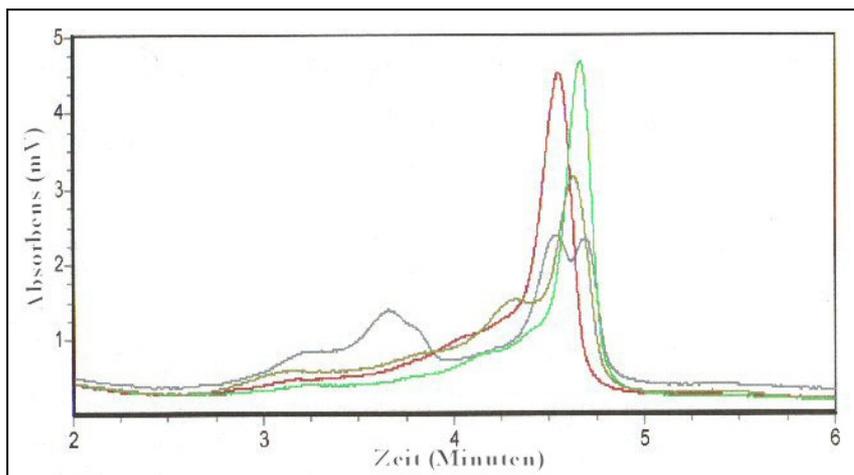


Abb. 4-39 Tetra-Primer ARMS-PCR Typisierung des SNP rs133073 T>C. Spur 1, 2: homozygot CC; Spur 3, 5, 6: homozygot C/T; Spur 4, 7: homozygot TT.

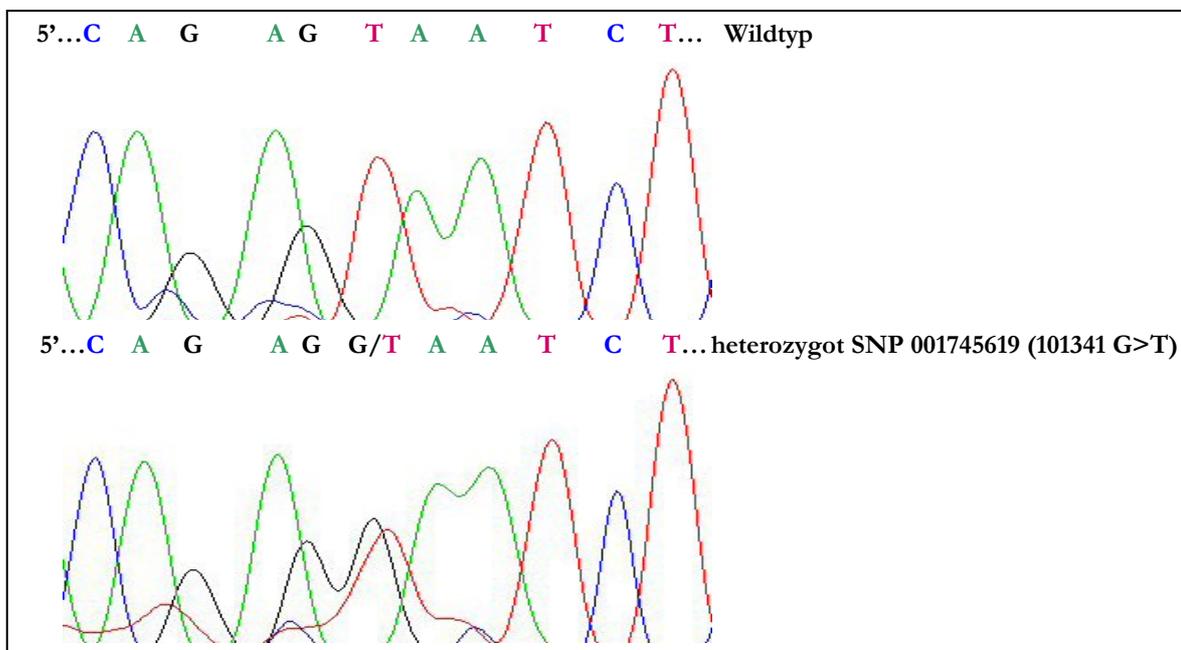
#### 4.2.2 Mutationsscreening des Introns des *MCHR1* sowie eines Bereiches der 5' UTR

Bei dem Mutationsscreening des Introns mit 1.214 bp sowie der ersten 317 bp der 5' Region des *MCHR1* wurde die Methode der dHPLC (WAVE<sup>®</sup> DNA Fragment Analysis System, Transgenomic; Cheshire, GB; s. u. 3.3.2) verwendet.

Hierbei konnte ein neuer Polymorphismus, der SNP 001745619 (101341 G>T; s. Abb. 4-40), detektiert werden, der mittels Sequenzierung (s. u. 3.3.3; s. Abb. 4-41) spezifiziert wurde.

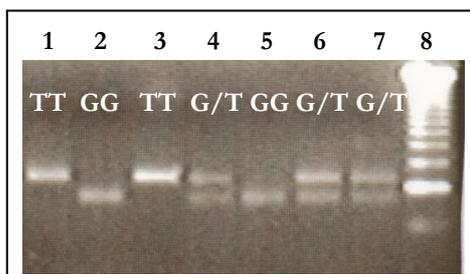


**Abb. 4-40: dHPLC Typisierung mittels WAVE (Transgenomic; Cheshire, GB).** dHPLC Peak eines adipösen Probanden, der an der Position des SNP 001745619 (101341 G>T) im Intron heterozygot T/G ist (grau) und von den Peaks derjenigen Probanden abweicht, die an diesem SNP homozygot TT oder GG (grün, oliv, braun) sind.



**Abb. 4-41: Sequenzanalyse des SNP 001745619 (101341 G>T) im Intron.** Oben: Wildtyp-Sequenz am SNP 001745619 (GG) sowie an jeweils 5 Nukleotiden vor und nach dem SNP; unten: Sequenz eines adipösen Probanden, der am SNP 001745619 heterozygot G/A ist.

Nach der Sequenzierung der Proben mit auffälligem dHPLC-Muster (s. Abb. 4-41) wurde der detektierte SNP 001745619 (101341 G>T) im Intron mittels PCR-RFLP (s. u. 3.4.1; s. Tab. 2-6) verifiziert (s. Abb. 4-42).



**Abb. 4-42: PCR-RFLP Typisierung des SNP 001745619 (101341 G>T).**

Enzym *T<sub>7</sub>I* schneidet das G-Allel (G↓AWTC) des SNP 001745619 (101341 G>T) im Intron des *MCHR1*. Spur 1 und 3: homozygot TT; Spur 2 und 5: homozygot GG; Spur 4, 6 und 7: heterozygot G/T; Spur 8: 123 bp Längenmarker.

### 4.3 Assoziationsstudie für die MCHR1 SNPs rs133072 und rs133073

Die auf das Mutationsscreening des MCHR1 aufbauenden Untersuchungen wurden auf die SNPs rs133072 und rs133073 im Exon 1 des MCHR1 fokussiert. Diese SNPs wurden für einen initialen Assoziationstest jeweils in 215 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 230 untergewichtigen Studenten (Untergruppen der Studiengruppe 1 und Studiengruppe 2, s. Tab. 2-1) genotypisiert (s. u. 4.2.1.5). Der Vergleich der Allel- und Genotyp-Frequenzen (asymptotischer Cochran-Armitage-Trend Test; s. u. 3.8.2.2) der SNPs rs133072 und rs133073 in den beiden Studiengruppen, in denen das Mutationsscreening durchgeführt wurde, zeigte eine Assoziation auf Allel- und Genotypebene ( $p < 0,04$  und  $p < 0,03$ ; zweiseitig). Das A-Allel von SNP rs133072 und das C-Allel von SNP rs133073 waren in der adipösen Studiengruppe häufiger als in der Kontrollgruppe (s. Tab. 4-2).

*Konfirmatorischer Test:* Basierend auf dieser initialen positiven Assoziation wurden die SNPs rs133072 und rs133073 in unabhängigen Studiengruppen von weiteren 405 adipösen Kindern und Jugendlichen, 96 normalgewichtigen und 99 übergewichtigen Studenten genotypisiert. Die Unterschiede der Allel- und Genotyp-Frequenzen zwischen den adipösen Kindern sowie übergewichtigen Studenten und den normalgewichtigen Studenten dieser Assoziationsanalyse wurden bestätigt (einseitige p-Werte  $< 0,015$ ; s. Tab. 4-2).

Ein *post hoc* Vergleich der Allel- und Genotyp-Frequenzen der SNPs rs133072 und rs133073 basierend auf allen 719 adipösen und den 326 nicht-adipösen Individuen zeigte auch die Assoziation des A-Allels von rs133072 und des C-Allels von rs133073 mit Adipositas (alle zweiseitigen p-Werte  $< 0,003$ ; s. Tab. 4-2).

Da die beiden SNPs für die stufenweise durchgeführten Assoziationsanalysen nacheinander genotypisiert worden sind und sie sich zudem in einem engen Kopplungsungleichgewicht ( $D' = 0,989$ ;  $p < 0,001$ ) befinden, erfolgte keine Korrektur der p-Werte.

Tab. 4-2: Assoziationsanalysen des SNP rs133072 (a) und rs133073 (b) in verschiedenen Studiengruppen

Studiengruppen	Genotyp-Frequenzen <sup>#</sup>			Allelfrequenzen	
	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
<b>a) SNP rs133072</b>					
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n = 215)	75 (34,9 %)	109 (50,7 %)	31 (14,4 %)	259 (60,2 %)	171 (39,8 %)
Untergewichtige Studenten (n = 230)	101 (43,9 %)	107 (46,5 %)	22 (9,6 %)	309 (67,2 %)	151 (32,8 %)
Initiale Analyse	p = 0,027 <sup>x</sup>			p = 0,031 <sup>x</sup>	
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n = 405)	149 (36,8 %)	196 (48,4 %)	60 (14,8 %)	494 (61,0 %)	316 (39,0 %)
Übergewichtige Studenten (n = 99)	37 (37,4 %)	49 (49,5 %)	13 (13,1 %)	123 (62,1 %)	75 (37,9 %)
Normalgewichtige Studenten (n = 96)	43 (44,8 %)	46 (47,9 %)	7 (7,3 %)	132 (68,8 %)	60 (31,2 %)
Konfirmatorische Analyse	p = 0,022 <sup>xx</sup>			p = 0,024 <sup>xx</sup>	
Alle adipösen Individuen* (n = 719)	261 (36,3 %)	354 (49,2 %)	104 (14,5 %)	876 (60,9 %)	562 (39,1 %)
Alle nicht-adipösen Individuen** (n = 326)	144 (44,2 %)	153 (46,9 %)	29 (8,9 %)	441 (67,6 %)	211 (32,4 %)
post hoc Analyse	p = 0,0026 <sup>x</sup>			p = 0,0016 <sup>x</sup>	
<b>b) SNP rs133073</b>					
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n = 215)	70 (32,6 %)	112 (52,1 %)	33 (15,3 %)	252 (58,6 %)	178 (41,4 %)
Untergewichtige Studenten (n = 230)	94 (40,9 %)	113 (49,1 %)	23 (10,0 %)	301 (65,4 %)	159 (34,6 %)
Initiale Analyse	p = 0,029 <sup>x</sup>			p = 0,036 <sup>x</sup>	
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n = 405)	143 (35,3 %)	196 (48,4 %)	66 (16,3 %)	482 (59,5 %)	328 (40,5 %)
Übergewichtige Studenten (n = 99)	31 (31,3 %)	53 (53,5 %)	15 (15,2 %)	115 (58,1 %)	83 (41,9 %)
Normalgewichtige Studenten (n = 96)	43 (44,8 %)	46 (47,9 %)	7 (7,3 %)	132 (68,8 %)	60 (31,2 %)
Konfirmatorische Analyse	p = 0,013 <sup>xx</sup>			p = 0,0066 <sup>xx</sup>	
Alle adipösen Individuen* (n = 719)	244 (33,9 %)	361 (50,2 %)	114 (15,9 %)	849 (59,0 %)	589 (41,0 %)
Alle nicht-adipösen Individuen** (n = 326)	137 (42,0 %)	159 (48,8 %)	30 (9,2 %)	433 (66,4 %)	219 (33,6 %)
post hoc Analyse	p = 0,0010 <sup>x</sup>			p = 0,0013 <sup>x</sup>	

<sup>#</sup> Genotyp-Frequenzen sind im Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

<sup>\*</sup> BMI  $\geq$  90. Perzentile; umfasst 620 (359 weiblich) unabhängige übergewichtige Kinder und Jugendliche (mittlerer BMI  $33,4 \pm 6,6$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $14,0 \pm 2,7$  Jahre) und 99 (51 weiblich) übergewichtige Erwachsene (mittlerer BMI  $29,1 \pm 3,4$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $25,3 \pm 3,7$  Jahre).

<sup>\*\*</sup> umfasst 96 (49 weiblich) normalgewichtige (BMI  $\geq$  40. und  $\leq$  60. Perzentile; mittlerer BMI  $21,9 \pm 1,1$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $24,7 \pm 2,6$  Jahre) und 230 (110 weiblich) untergewichtige Erwachsene (BMI  $\leq$  15. Perzentile; mittlerer BMI  $18,3 \pm 1,1$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $25,2 \pm 3,7$  Jahre)

<sup>x</sup> asymptotischer Cochran-Armitage-Trend Test

<sup>xx</sup> asymptotischer Pearson Chi-square Test

#### 4.4 Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) für die MCHR1 SNPs rs133072 und rs133073

Für die Durchführung der TDTs wurden die SNPs rs133072 und rs133073 bei den Eltern von insgesamt 525 bereits genotypisierten adipösen Kindern und Jugendlichen genotypisiert.

*Initialer Test:* Basierend auf der bestätigten positiven Assoziation wurden Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT, s. u. 3.8.3.2) für die SNPs rs133072 und rs133073 an 108 Trios (extrem adipöse Kinder und Jugendliche sowie deren Eltern) durchgeführt. Die hierfür ausgewählten Indexpatienten stammen aus der Stichprobe der 215 extrem adipösen Kinder und Jugendliche, die für die initiale Assoziationsstudie herangezogen wurde. Sie ergaben die bevorzugte Transmission des A-Allels von rs133072 (Transmissionsrate 64,5 %; zweiseitiger p-Wert = 0,0051) und des C-Allels von rs133073 (65,2 %; zweiseitiger p-Wert = 0,0035).

*Konfirmatorischer Test:* Auch in einer konfirmatorischen Studiengruppe von 417 unabhängigen Trios (keiner der Indexpatienten hatte zu der initialen Assoziationsstudie beigetragen) wurde die bevorzugte Transmission der mit Adipositas assoziierten Allele A (rs133072; Transmissionsrate 57,1 %; einseitiger p-Wert = 0,0023) und C (rs133073 Transmissionsrate 56,7; einseitiger p-Wert = 0,0039) ermittelt.

Der *post hoc* TDT, basierend auf insgesamt 525 adipösen Kindern und Jugendlichen und ihren 1050 Eltern, erzielten zweiseitige p-Werte von  $< 0,0003$ . Die bevorzugte Transmission des mit Adipositas assoziierten A-Allels von rs133072 und C-Allels von rs133073 wurden bestätigt (s. Tab. 4-3). Die Transmissionsraten für das A-Allel bzw. das C-Allel in dieser *post hoc* Analyse betragen 58,5 % bzw. 58,3 %.

*Geschlechtsspezifische TDTs* ergaben eine höhere Transmission des A-Allels von SNP rs133072 an männliche (Transmissionsrate 62,2 %) als an weibliche adipöse Indexpatienten (Transmissionsrate 56,0 %). Der Unterschied der Transmissionsraten bei Mädchen und Jungen ist jedoch nicht signifikant (deskriptiver p-Wert = 0,17).

Tab. 4-3: Initiale, konfirmatorische und *post hoc* Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT) für die SNPs rs133072 und rs133073 in verschiedenen Studiengruppen

		initialer TDT			konfirmatorischer TDT		
		108 Trios*			417 unabhängige Trios		
SNP	trans Allel§	trans/ nicht-trans	Trans- rate [%]	zweiseitiger p-Wert	trans/ nicht-trans	Trans- rate [%]	einseitiger p-Wert
rs133072 G/A	A	60/33	64,5	0,0051	230/173	57,1	0,0023
rs133073 T/C	C	60/32	65,2	0,0035	225/172	56,7	0,0039
		<i>Post hoc</i> TDT					
		525 Trios**					
SNPs	trans Allel§	trans/ nicht-trans		Trans- rate [%]	zweiseitiger p-Wert		
rs133072 G/A	A	290/206		58,5	0,00016		
rs133073 T/C	C	285/204		58,3	0,00025		
		<i>Post hoc</i> TDT					
		525 Trios					
		Jungen			Mädchen		
SNP	trans Allel	trans/ nicht-trans	Trans- rate [%]	zweiseitiger p-Wert	trans/ nicht-trans	Trans- rate [%]	zweiseitiger p-Wert
rs133072 G/A	A	122/74	62,2	0,00061	168/132	56,0	0,038

§ häufiger transmittierte Allele

\*\* Trios basieren auf einer Untergruppe der initial gescreenten 215 extrem adipösen Kinder und Jugendlichen sowie deren beiden Eltern

\*\* Trios basieren auf einer Untergruppe der insgesamt 620 adipösen Kinder und Jugendlichen sowie deren beiden Eltern

## 4.5 Expressions-Analysen des MCHR1

Um mehr über die funktionelle Relevanz des (bevorzugt transmittierten) A-Allels des SNP rs133072 zu erfahren, wurde die Expression des MCHR1 Transkriptes untersucht (Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena). In der Datenbank dbEST sind 33 ESTs aufgeführt, die 30 cDNA Klone repräsentieren, die Mehrheit von ihnen stammt entweder aus dem Gehirn oder den Keimbahn-Zellen (jeweils 12). Mittels EST Assemblierung wurde in 19 cDNA Klonen das 3' Ende der vorher bekannten mRNA AB063174 um 885 bp verlängert. Sie repräsentieren auch die 3' UTR, welche zwei kanonische Poly(A) Signale (P. 103455-103460 und 103465-103470 in Z86090) enthält. Zwei cDNA Klone enthalten eine kürzere 3' UTR von 518 bp; das entsprechende Poly(A) Signal befindet sich an der Position 103101-103106 in Z86090. Vier cDNA Klone weisen ein um 208 bp verlängertes 5' Ende der mRNA AB063174 auf. Elf ESTs sind gespleißt und bestätigen die Exon/Intron Struktur des MCHR1.

Interessanterweise indiziert die EST Assemblierung keinen alternativen Transkriptionsstart innerhalb des Exons 1. Diese wären zu erwarten, da im Exon 1 drei putative Kodons für einen Translationsstart Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup> and Met<sup>70</sup> vorkommen. Über RT-PCR und Re-Sequenzierung der ausgewählten ESTs, konnte eine mRNA identifiziert werden, die ein erstes Exon von 502 bp und ein zweites Exon von 1.867 bp enthält (AF490537, eigener Datenbankeintrag). Die von der Kooperationsgruppe Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) ermittelten Expressionsorte dieser mRNA waren Gehirn, Leber, Lunge, Ovarien, Prostata, Fettgewebe, Blut und Testis.

## 4.6 Identifizierung weiterer SNPs und Haplotypen sowie Durchführung von Haplotyp-basierenden TDTs

### 4.6.1 Sequenzierung

Mit dem Ziel, weitere SNPs identifizieren zu können, wurden die transkribierte Region des *MCHR1*, entsprechend AF490537, sowie 9.807 bp der 5' Region und das Intron von 1.214 bp re-sequenziert (Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena)). Die Sequenzierung erfolgte an neun adipösen Kindern und Jugendlichen, die homozygot für das A-Allel am SNP rs133072 sind und die mindestens ein A-Allel von einem heterozygoten Elternteil erhalten haben, sowie an zehn adipösen Kindern und Jugendlichen, die homozygot für das G-Allel sind. Diese Auswahl basierte auf der Hypothese, dass diese zwei auf den Genotypen basierenden Gruppen sich an funktionell relevanten SNPs am meisten unterscheiden sollten.

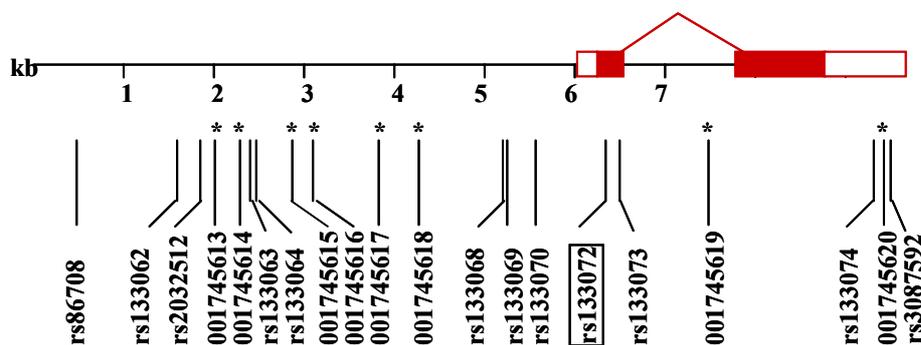


Abb. 4-43: *MCHR1* und die bei der Re-Sequenzierung von 13.379 bp einschließlich des *MCHR1* von 19 Individuen detektierten SNPs. \* neu identifizierte SNPs; eingerahmter SNP führt zu einem putativen nicht-konservativen AS-Austausch; alle nicht markierten SNPs sind in der Datenbank dbSNP aufgeführt.

20 SNPs wurden identifiziert (s. Abb. 4-43), 12 von ihnen waren zuvor bekannt (SNPs: rs86708, rs133062, rs2032512, rs133063, rs133064, rs133068, rs133069, rs133070, rs133072, rs133073, rs133074, rs3087592). Die acht neu detektierten SNPs wurden bei der 'Human Genome Variation' Datenbank eingereicht (001745613, 001745614, 001745615, 001745616, 001745617, 001745618, 001745619, 001745620).

Alle neun Patienten, die homozygot für das häufiger transmittierte Allel A von rs133072 waren, waren auch homozygot für 15 der 20 SNPs (s. Tab. 4-4); die 10 an rs133072 für G homozygoten adipösen Individuen waren homozygot für 17 SNPs mit Ausnahme von 001745613, 001745616 and 001745620 (s. Tab. 4-4). Dies weist auf das Vorhandensein von zwei ancestralen Haplotypen hin, die sich in der re-sequenzierten Region von 13.378 bp wenigstens an 13 Stellen unterscheiden.

#### 4.6.2 Transmission-Disequilibrium Tests für einzelne SNPs

Für 16 identifizierte benachbarte SNPs (einschließlich der SNPs rs133072 and rs133073) wurden TDTs in einer Untergruppe ( $n = 61$ , einschließlich der 19 re-sequenzierten Individuen) und/oder in der Gesamtzahl von 525 Trios durchgeführt (s. Tab. 4-5 und Abb. 4-43). Alle bis auf einen dieser SNPs ergaben Transmissionsraten über 60 %; sowohl SNP rs133072 als auch rs133073 zeigten hohe Transmissionsraten von 67,3 % bzw. 69,1 %. Für zehn dieser SNPs, die in beiden sequenzierten Gruppen homozygot für eines der Allele sind (s. Tab. 4-4), konnte ein Transmissions-Ungleichgewicht (s. Tab. 4-5 fett;  $0,0033 > p\text{-Werte} < 0,010$ ) festgestellt werden. Für diejenigen SNPs, die in einer der beiden sequenzierten Gruppen heterozygote Träger der Allele vorwies (s. Tab. 4-4), konnten keine signifikanten Transmissions-Ungleichgewichte ermittelt werden (s. Tab. 4-5;  $0,047 > p\text{-Werte} < 0,317$ ).

Zusätzlich zu diesen 16 benachbarten SNPs wurden stichprobenartig je zwei SNPs in etwa 20 kb und 40 kb 5' bzw. 3' des *MCHR1* in 61 Trios genotypisiert und in TDTs analysiert. Für die beiden 5' gelegenen SNPs rs133055 (−24.579 bp von Met<sup>1</sup> entfernt; transmittiert/nicht-transmittiert: 37/19,  $p = 0,0162$ ) und rs133050 (−41.489 bp von Met<sup>1</sup> entfernt; (transmittiert/nicht-transmittiert: 37/22,  $p = 0,0508$ ) konnte ein Transmissions-Ungleichgewicht festgestellt werden. Die TDTs für die beiden 3' gelegenen SNPs rs133079 (11.646 bp von Met<sup>1</sup> entfernt; transmittiert/nicht-transmittiert: 34/23,  $p = 0,1451$ ) und rs133084 (20.509 bp von Met<sup>1</sup> entfernt; transmittiert/nicht-transmittiert: 35/26,  $p = 0,2492$ ) ergaben keine Transmissions-Ungleichgewichte.

Tab. 4-4: Genotypen für 20 SNPs bei 9 bzw. 10 adipösen Kindern und Jugendlichen, die homozygot für A oder G an SNP rs133072 sind

SNPs	rs86708	rs133062	rs2032512	001745613	001745614	rs133063	rs133064	001745615	001745616	001745617	001745618	rs133068	rs133069	rs133070	rs133072	rs133073	001745619	rs133074	001745620	rs3087592
n = 9	G	A	A	T	A	C	A	G	A	T	T	G	A	G	A	C	T/G	T	G	C
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C/T	T/C	•	•	•	•	•	T	•	•	•
n = 10	A	G	C	•	G	T	G	A	•	C	T	C	C	A	G	T	T	C	•	C
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
vom Start ATG (Met)	•	•	•	V/T	•	•	•	•	A/G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Abstand (bp)	-5.677	-4.582	-4.353	-4.172	-3.894	-3.791	-3.719	-3.324	-3.117	-2.397	-1.282	-1.043	-988	-677	94 Exon 1	246 Exon 1	1222 Intron	3024	3138	3216

Einzelne Buchstaben stehen für Homozygotität. Punkte beschreiben die oberhalb von ihnen stehende Base.

Tab. 4-5: TDTs für 16 benachbarte SNPs bei 61 bzw. 525 Trios und für Haplotypen einschließlich der SNPs rs133072 und rs133073

SNPs	trans. Allel <sup>§</sup>	61 Trios			525 Trios			525 Trios Haplotypen aus zwei <sup>a</sup> , drei <sup>b</sup> bzw. vier <sup>c</sup> SNPs gebildet
		trans/ nicht- trans	Trans- rate [%]	p-Wert	trans/ nicht- trans	Trans- rate [%]	p-Wert	
rs133062 G>A	A	39/17	69,6	0,0033			rs133068	
rs2032512 C>A	A	38/18	67,9	0,0075			rs133072	
001745614 G>A	A	38/17	69,1	0,0046			rs133073	
rs133063 T>C	C	38/18	67,9	0,0075			rs133074	
rs133064 G>A	A	39/17	69,6	0,0033				
001745615 A>G	G	38/18	67,9	0,0075			<sup>a</sup> 229/140 62,1 % 0,000004#	
001745616 A>G	G	14/9	60,9	0,2971			<sup>a</sup> 230/142 61,8 % 0,000005	
001745617 C>T	T	25/16	61,0	0,1599			<sup>a</sup> 188/123 60,4 % 0,00023	
001745618 T>C	C	28/15	65,1	0,0474			<sup>b</sup> 228/140 62,0 % 0,000004	
rs133068 C>G	G	39/18	68,4	0,0054	289/205	58,5	<sup>b</sup> 190/117 61,9 % 0,000031	
rs133069 C>A	A	38/18	67,9	0,0075			<sup>c</sup> 186/117 61,4 % 0,000074	
rs133072 G>A**	A	37/18	67,3	0,0104	290/206	58,5		
rs133073 T>C*	C	38/17	69,1	0,0046	285/204	58,3		
001745619 T>G	G	14/13	51,9	0,8474				
rs133074 C>T	T	27/18	60,0	0,1797	269/229	54,0		
rs3087592 C>T	T	6/3	66,7	0,3173				

SNPs sind sortiert von 5' zu 3'des MCHIR/; \* SNP rs133073; \*\* SNP rs133072 (Asp32Asn); § häufiger transmittiertes Allel für alle einzelnen SNPs und Haplotyp basierende TDTs; # Zahlen: transmittiert/nicht-transmittiert, Transmissionsrate (%), zweiseitiger p-Wert; **fett**: SNPs bilden einen ancestralen Haplotyp.

### 4.6.3 Haplotypen und Haplotyp-TDTs

Basierend auf den elterlichen Genotypen wurden Haplotypfrequenzen für einen SNP in der 5' Region des *MCHR1* (rs133068), zwei SNPs in der kodierenden Sequenz (CDS, rs133072, rs133073) und einen SNP in der 3' UTR (rs133074), die in 525 Trios genotypisiert wurden, bestimmt. Assoziationstests ergaben p-Werte von  $< 0,001$  für alle Kombinationen von jeweils zwei SNPs und die Kombination von allen vier SNPs miteinander zeigte ein starkes Kopplungsungleichgewicht (LD = linkage disequilibrium;  $p < 0,0001$ ) zwischen diesen Markern. Die erwarteten und beobachteten Frequenzen der jeweiligen Haplotypen sind in Tabelle 4-6 dargestellt.

Ebenso wurden TDTs für Haplotypen durchgeführt, die aus zwei, drei oder vier der in 525 Trios genotypisierten SNPs (rs133068, rs133072, rs133073 und rs133074) gebildet wurden. Der mit Adipositas assoziierte Haplotyp (rs133068/rs133072/rs133073/rs133074: G/A/C/T) wurde 186 mal transmittiert und 117 mal nicht transmittiert (Transmissionsrate 61,4 %; p-Wert 0,000074; s. Tab. 4-5). Geschlechtsspezifische *post hoc* Analysen ergaben eine höhere (deskriptiver p-Wert = 0,051) Transmission an Jungen (67,7 %) als an Mädchen (56,6 %; s. Tab. 4-7).

**Tab. 4-6: Haplotypen aus 4 SNPs, die in 525 Trios (1050 Eltern) genotypisiert wurden**

rs133068-rs133072- rs133073-rs133074	erwartet (kein Kopplungsungleichgewicht)*	gemessen (Kopplungsungleichgewicht)*
1111#	2,10%	31,34%
1112#	2,51%	2,84%
1121#	3,63%	0,04%
1122#	4,34%	0,06%
1211#	3,90%	1,49%
1212#	4,67%	0,00%
1221#	6,76%	0,06%
1222#	8,09%	0,18%
2111#	3,73%	0,24%
2112#	4,46%	0,10%
2121#	6,45%	0,09%
2122#	7,72%	0,25%
2211#	6,94%	0,32%
2212#	8,30%	0,29%
2221#	12,01%	11,95%
2222#	14,37%	50,75%

\* gemessen/erwartet; #rs133068 Allel 1 = G Allel 2 = C; rs133072 Allel 1 = A Allel 2 = G; rs133073 Allel 1 = C Allel 2 = T; rs133074 Allel 1 = T Allel 2 = C

Tab. 4-7: Geschlechtsspezifische Haplotyp-TDTs

525 Trios							
Haplotypen, die aus zwei <sup>a</sup> , drei <sup>b</sup> oder vier <sup>c</sup> SNPs gebildet wurden							
Männlich				Weiblich			
rs133068	rs133072**	rs133073*	rs133074	rs133068	rs133072**	rs133073*	rs133074
a104/53 66,2 % 0,000047#				a125/87 59,0 % 0,0091#			
a105/55 65,6 % 0,000077				a125/87 59,0 % 0,0091			
a84/48 63,6 % 0,0017				a104/75 58,1 % 0,030			
b105/53 66,5 % 0,000035				b123/87 58,6 % 0,013			
b88/42 67,7 % 0,000055				b102/75 57,6 % 0,042			
c88/42 67,7 % 0,000055				c98/75 56,6 % 0,080			

\* stummer SNP im Exon 1; \*\* SNP im Exon 1 führt zu AS-Austausch (Asp32Asn); # Zahlen: transmittiert/nicht-transmittiert, Transmissionsrate (%), zweiseitiger p-Wert

## 4.7 Promoter-Vorhersage

Die Promoter-Vorhersage wurde in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer (Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) durchgeführt. Nur die Analyse mit dem Programm FirstEF ("first exon finder", <http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF>; s. u. 3.6) ergab eine sinnvolle Promoter-Vorhersage. Der Promoter ist im Anhang („Genomische Struktur des *MCHR1* mit Sequenzvarianten“) aufgeführt.

## 4.8 Funktionelle *in vitro* Studien

### 4.8.1 Inositolphosphat-Assay

Nach der Bestätigung der Assoziation des A-Allels des SNP rs133072 mit Adipositas und der erhöhten Transmission dieses Allels von den Eltern an ihre Kinder wurden funktionelle *in vitro* Studien durchgeführt, die die funktionelle Relevanz dieses, im Exon 1 des *MCHR1* gelegenen, SNPs untermauern sollten. Das Assay zur Messung der Inositolphosphat (IP)-Produktion wurde durch die Kooperationspartner Dr. C. Hess/Prof. T. Gudermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg) durchgeführt. *MCHR1* bindet an die Phospholipase C über die G<sub>q/11</sub>-Proteine und wahrscheinlich auch über die G<sub>i/o</sub>-Proteine und hemmt somit die IP-Produktion (Hawes et al. 2000; Pissios et al. 2003). Bei funktioneller Expression in COS-7 Zellen, reagierte Asn<sup>32</sup>-*MCHR1* auf steigende MCH-Konzentrationen mit einer Erhöhung der Inositolphosphat (IP)-Produktion bei niedrigeren

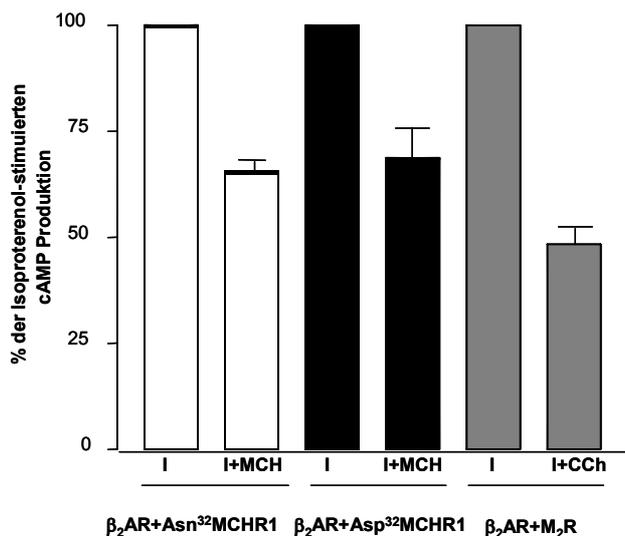
Konzentrationen des Agonisten und damit bei stark reduziertem  $EC_{50}$  Wert ( $10,3 \pm 9,0$  nM) verglichen mit Asp<sup>32</sup>-MCHR1 ( $EC_{50}$ :  $183,9$  nM  $\pm$  33,2; s. Tab. 4-8), während die basale Aktivität für beide Rezeptorvarianten identisch war. Die maximale Agonist-induzierte IP-Produktion von Asn<sup>32</sup>-MCHR1 (2,3-facher Anstieg der basalen IP-Produktion) und Asp<sup>32</sup>-MCHR1 (3,2-facher Anstieg der basalen IP-Produktion) waren vergleichbar. Diese Ergebnisse charakterisieren Asn<sup>32</sup>-MCHR1 als eine Rezeptorvariante mit erhöhter Sensitivität gegenüber dem Agonisten.

**Tab. 4-8: Funktionelle Charakterisierung des SNP rs133072 im Exon 1 des *MCHR1***

Transfiziertes Konstrukt	Inositolphosphat-Assay		
	basale IP-Spiegel (-fach über dem Basalwert des Wildtyps)	Erhöhung des IP- Spiegels (-fach über dem Basalwert des Wildtyps)	$EC_{50}$ (nM)
Asp <sup>32</sup> -MCHR1 G-Allel (Wildtyp)	1,0	$3,2 \pm 0,4$	$183,9 \pm 33,2$
Asn <sup>32</sup> -MCHR1 A-Allel	$0,9 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,2$	$10,3 \pm 9,0$

#### 4.8.2 cAMP-Assay

In einem zweiten Ansatz wurde die Fähigkeit von MCHR1, die  $\beta_2$ -Adreno-Rezeptor-stimulierte cAMP Produktion in HEK293 Zellen zu hemmen, untersucht (Kooperationspartner: Dr. C. Hess/Prof. T. Gudermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg). Asn<sup>32</sup>-MCHR1 und Asp<sup>32</sup>-MCHR1 wurden jeweils mit dem humanen  $\beta_2$ -Adreno-Rezeptor ( $\beta_2AR$ ) transient koexprimiert und die cAMP Bildung wurde über den  $\beta_2AR$  mittels Inkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M Isoproterenol stimuliert. Unter diesen Bedingungen wurde nach Zugabe von 1  $\mu$ M MCH die cAMP Produktion von Asn<sup>32</sup>-MCHR1 um  $31,2 \pm 5,2$  % und von Asp<sup>32</sup>-MCHR1 um  $31,2 \pm 9,9$  % gehemmt. Dieser Effekt ist Pertussistoxin-sensitiv, was eine Beteiligung von  $G_{i/o}$ -Proteinen indiziert (Hawes et al. 2000). MCH verursacht eine stärker ausgeprägte Hemmung der Adenylylzyklase über Asn<sup>32</sup>-MCHR1 ( $IC_{50}$ : 6 nM) im Vergleich zu Asp<sup>32</sup>-MCHR1 ( $IC_{50}$ : 140 nM). Als eine positive Kontrolle wurde der  $\beta_2AR$  mit dem  $G_i$ -gekoppelten  $M_2$  muscarinischen Rezeptor anstelle von MCHR1 koexprimiert. In diesem Fall wurde die Isoproterenol-stimulierte cAMP Produktion um  $51,6 \pm 4,2$ % nach Zugabe von 100  $\mu$ M Carbachol unterdrückt (Abb. 4-44).



**Abb. 4-44: Funktionelle Analyse der MCHR1 Varianten  $\text{Asn}^{32}\text{-MCHR1}$  und  $\text{Asp}^{32}\text{-MCHR1}$ .** Um die funktionellen Auswirkungen jeweils der  $\text{Asn}^{32}$ - und  $\text{Asp}^{32}$ -Varianten des MCHR1 feststellen zu können, wurden die entsprechenden Varianten transient exprimiert und funktionell analysiert. Der humane  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2\text{AR}$ ) wurde transient in HEK 293 Zellen mit  $\text{Asn}^{32}\text{-MCHR1}$ ,  $\text{Asp}^{32}\text{-MCHR1}$  oder dem  $\text{M}_2$  muscarinischen Rezeptor ( $\text{M}_2\text{R}$ ) koexprimiert. Die Zellen wurden mit Isoproterenol (I, 10  $\mu\text{M}$ ), MCH (1  $\mu\text{M}$ ), Carbachol (CCh, 100  $\mu\text{M}$ ) oder Kombinationen davon, wie in der Abbildung gekennzeichnet, stimuliert. Die Hemmung der cAMP-Anreicherung ist als Prozent von der Isoproterenol-stimulierten cAMP Produktion angegeben. Alle Daten zeigen repräsentative Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten, jedes wurde dreifach durchgeführt.

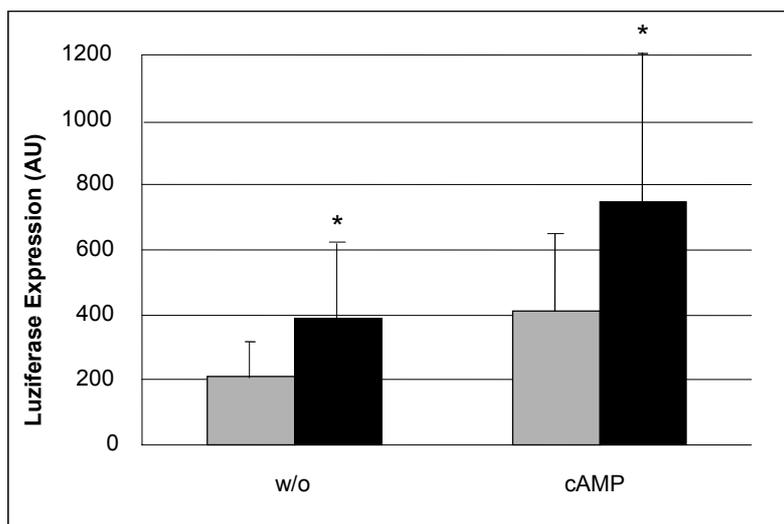
### 4.8.3 Oberflächen ELISA-Assay

Die MCHR1 Protein Expression in der Zellmembran wurde mittels einem Zelloberflächen Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) bestimmt durch die Kooperationspartner: Dr. C. Hess/Prof. T. Gudermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg). Als positive Kontrolle wurden COS-7 Zellen transient mit dem  $V_2$  Vasopressin-Rezeptor ( $V_2\text{R}$ ) transfiziert.  $\text{Asn}^{32}\text{-MCHR1}$  und  $\text{Asp}^{32}\text{-MCHR1}$  wurden an der Zelloberfläche in vergleichbarer Dichte mit  $19.0 \pm 0.6\%$  und  $20.5 \pm 6.6\%$  des  $V_2\text{R}$  (auf 100 % gesetzt) exprimiert. Diese Resultate implizieren, dass die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der zwei MCHR1 Varianten nicht auf eine unterschiedliche Rezeptordichte an der Zelloberfläche zurückgeführt werden können.

### 4.8.4 Promoterstudie - Luziferase-Reportergen-Assay

Die Promoterstudien wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. C. Platzer (Institut für Anatomie II, Jena) durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss der beiden ancestralen Haplotypen auf die Regulation der *MCHR1* Expression zu untersuchen, erfolgte ein Luziferase Reportergen Assay. Dabei wurden zwei genomische Fragmente, die 1.181 kp stromaufwärts des Start-

kodons Met<sup>1</sup> umfassen, verglichen: entweder (a) der Haplotyp, der mit Adipositas assoziiert ist (rs133068/rs133069/rs133070: G/A/G) oder (b) der Haplotyp, der nicht mit Adipositas assoziiert ist (C/C/A). Sowohl die basale als auch die durch cAMP induzierte Luziferase-Expression, die durch die regulatorische Region des „Adipositas“ Haplotyps induziert wurde, wurde im Vergleich zum zweiten Haplotyp um einen Faktor von  $1,9 \pm 0,6$  und  $1,8 \pm 0,7$  ( $p < 0,028$  und  $p < 0,037$ ) signifikant erhöht (s. Abb. 4-45).



**Abb. 4-45: Promoter Luziferase-Reportergen-Assay.** Basale und cAMP-induzierte Aktivitäten von Promoterfragmenten des *MCHR1*, die den Adipositas assoziierten (schwarze Säulen) und den nicht mit Adipositas assoziierten (graue Säulen) Haplotyp repräsentieren. AU: arbitrary units der Luziferase Aktivität.

#### 4.9 Schätzung des individuellen und epidemiologischen Risikos

Die Berechnungen erfolgten durch den Kooperationspartner Prof. H. Schäfer (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg). Aufgrund der Hinweise auf die funktionelle Relevanz des SNP rs133072 (s. u. 4.3-4.7) wurde das genotypische relative Risiko, Adipositas (definiert als BMI  $\geq 90$ . Perzentile) zu entwickeln, berechnet. Diese Berechnungen basierten auf der Frequenz des A-Allels in den genotypisierten 525 Trios. Das genotypische relative Risiko für den SNP rs133072 ist mit 1,51 (95 % CI 1,20 % – 1,90 %) bzw. 1,95 (95 % CI 1,34 % – 2,84 %) für heterozygote bzw. homozygote Träger des A-Allels als gering einzuschätzen. Basierend auf der ermittelten Frequenz des A-Allels in der Allgemeinbevölkerung von 31,0 % ist das attributable Risiko mit 23,7 % (95 % CI 13,1 % – 34,3 %) im Gegensatz zum genotypischen relativen Risiko als hoch einzustufen. Dies impliziert, dass in unserem Studienkollektiv die Adipositas zu etwa 24 % auf die Heterozygotie oder Homozygotie des A-Allels des SNP rs133072 zurückzuführen ist. Für die SNPs, die im starken Kopplungsungleichgewicht mit diesem SNP liegen, ist ein ähnliches Risiko zu erwarten.

## 4.10 Phänotyp-orientierte *post hoc* Tests

Die Berechnungen für die Phänotyp orientierten *post hoc* Tests erfolgten durch die Kooperationspartner: PhD stud. F. Geller/Prof. H. Schäfer (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg).

### 4.10.1 Physische Aktivität

Aufgrund der beschriebenen Hyperaktivität bei den dünnen *Mchr1<sup>-/-</sup>* Mäusen (Chen et al. 2002; Marsh et al. 2002) wurde die *post hoc* Hypothese aufgestellt, dass der GG Genotyp des SNP rs133072, welcher nicht mit Adipositas assoziiert ist, mit einer erhöhten Bewegungsaktivität assoziiert ist. Mittels Fragebögen wurden die Mütter von 399 adipösen Kindern und Jugendlichen (Untergruppe der Studiengruppe 1, s. Tab. 2-1) gebeten, retrospektiv die körperliche Aktivität ihrer Kinder in unterschiedlichen Altersabschnitten einzustufen. Es konnte ein Trend zu erhöhten Aktivitätsraten bei denjenigen Kindern und Jugendlichen gefunden werden, die an der Position des SNP rs133072 den Genotyp GG hatten, wobei dies nur bei den männlichen Probanden ersichtlich war (s. Tab. 4-9).

**Tab. 4-9: Bewegungsaktivität der adipösen Kinder und Jugendlichen mit den verschiedenen Genotypen am SNP rs133072**

Alter (Jahre)	Gesamt			Jungen			Mädchen		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
≤ 1 (n = 399)	5,3 %	6,7 %	8,8 %	3,85 %	10,0 %	12,7 %	6,9 %	4,6 %	6,3 %
1-6 (n = 399)	8,8 %	12,3 %	15,0 %	11,5 %	14,8 %	25,4 %**	6,5 %	10,5 %	7,1 %
7-10 (n = 399)	10,7 %	11,0 %	14,5 %	7,7 %	11,4 %	16,1 %	13,3 %	10,7 %	13,3 %
11-14 (n = 327)	12,5 %	10,5 %	11,0 %	8,3 %	12,7 %	15,8 %	16,7 %	9,0 %	7,1 %
≥ 15 (n = 105)	0 %	4,2 %	8,9 %*	0 %	0 %	15,8 %**	0 %	6,1 %	3,9 %

Einseitige nominale p-Werte < 0,1\* and < 0,05\*\*; die Prozentzahlen sind für die entsprechenden Genotypen angegeben

### 4.10.2 Prozentualer Körperfettgehalt

Aufgrund der verminderten Fettmasse sowohl bei den *Pmch<sup>-/-</sup>* und *Mchr<sup>-/-</sup>* Mäusen (Shimada et al. 1998; Chen et al. 2002; Marsh et al. 2002) wurden zusätzliche *post hoc* Analysen zum prozentualen Körperfett-Anteil von 491 weiblichen und männlichen adipösen Kindern und Jugendlichen (Untergruppe der Studiengruppe 1; s. Tab. 2-1) durchgeführt. Dabei konnten keine genotypabhängigen Unterschiede für den SNP rs133072 festgestellt werden, da die mittleren Körperfettgehalte der adipösen Kinder und Jugendlichen mit dem Genotyp AA (n = 72; 36,02 %), dem Genotyp AG (n = 241; 37,07 %) und dem Genotyp GG (n = 178;

36,84 %) vergleichbar waren. Während bei der geschlechtsgetrennten Berechnung der mittleren Körperfettgehalte auch bei den männlichen adipösen Kindern und Jugendlichen keine genotypabhängigen Unterschiede erkennbar waren (AA: n = 54; 27,13 %; AG: n = 190; 26,0 %; GG: n = 159; 25,09 %), wurde bei den weiblichen adipösen Kindern und Jugendlichen mit dem Genotyp AA ein etwas höherer Körperfettgehalt (n = 55; 36,7 %) als bei denjenigen mit dem Genotyp GG (n = 184; 34,1 %; p-Wert 0,07) festgestellt.

#### 4.10.3 Prozentualer Fettanteil an der Gesamt-Energieaufnahme

In einer weiteren *post hoc* Analyse wurde der Anteil des Fettes an der Gesamtenergieaufnahme in Abhängigkeit von dem Genotyp am SNP rs133072 untersucht. Die adipösen Kinder und Jugendlichen (insgesamt n = 140) mit dem Genotyp GG an der Position des SNP rs133072 hatten einen höheren prozentualen Fettanteil an der Gesamt-Energieaufnahme (n = 61; 40 %) im Vergleich zu denjenigen mit dem Genotyp AA (n = 14; 34,7 %, p = 0,030). Dieser Effekt war überwiegend auf einen stärkeren Effekt bei den weiblichen Probanden zurückzuführen (Genotyp AA: n = 10, 32,9 % versus Genotyp GG: n = 34, 39,4 %).

### 4.11 Assoziations- und Transmission-Disequilibrium-Tests in unabhängigen deutschen und ausländischen Studiengruppen

Um die Assoziation und das Transmissions-Ungleichgewicht zu bestätigen, wurden zusätzliche deutsche und nicht-deutsche Studiengruppen genotypisiert. Es wurde die Hypothese verfolgt, dass das A-Allel des SNP rs133072 bzw. das C-Allel des SNP rs133073 mit Adipositas assoziiert sind.

1) Der SNP rs133072 wurde bei 196 deutschen adipösen Kindern sowie 99 deutschen normalgewichtigen Säuglingen aus Berlin (Studiengruppe 5) über PCR-RFLP (s. u. Anhang Genotypierungsprotokolle) genotypisiert. Der Vergleich der beiden Gruppen ergab, dass sowohl die Allel- (einseitiger p-Wert 0,085) als auch die Genotypfrequenzen (einseitiger p-Wert 0,075) in die selbe Richtung tendieren, wie die adipösen Probanden und nicht-adipösen Kontroll-Personen der „Marburger“ Studiengruppen 1-4 (s. Tab. 4-2 und 4-10).

Tab. 4-10: Genotyp- und Allelfrequenzen des SNP rs133072 in der Berliner Studiengruppe\*

Assoziation	rs 133072 (G/A)				
	Genotypfrequenzen <sup>#</sup>			Allelfrequenzen	
	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
adipöse Kinder** (n = 196)	79 (40,3 %)	95 (48,5 %)	22 (11,2 %)	253 (64,5 %)	139 (35,5 %)
normalgewichtige Säuglinge*** (n = 99)	46 (46,5 %)	47 (47,5 %)	6 (6,0 %)	139 (70,2 %)	59 (29,8 %)
einseitiger p-Wert	0,076 <sup>x</sup>			0,085 <sup>xx</sup>	
Männliche adipöse Kinder (n = 98)	34 (34,7 %)	48 (49, %)	16 (16,3 %)	116 (59,2 %)	80 (40,8 %)
Männliche normalgewichtige Säuglinge (n = 42)	16 (38,1%)	23 (54,8%)	3 (7,1%)	55 (65,5%)	29 (34,5%)
einseitiger p-Wert	0,154 <sup>xxx</sup>			0,161 <sup>xx</sup>	
weibliche adipöse Kinder (n = 98)	45 (45,9 %)	47 (48,0 %)	6 (6,1 %)	137 (69,9 %)	59 (30,1 %)
weibliche normalgewichtige Säuglinge (n = 57)	30 (52,6 %)	24 (42,1 %)	3 (5,3 %)	84 (73,7 %)	30 (26,3 %)
einseitiger p-Wert	0,270 <sup>xxx</sup>			0,239 <sup>xx</sup>	

\* Studiengruppe 5; # Genotypfrequenzen liegen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht; \*\* umfasst 196 (98 weibliche) nicht verwandte deutsche adipöse Kinder (BMI  $\geq$  90. Perzentile) \*\*\* umfasst 99 (57 weibliche) nicht verwandte normalgewichtige Säuglinge mit angeborenem endokrinen Defekt<sup>x</sup> asymptotischer Cochran-Armitage-Trend Test <sup>xx</sup> asymptotischer Pearson Chi-square Test; <sup>xxx</sup> exakter Cochran-Armitage-Trend Test

2) Die SNPs rs133072 und rs133073 wurden durch die Kooperationspartner Dr. T. Illig und Prof. Dr. H.-E. Wichmann (Institut für Epidemiologie des GSF-Nationalen Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg) über eine MALDI-TOF MS Analyse (s. u. 3.4.3) bei 4.056 unabhängigen deutschen Erwachsenen genotypisiert, die repräsentativ für die Stadt und Umgebung von Augsburg sind (Studiengruppe 6, KORAS2000). Initial wurden die Allel- und Genotypfrequenzen des SNP rs133072 bzw. des SNP rs133073 zwischen 393 bzw. 390 Individuen mit einem BMI > 90. Perzentile und 2.052 bzw. 2.047 Personen mit einem BMI  $\leq$  50. Perzentile verglichen. Das A-Allel des SNP rs133072 sowie das C-Allel des SNP rs133073 waren entsprechend der Hypothese in der Studiengruppe mit einem BMI > 90. Perzentile häufiger als in der Studiengruppe mit einem BMI  $\leq$  50. Perzentile. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (einseitige p-Werte für den SNP rs133072 0,26 und für den SNP rs133073 0,28; s. Tab. 4-11).

Tab. 4-11: Genotyp- und Allelfrequenzen der SNPs rs133072 und rs133073 in der Stichprobe der KORAS2000 Studie (Augsburg, Deutschland)<sup>†</sup>

Assoziation	rs 133072 (G/A)						rs 133073 (T/C)						
	BMI		Genotypfrequenzen <sup>#</sup>		Allelfrequenzen		BMI		Genotypfrequenzen <sup>#</sup>		Allelfrequenzen		
			GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel			TT	TC	CC	T-Allel
adipös > 90. Perzentile (n = 393, 390) <sup>*1</sup>	36,41 ± 4,03	150 38,1 %	194 49,4 %	49 12,5 %	494 62,8 %	292 37,2 %	36,40 ± 4,04	142 36,4 %	194 49,7 %	54 13,9 %	478 61,3 %	302 38,7 %	
nicht-adipös ≤ 50. Perzentile (n = 2052, 2047)	23,94 ± 2,44	837 40,8 %	954 46,5 %	261 12,7 %	2628 64,0 %	1476 36,0 %	23,94 ± 2,44	794 38,8 %	966 47,2 %	287 14,0 %	2554 62,4 %	1540 37,6 %	
einseitiger p-Wert		0,26 <sup>x</sup>		0,26 <sup>xx</sup>			0,28 <sup>x</sup>		0,28 <sup>x</sup>		0,28 <sup>xx</sup>		
<b>Alter ≤ 40</b>													
adipös > 90. Perzentile (n = 124)	34,69 ± 3,88	44 35,5 %	60 48,4 %	20 16,1 %	148 59,7 %	100 40,3 %	34,69 ± 3,88	41 33,1 %	60 48,4 %	23 18,5 %	142 57,3 %	106 42,7 %	
nicht-adipös ≤ 50. Perzentile (n = 633, 632)	22,29 ± 1,96	251 39,7 %	304 48,0 %	78 12,3 %	806 63,7 %	460 36,3 %	22,28 ± 1,96	241 38,1 %	307 48,6 %	84 13,3 %	789 62,4 %	475 37,6 %	
einseitiger p-Wert		0,11 <sup>x</sup>		0,12 <sup>xx</sup>			0,061 <sup>x</sup>		0,061 <sup>x</sup>		0,063 <sup>xx</sup>		
<b>männlich; Alter ≤ 40</b>													
adipös > 90. Perzentile (n = 61)	33,87 ± 3,71	23 37,7 %	31 50,8 %	7 11,5 %	77 63,1 %	45 36,9 %	33,87 ± 3,71	21 34,4 %	30 49,2 %	10 16,4 %	72 59,0 %	50 41,0 %	
nicht-adipös ≤ 50. Perzentile (n = 301)	23,38 ± 1,62	125 41,5 %	134 44,5 %	42 14,0 %	384 63,8 %	218 36,2 %	23,36 ± 1,62	119 39,5 %	138 45,9 %	44 14,6 %	376 62,5 %	226 37,5 %	
einseitiger p-Wert		0,44 <sup>x</sup>		0,44 <sup>xx</sup>			0,24 <sup>x</sup>		0,24 <sup>x</sup>		0,24 <sup>xx</sup>		
<b>weiblich; Alter ≤ 40</b>													
adipös > 90. Perzentile (n = 63)	35,48 ± 3,91	21 33,3 %	29 46,1 %	13 20,6 %	71 56,4 %	55 43,6 %	35,48 ± 3,91	20 31,7 %	30 47,6 %	13 20,6 %	70 55,6 %	56 44,4 %	
nicht-adipös ≤ 50. Perzentile (n = 332,331)	21,28 ± 1,69	126 38,0 %	170 51,2 %	36 10,8 %	422 63,6 %	242 36,4 %	21,28 ± 1,70	122 36,9 %	169 51,1 %	40 12,1 %	413 62,4 %	249 37,6 %	
einseitiger p-Wert		0,056 <sup>x</sup>		0,063 <sup>xx</sup>			0,068 <sup>x</sup>		0,068 <sup>x</sup>		0,074 <sup>xx</sup>		

<sup>†</sup> Studiengruppe 6; <sup>#</sup> Genotypfrequenzen liegen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht; <sup>\*1</sup> Anzahl unterscheidet sich leicht für jeden SNP aufgrund des verwendeten Hochdurchsatzverfahren für die Genotypisierung (MALDI-TOF); <sup>x</sup> asymptotischer Cochran-Armitage-Trend Test; <sup>xx</sup> asymptotischer Pearson Chi-square Test

**Tab. 4-12: Genotyp- und Allelfrequenzen der SNPs rs133072 und rs133073 in der Stichprobe der KORAS2000 Studie (Augsburg, Deutschland) unterteilt nach BMI-Perzentilen<sup>+</sup>**

	rs 133072 (G/A)						rs 133073 (T/C)					
	Genotyp Frequenzen <sup>#</sup>			Allel Frequenzen			Genotyp Frequenzen <sup>#</sup>			Allel Frequenzen		
	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel	TT	TC	CC	T-Allel	C-Allel		
> 0. & ≤ 10. Perzentile	175 40,23 %	206 47,36%	54 12,41%	556 63,91%	314 36,09%	168 38,44%	209 47,83%	60 13,73%	545 62,36%	329 37,64%		
> 10. & ≤ 20. Perzentile	157	188	58	502	304	147	189	65	483	319		
> 20. & ≤ 30. Perzentile	38,96 %	46,65%	14,39%	62,28%	37,72%	36,66%	47,13%	16,21%	60,22%	39,78%		
> 30. & ≤ 40. Perzentile	159	199	51	517	301	148	206	54	502	314		
> 40. & ≤ 50. Perzentile	38,88 %	48,66%	12,47%	63,20%	36,80%	36,27%	50,49%	13,24%	61,52%	38,48%		
> 50. & ≤ 60. Perzentile	166	182	54	514	290	160	180	59	500	298		
> 60. & ≤ 70. Perzentile	41,29 %	45,27%	13,43%	63,93%	36,07%	40,10%	45,11%	14,79%	62,66%	37,34%		
> 70. & ≤ 80. Perzentile	180	179	44	539	267	171	182	49	524	280		
> 80. & ≤ 90. Perzentile	44,67 %	44,42%	10,92%	66,87%	33,13%	42,54%	45,27%	12,19%	65,17%	34,83%		
> 90. Perzentile	185	183	39	553	261	171	188	46	530	280		
adipös > 90. Perzentile (n = 393)	45,45 %	44,96%	9,58%	67,94%	32,06%	42,22%	46,42%	11,36%	65,43%	34,57%		
nicht-adipös ≥ 40. & ≤ 60. P. (n = 810)	181	176	46	538	268	166	179	56	511	291		
Assoziation einseitiger p-Wert	44,91 %	43,67%	11,41%	66,75%	33,25%	41,40%	44,64%	13,97%	63,72%	36,28%		
	170	173	55	513	283	155	181	62	491	305		
	42,71 %	43,47%	13,82%	64,45%	35,55%	38,94%	45,48%	15,58%	61,68%	38,32%		
	184	159	60	527	279	168	166	65	502	296		
	45,66 %	39,45%	14,89%	65,38%	34,62%	42,11%	41,60%	16,29%	62,91%	37,09%		
	150	194	49	494	292	142	194	54	478	302		
	38,2 %	49,4 %	12,5 %	62,9 %	37,1 %	36,4 %	49,7 %	13,9 %	61,3 %	38,7 %		
	150	194	49	494	292	142	194	54	478	302		
	38,2 %	49,4 %	12,5 %	62,9 %	37,1 %	36,4 %	49,7 %	13,9 %	61,3 %	38,7 %		
	365	362	83	1092	528	342	370	95	1054	560		
	45,1 %	44,7 %	10,2 %	67,4 %	32,6 %	42,4 %	45,8 %	11,8 %	65,3 %	34,7 %		
	0,012 <sup>x</sup>	0,013 <sup>xx</sup>	0,026 <sup>xx</sup>									

<sup>+</sup> Studiengruppe 6; <sup>#</sup> Genotypfrequenzen liegen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht <sup>x</sup> asymptotischer Cochran-Armitage-Trend-Test; <sup>xx</sup> asymptotischer Pearson Chi-square Test

Es wurden zusätzlich *post hoc* Tests durchgeführt, die auf der Gruppierung nach Alter, Geschlecht bzw. BMI-Perzentilen beruhten (s. Tab. 4-11 und 4-12): Bei den Probanden unter 40 Jahren stellte sich bei einem Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen zwischen 124 Probanden mit einem BMI > 90. Perzentile und 633 Probanden mit einem BMI ≤ 50. Perzentile ein Trend zu einer Assoziation des A-Allels (SNP rs133072) bzw. des C-Allels (SNP rs133073) mit Adipositas dar (einseitige p-Werte ≤ 0,12 bei rs133072 bzw. ≤ 0,063 bei rs133073; s. Tab. 4-11). Hierbei waren die Unterschiede der Allel- und Genotypfrequenzen bei den weiblichen Individuen stärker ausgeprägt (einseitige p-Werte ≤ 0,063 bei rs133072 bzw. ≤ 0,074 bei rs133073; s. Tab. 4-11). Nach Unterteilung aller Probanden in Gruppen entsprechend der BMI-Perzentile zeigten das A-Allel des SNP rs133072 und das C-Allel des SNP rs133073 die niedrigsten Frequenzen in den mittleren BMI-Perzentilen (s. Tab. 4-12).

3) Der SNP rs133072 wurde bei 231 adipösen Männern und 318 normalgewichtigen Männern aus Dänemark (Studiengruppe 7) genotypisiert (s. u. Anhang Genotypisierungsprotokolle). Der Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen zwischen diesen beiden Gruppen ergab, im Gegensatz zur Hypothese, eine höhere Frequenz des A-Allels bei den Kontroll-Personen (einseitiger p-Wert = 1; s. Tab. 4-13).

**Tab. 4-13: Genotyp- und Allelfrequenzen des SNP rs133072 in der dänischen Studiengruppe\***

Assoziation	rs 133072 (G/A)				
	Genotyp Frequenzen <sup>#</sup>			Allel Frequenzen	
	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
Dänische adipöse Individuen** (n = 231)	96 (41,6 %)	107 (46,3 %)	28 (12,1 %)	299 (64,7 %)	163 (35,3 %)
Dänische nicht-adipöse Individuen*** (n = 318)	123 (38,7 %)	149 (46,9 %)	46 (14,5 %)	395 (62,1 %)	241 (37,9 %)
einseitiger p-Wert	1 <sup>x</sup>			1 <sup>xx</sup>	

\* Studiengruppe 7; # Genotyp Frequenzen liegen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht; \*\* umfasst 231 Männer, die bereits im Jugendalter adipös waren (BMI ≥ 31 kg/m<sup>2</sup>); \*\*\* umfasst 318 männliche Kontroll-Personen (BMI < 31 kg/m<sup>2</sup>), die bei der Musterung für den Wehrdienst im Alter von 18-26 Jahren (mittleres Alter 19,9 ± 1,9 Jahre) zwischen 1953 und 1977 in Dänemark ausgewählt wurden; <sup>x</sup> asymptotischer Cochran-Armitage-Trend Test; <sup>xx</sup> asymptotischer Pearson Chi-square Test

4) Der SNP rs133072 wurde durch die Kooperationspartner PhD stud. D. Eberle/ Dr. K. Clément (Hotel Dieu, Laboratoire de Nutrition, Paris, Frankreich) bei 468 adipösen Erwachsenen und 322 Kontroll-Personen aus Frankreich (Studiengruppe 8) genotypisiert (s. u. Anhang Genotypisierungsprotokolle). Der Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen zeigte entsprechend der Hypothese eine leicht erhöhte Frequenz des A-Allels bei den adipösen Probanden (einseitiger p-Wert 0,37; s. Tab. 4-14), wobei dieser Effekt bei den Männern stärker ausgeprägt war (einseitiger p-Wert 0,19).

Tab. 4-14: Genotyp- und Allelfrequenzen des SNP rs133072 in der französischen Studiengruppe\*

Assoziation	rs 133072 (G/A)				
	Genotyp Frequenzen <sup>#</sup>			Allel Frequenzen	
	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
Französische adipöse Individuen** (n = 468)	194 (41,4 %)	200 (42,8 %)	74 (15,8 %)	588 (62,8 %)	348 (37,2 %)
Französische nicht-adipöse Individuen*** (n = 322)	137 (42,5 %)	136 (42,3 %)	49 (15,2 %)	410 (63,7 %)	234 (36,3 %)
einseitiger p-Wert	0,372 <sup>x</sup>			0,366 <sup>xx</sup>	
Männliche adipöse Individuen (n = 115)	49 (42,6 %)	46 (40,0 %)	20 (17,4 %)	144 (62,6 %)	86 (37,4 %)
Männliche nicht-adipöse Individuen (n = 156)	72 (46,1 %)	63 (40,4 %)	21 (13,5 %)	207 (66,3 %)	105 (33,7 %)
einseitiger p-Wert	0,198 <sup>x</sup>			0,184 <sup>xx</sup>	
Weibliche adipöse Individuen (n = 353)	145 (41,1 %)	154 (43,6 %)	54 (15,3 %)	444 (62,9 %)	262 (37,1 %)
Weibliche nicht-adipöse Individuen (n = 166)	65 (39,2 %)	73 (44,0 %)	28 (16,8 %)	203 (61,1 %)	129 (38,9 %)
einseitiger p-Wert	1 <sup>x</sup>			1 <sup>xx</sup>	

\* Studiengruppe 8; # Genotyp Frequenzen liegen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht; \*\* umfasst 468 (353 Frauen) unabhängige adipöse Erwachsene (mittlerer BMI  $47.8 \pm 7.8$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $43.3 \pm 12.2$  Jahre); \*\*\* umfasst 322 (166 Frauen) unabhängige nicht-adipöse Individuen (mittlere BMI  $21.5 \pm 1.8$  kg/m<sup>2</sup>; mittleres Alter  $51.9 \pm 10.8$  Jahre); <sup>x</sup> asymptotischer Cochran-Armitage-Trend Test; <sup>xx</sup> asymptotischer Pearson Chi-square Test

5) Der SNP rs133072 wurde in den USA durch die Kooperationspartner PhD stud. W.-D. Li/ Prof. R. A. Price (Center for Neurobiology and Behavior, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) in 187 Trios (160 Trios mit europäisch-amerikanischer Herkunft und 27 Trios afrikanisch-amerikanischer Herkunft; Studiengruppe 9) genotypisiert (s. u. Anhang; Genotypisierungsprotokolle). Der TDT, der auf diesen 187 amerikanischen adipösen Erwachsenen und seinen 374 Eltern beruht, war negativ: Das A-Allel des SNP rs133072 wurde seltener transmittiert als das G-Allel (79 mal transmittiert : 84 mal nicht-transmittiert; einseitiger p-Wert = 1).

## 4.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zahlreiche Studien verdeutlichten die Bedeutung des Melanin-konzentrierenden Hormon-systems bei der Regulation der Energiehomöostase und des Körpergewichts. Es wurden bis zu 13.379 kb des *MCHR1*-Locus von großen und unabhängigen Studiengruppen deutscher adipöser, über-, normal- und untergewichtiger Kinder bzw. junger Erwachsener mittels SSCP und genomischer Sequenzierung gescreent. In der CDS wurden dabei 11 seltene Varianten sowie die SNPs rs133072 und rs133073 identifiziert. In den 5' und 3' Regionen des *MCHR1* wurden 18 weitere SNPs detektiert, wovon 8 zuvor noch nicht bekannt waren. Sowohl für die kodierenden SNPs als auch für zahlreiche SNPs im 5' Bereich des *MCHR1* wurde eine Assoziation je eines ihrer Allele mit Adipositas und eine überzufällig häufigere Transmission dieser mit Adipositas assoziierten Allele gefunden. Damit wurden ein zu Adipositas prädisponierender und ein präventiver Haplotyp identifiziert. Der zu Adipositas prädisponierende Haplotyp, der das mit Adipositas assoziierte A-Allel des SNP rs133072 enthält und mutmaßlich zu einer Missense-Mutation (D32N) am N-Terminus des 422 Aminosäuren-MCHR1 führt, wurde überzufällig häufig transmittiert, wobei der Effekt bei den männlichen adipösen Kindern und Jugendlichen stärker ausgeprägt war. Funktionelle *in vitro* Studien ergaben zudem, dass diejenige Variante des 422 Aminosäuren-MCHR1, die das A-Allel des SNP rs133072 beinhaltet, eine höhere Affinität zu MCH aufwies. *In vitro* Promotertests ergaben, dass der prädisponierende Haplotyp zu einer erhöhten Expression des *MCHR1* führt. Schätzungen zufolge ist die Adipositas in dem untersuchten „Marburger“ Studienkollektiv zu 24 % auf die Heterozygotie oder Homozygotie des A-Allels des SNP rs133072 zurückzuführen. Die Versuche, die Assoziation bzw. das Transmissions-Ungleichgewicht auch in anderen Studiengruppen zu bestätigen, waren nicht erfolgreich. Lediglich in den beiden deutschen Studiengruppen konnte ein Trend zu einer Assoziation festgestellt werden. In den Studiengruppen aus Dänemark, Frankreich und Amerika fielen die Assoziations- bzw. Transmission-Disequilibrium-Tests negativ aus.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Relevanz des Rezeptors 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons für die Regulation der Energiehomöostase und der Gewichtsregulation zu analysieren. Bei dem vorliegenden ersten bislang beschriebenen bekannten Mutationsscreen im *MCHR1* wurde nach Mutationen bzw. Polymorphismen gesucht, die an der Entwicklung einer Adipositas beteiligt sein könnten. Für das Mutationsscreening wurden extrem adipöse Kinder und Jugendliche sowie untergewichtige Studenten herangezogen. Um Aussagen über die Relevanz von zwei in der CDS des *MCHR1* detektierten SNPs zu erlangen, wurden Assoziationsstudien in den für die Mutationssuche eingesetzten Kollektiven und zusätzlich in weiteren unabhängigen Studiengruppen aus über- und normalgewichtigen Studenten und weiteren adipösen Kindern und Jugendlichen durchgeführt. Zur Absicherung der Daten aus den Assoziationsanalysen wurden TDTs für die beiden kodierenden SNPs und weitere 18 detektierte SNPs in adipösen Kindern und Jugendlichen und deren Eltern durchgeführt. Zur Aufklärung der funktionellen Relevanz des Missense-SNP rs133072 in der CDS bzw. des identifizierten Haplotyps des *MCHR1* wurden durch Kooperationspartner funktionelle Assays durchgeführt. Für den Versuch einer weiteren unabhängigen Bestätigung der Assoziations- und TDT-Daten wurden weitere Studiengruppen aus Deutschland, Dänemark, Frankreich und den USA herangezogen.

Im folgenden werden zuerst die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Daten hinsichtlich der Einschätzung ihrer Auswirkung auf die Regulation des Körpergewichts und damit auf die Ausprägung des adipösen Phänotyps diskutiert. Anschließend folgt eine Diskussion der Auswahl der Studienkollektive und der für die Mutationssuche und die Genotypisierung der SNPs verwendeten Methoden.

### 5.1 Kandidatengen Rezeptor 1 des *Melanin-konzentrierenden Hormons*

#### 5.1.1 Struktur des *MCHR1*

Mittels *in silico* EST-Analysen, RT-PCR und der Re-Sequenzierung ausgewählter ESTs wurde die *MCHR1* Struktur mit einem ersten Exon von 502 bp und einem zweiten Exon von 1867 bp definiert (AF490537, s. u. 4.5). Die CDS stimmt mit derjenigen überein, die bereits von Shimomura et al. (1999) beschrieben worden war und einem 422 Aminosäuren-MCHR1 entspricht (s. Abb. 4-1). Dieses Rezeptorprotein enthält Methionin-Kodons an der Position 1 (Met<sup>1</sup>) und an den Positionen 6 (Met<sup>6</sup>) und 70 (Met<sup>70</sup>). Im Gegensatz dazu umfassen die *Mchr1*

Transkripte von Maus und Ratte eine CDS, die einem Protein von 353 AS entsprechen. Der Translationsstart erfolgt bei diesen Spezies an einem Startkodon, das dem humanen Met<sup>70</sup> entspricht (s. Abb. 4-1). *In silico* Analysen der genomischen Sequenz von Maus und Ratte 5' von der entsprechenden *MCHR1* CDS ergaben, dass der offene Leserahmen bei diesen Spezies nicht bis zu den Startkodons Met<sup>1</sup> bzw. Met<sup>6</sup> erweitert werden kann. Zwischen den Aminosäuren, die den humanen Kodons Met<sup>1</sup> und Met<sup>6</sup> entsprechen und dem Met<sup>70</sup> liegen bei Nagern Stopkodons. Da diese Stopkodons beim Menschen nicht vorkommen, liegt die Existenz eines 417 Aminosäuren- und/oder 422 Aminosäuren-MCHR1 (bezüglich Met<sup>6</sup> bzw. Met<sup>1</sup>) beim Menschen nahe.

In der Regel beginnt die Translation mit dem ersten Startkodon (ATG), das „in frame“ mit einer entsprechenden Signal-Sequenz (GCCPuCCATGG) liegt (Übersicht Kozak 1996). Entscheidend in dieser Signal-Sequenz sind das G nach dem ATG und die Purinbase, vorzugsweise ein A, die sich an dritter Position vor dem ATG befindet (Übersicht Kozak 1996). Die Sequenzen um die Startkodons Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup> und Met<sup>70</sup> des humanen *MCHR1* Transkripts entsprechen jedoch nicht dieser optimalen Sequenz für einen Translationsstart (s. Abb. 5-1).

```

1-60 nt  gtctaggtga tgtcagtggg agccatgaaag aagggagtgg ggagggcagt tgggcttgg
1-17 AS      M1  S  V  G  A  M6  K  K  G  V  G  R  A  V  G  L  G

                                     t (T25M)      t (D28V)      g (D32N; rs133072)
61-120  ggcggcagcg gctgccaggc tacggaggaa gacccccttc ccaactgcgg ggcttgcgct
18-37   G  G  S  G  C  Q  A  T  E  E  D  P  L  P  N  C  G  A  C  A

121-180 cccggacaag gtggcagggc ctggaggctg ccgcagcctg cgtgggtgga ggggagctca
38-57   P  G  Q  G  G  R  R  W  R  L  P  Q  P  A  W  V  E  G  S  S

181-240 gctcggttgt gggagcaggc gaccggcact ggctggatgg acctggaagc ctcgctgctg
58-77   A  R  L  W  E  Q  A  T  G  T  G  W  M70  D  L  E  A  S  L  L

                                     t (rs133073)
241-298 cccactggtc ccaacgccag caacacctct gatggccccg ataacctcac ttcggcag
78-97   P  T  G  P  N  A  S  N  T  S  D  G  P  D  N  L  T  S  A  G
    
```

**Abb. 5-1: Exon 1 des *MCHR1* mit Darstellung des jeweiligen Kontextes der drei potentiellen Startkodons (Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup> und Met<sup>70</sup>).** Um entscheiden zu können, mit welcher Wahrscheinlichkeit Met<sup>1</sup>, Met<sup>6</sup> oder Met<sup>70</sup> des humanen *MCHR1* als Startkodon verwendet wird, werden die flankierenden Sequenzen der ATGs beurteilt. Das 3. Nukleotid vor dem ATG Startkodon (Position -3, fett) sollte ein Purin (bevorzugt A) sein und unmittelbar nach dem ATG Startkodon (Position +4, fett) sollte ein G stehen (Übersicht Kozak 1996; Kozak 1997). Dargestellt sind sowohl die Nukleotide (nt) als auch die Aminosäuren (AS). Kursiv: Basenaustausche der seltenen Varianten und der SNPs im Exon 1 des *MCHR1*.

Bei nahezu allen bislang beschriebenen mRNAs liegt das ATG Startkodon in einem starken Kontext **RNNATGG** (R ist ein Purin) oder mindestens in einem ausreichenden Kontext **RNNATGY** oder **YNNATGG** (Y ist ein Pyrimidin; Übersicht Kozak 1996). Demnach sind sowohl Met<sup>1</sup> (**RNNATGY**) als auch Met<sup>70</sup> (**YNNATGG**) ausreichende Startkodons. Wenn

jedoch weder das R<sup>-3</sup> noch das G<sup>+4</sup> zum Kontext des ATG gehören, spricht man von einem schwachen Startkodon (Übersicht Kozak 1996). Da die Kontexte der Startkodons an den Positionen 1 und 70 bezüglich ihrer „Stärke“ offensichtlich vergleichbar sind, ist eine Aussage darüber, welches der beiden Startkodons tatsächlich die Translation des *MCHR1* initiiert, nicht möglich. Andererseits existiert kein offensichtliches Motiv in der Sequenz, das eine Erklärung dafür geben könnte, warum die Translation nicht am Met<sup>1</sup> initiiert werden sollte. Ebenso kann ein sogenanntes Kontext-abhängiges „leaky scanning“ (Kozak 1997; Übersicht Kozak 1999) für *MCHR1* nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall würden einige ribosomale Untereinheiten (40S) das erste Startkodon überspringen und stattdessen am nächsten ATG initiieren, was zur Folge hätte, dass zwei Proteine gebildet würden (Kozak 1997). Es muss festgehalten werden, dass die Struktur des MCHR1 Proteins durch den Nukleotid-Austausch des SNP rs133072 nur beeinflusst wird, wenn es ab Met<sup>1</sup> oder Met<sup>6</sup> translatiert wird. Sollten die entsprechenden Proteine (422 Aminosäuren- bzw. 417 Aminosäuren-MCHR1) nicht existieren, würde sich der SNP rs133072 in der 5' UTR der Met<sup>70</sup> Variante befinden. Damit würde sich dieser SNP als potentiell funktionell relevant für die Regulation der Expression erweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Nomenklatur der Sequenz-Varianten von einem 422 Aminosäuren-MCHR1 ausgegangen, also einem Translationsstart an Met<sup>1</sup>.

Bei einem extrem adipösen Jugendlichen konnte die seltene Variante T25M detektiert werden, die zu einer Einführung eines starken Startkodons (**RNNATGG**) führt. Dieses Startkodon könnte für die Initiierung der Translation in Kraft treten, für den Fall, dass durch das sogenannte „leaky scanning“ das Met<sup>1</sup> übersprungen werden würde. Damit könnte neben dem 422 Aminosäuren-Protein auch ein 398 Aminosäuren-Protein entstehen. Aussagen über eine eventuell entstehende Änderung der Funktionsfähigkeit dieses 398 AS-Proteins aufgrund einer Verkürzung des N-terminalen extrazellulären Endes des MCHR1 können jedoch nicht getroffen werden.

Es sind weitere Studien erforderlich, um Aufschluss darüber zu erhalten, welche Transkripte beim Menschen tatsächlich existieren.

### 5.1.2 Seltene Varianten

Bei dem Mutationsscreening wurden 11 seltene Varianten (s. Tab. 4-1) identifiziert, wovon die meisten zu einem nicht-konservativen AS-Austausch führten. Diese Varianten wurden funktionell noch nicht charakterisiert, so dass ihre Rolle bei der Regulation des Körpergewichts noch unklar ist. Die Variante D28V war die einzige Variante, die sowohl bei untergewichtigen als auch bei adipösen Individuen gefunden wurde. Alle anderen Varianten kamen

entweder bei adipösen Kindern und Jugendlichen oder bei untergewichtigen Kontroll-Personen vor, weshalb ihre Bedeutung bei der Entwicklung von Adipositas nicht ausgeschlossen werden kann. Vier der sechs detektierten Missense-Varianten betreffen Aminosäuren, die zwischen Menschen, Mäusen und Ratten konserviert sind (T305M, R317Q, P377S, T411M; s. u. 4.2.1.1). Die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung an der Ausprägung des Phänotyps ist für diese vier Missense-Varianten größer als für diejenigen Missense-Varianten, die sich an nicht-konservierten AS-Positionen befinden. Die Variante T305M verdient in diesem Zusammenhang besondere Beachtung. Diese Missense-Variante wurde bei einem adipösen Mädchen (BMI 43,3 kg/m<sup>2</sup>, ≥99. BMI-Perzentile; 13,1 Jahre), seiner Schwester (BMI 25,1 kg/m<sup>2</sup>, 99. BMI-Perzentile; 10,7 Jahre) und ihrem Vater (BMI 36,1 kg/m<sup>2</sup>, ≥99. BMI-Perzentile) detektiert. Alle drei Träger der Variante T305M sind extrem adipös (99. bzw. oberhalb der 99. Gewichtsperzentile). Zusätzlich tragen diese drei Personen im *MC4R* sowohl die Stop-Mutation Y35X als auch die Missense-Mutation D37V, mit der die Stop-Mutation einen Haplotyp bildet (Hinney et al. 2003). Die Stop-Mutation führt zu einer loss-of-function des *MC4R*, die aufgrund des fehlenden anorexigenen Signals des  $\alpha$ -MSH zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und demzufolge zu einem erhöhten Körpergewicht führen könnte. Diese *MC4R*-Stop-Mutation könnte die extreme Adipositas der Träger der *MCHR1*-Missense-Variante T305M erklären. Eine funktionelle Untersuchung der *MCHR1*-Variante T305M mittels IP- und/oder cAMP-Assay kann einen Aufschluss über dessen funktionelle Relevanz geben.

Die Aminosäure Asp<sup>123</sup> (bezüglich Met<sup>70</sup>) des MCHR1 in der dritten Transmembrandomäne des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, an die mutmaßlich Arg<sup>11</sup> des MCH bindet (Macdonald et al. 2000; Audinot et al. 2001a; Hill et al. 2001; s. Abb. 5-2) wird durch keine der detektierten seltenen Varianten oder SNPs verändert. Eine Beeinträchtigung der Bindungsaffinität des Liganden MCH an den MCHR1 durch eine der seltenen Varianten oder durch den SNP rs133072 wird aus diesem Grund nicht angenommen.



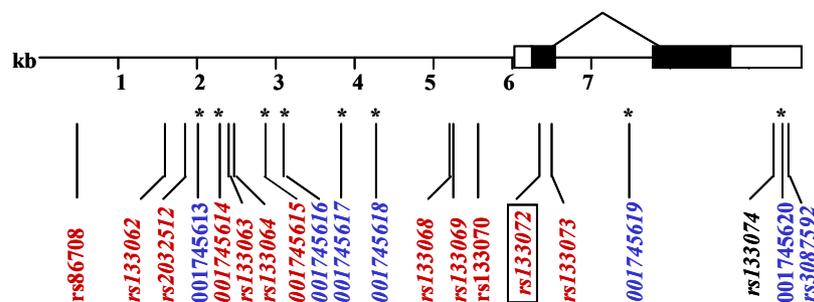
häufigere Transmission der mit Adipositas assoziierten Allele A (rs133072) und C (rs133073) detektiert. Die Transmissionsraten in dem *post hoc* TDT waren für den SNP rs133072 58,5 % ( $p = 0,00016$ ) und für rs133073 58,3 % ( $p = 0,00025$ ; s. Tab. 4-3). Es muss angemerkt werden, dass die TDT-Ergebnisse auf bis zu 525 Trios beruhen, die aus adipösen Indexpatienten der für die Assoziationsanalysen verwendeten Studiengruppe 1 (620 adipösen Indexpatienten; s. Tab. 2-1) und deren Eltern bestanden. Damit war die Bestätigung der Assoziation durch die TDTs nicht unabhängig.

#### 5.1.4 Identifizierung von weiteren SNPs und zwei Haplotypen

Um sicher zu gehen, dass kein SNP in unmittelbarer Nähe des *MCHR1* übersehen wurde, der zu einer höheren Transmissionsrate führen könnte, wurde *MCHR1* einschließlich der 5'- und 3'-UTRs, des Introns und von 9,8 kb der 5' Region des Gens re-sequenziert (Kooperationspartner: Dr. K. Reichwald/Dr. M. Platzer; Abteilung für Genomanalyse, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena). Diese Sequenzierung erfolgte in neun adipösen Probanden, die homozygot für das A-Allel des SNP rs133072 waren, mindestens eines von beiden Allelen von einem heterozygoten Elternteil ererbt hatten und damit zu dem positiven initialen TDT in 108 Trios beigetragen hatten. Die Hypothese bestand darin, dass diese Probanden maximal mit relevanten Varianten angereichert sein sollten, da das mit Adipositas assoziierte A-Allel auch überzufällig häufiger transmittiert wurde. Die Sequenzierung erfolgte zusätzlich in zehn adipösen Probanden, die homozygot für das G-Allel des SNP rs133072 waren und mindestens eins von beiden Allelen von einem heterozygoten Elternteil erhalten hatten. Auf diese Weise wurden zwei ancestrale Haplotypen identifiziert, die mindestens 13,4 kb umfassten und die im re-sequenzierten Bereich auf mutmaßlich 13 SNPs beruhen (SNPs, die in beiden re-sequenzierten Gruppen zugleich homozygot für eines der Allele sind, s. Tab. 4-4; s. Abb. 5-3). Jeder dieser ancestralen Haplotypen beinhaltet zusätzlich mutmaßlich 7 SNPs (in jeweils einer der re-sequenzierten Gruppen kommen heterozygote Träger der betreffenden SNPs vor, s. Tab. 4-4).

11 der mutmaßlich zu den Haplotypen gehörenden SNPs sowie 5 der vermutlich nicht zu den Haplotypen gehörenden SNPs wurden in 61 Trios genotypisiert (s. Abb. 5-3). Die TDTs ergaben für 10 der zum Haplotyp gehörenden SNPs Transmissionsraten, die vergleichbar mit denen der dazugehörigen SNPs rs133072 und rs133073 sind ( $0,0033 \geq p\text{-Werte} \leq 0,010$ ; s. Tab. 4-5; s. Abb. 5-3). Eine Ausnahme bildet der SNP rs133074, der in beiden re-sequenzierten Gruppen homozygot für die Allele C bzw. T ist und dementsprechend zu den Haplotypen gehören müsste (s. Tab. 4-4). Es besteht aber kein signifikantes Transmissionsungleichgewicht für das häufiger transmittierte T-Allel des SNP rs133074 (s. Tab. 4-5),

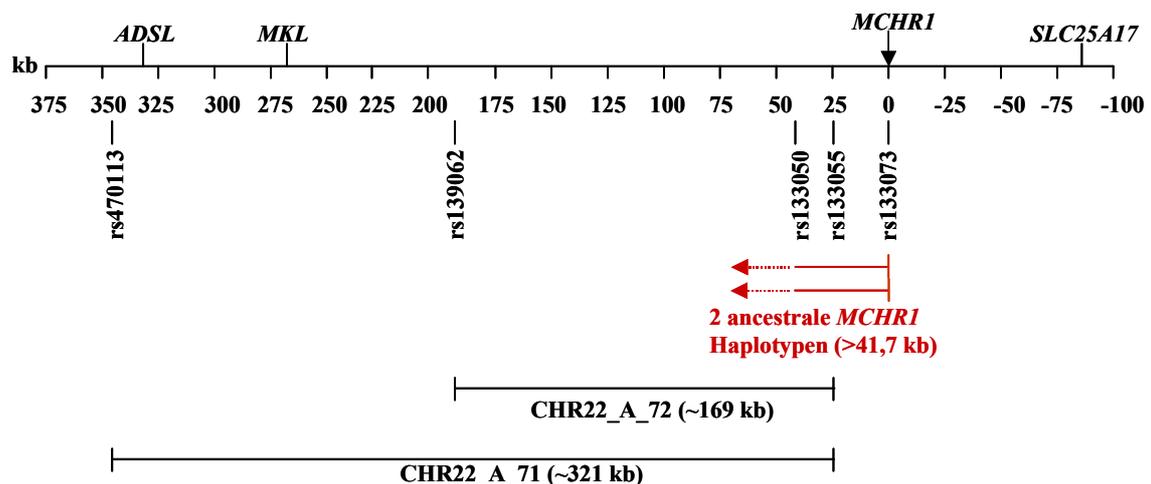
weshalb davon ausgegangen werden muss, dass dieser SNP nicht vollständig mit den anderen SNPs im Linkage Disequilibrium liegt, also nicht zu den Haplotypen gehört (s. Abb. 5-3). Für die 5 nicht zu den Haplotypen gehörenden SNPs ergaben die TDTs niedrigere Transmissionsraten als für die SNPs rs133072 and rs133073 und keine Transmissions-Ungleichgewichte ( $0,047 \geq p\text{-Werte} \leq 0,317$ ; s. Tab. 4-5; s. Abb. 5-3). Es kann geschlussfolgert werden, dass diejenigen SNPs, für die ein Transmissions-Ungleichgewicht festgestellt wurde, zu den Haplotypen gehören und diejenigen, die kein häufiger transmittiertes Allel aufweisen, zu einem späteren Zeitpunkt auf den ancestralen Haplotypen entstanden sind. An 525 Trios wurden TDTs für Haplotypen durchgeführt, die aus zwei, drei oder vier SNPs gebildet wurden. Es zeigten sich, wie bei den TDTs für einzelne SNPs, Transmissions-Ungleichgewichte (s. Tab. 4-5). Die Transmissionsraten der einzelnen Haplotypen überstiegen nur leicht diejenigen der einzelnen SNPs. Aufgrund der geringfügig unterschiedlichen Transmissionsraten und des mehrfachen Testens kann keine eindeutige statistische Aussage gemacht werden, ob ein einzelner SNP oder der gesamte mit Adipositas assoziierte Haplotyp den Assoziations- bzw. Transmissions-Ungleichgewichts-Befunden zugrunde liegen. Aus diesem Grund wird eine funktionelle Relevanz des mit Adipositas assoziierten Haplotyps, der das A-Allel des SNP rs133072 und das C-Allel des SNP rs133073 umfasst, oder eines der zu dem Haplotyp gehörenden SNPs angenommen.



**Abb. 5-3: MCHR1-Locus und die Einteilung der SNPs entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den Haplotypen.** 12 rot markierte SNPs bilden zwei ancestrale Haplotypen, weil sie in beiden re-sequenzierten Probandengruppen homozygot für eines der entsprechenden Allele sind (s. Tab. 4-4) und 10 davon (*kursiv*) Transmissions-Ungleichgewichte aufweisen. 7 blau markierte SNPs gehören nicht zu den Haplotypen, da in jeweils einer der re-sequenzierten Gruppen heterozygote Träger der betreffenden SNPs vorkommen (s. Tab. 4-4) und 5 davon (*kursiv*) keine Transmissions-Ungleichgewichte aufweisen. schwarz markierter SNP: in beiden re-sequenzierten Probandengruppen kommen nur homozygote Träger der Allele T und C vor, aber es besteht kein Transmissions-Ungleichgewicht für eines der Allele. \*: neu identifiziert; nicht markiert: in der Datenbank dbSNP; eingrahmter SNP: SNP, der putativ zu einem nicht-konservativen AS-Austausch führt; *kursiv*: in 61 Trios genotypisiert.

Auf der von Dawson et al. (2002) erstellten LD-Karte mit Kopplungs-Ungleichgewichtsbereichen auf dem humanen Chromosom 22 ist MCHR1 zwei unterschiedlich langen Haplotypen zuzuordnen, die sich 5' vom MCHR1 (SNP rs133055) aus über etwa 169 bzw.

321 kb stromaufwärts erstrecken. Dies deckt sich in hohem Maß mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zu LD-Bereichen. Der SNP rs133073 war von den genotypisierten SNPs derjenige SNP, der am weitesten am 3' Ende des Haplotyps gelegen ist. Die auf 61 Trios basierenden TDTs der 3' von rs133073 gelegenen SNPs ergaben keine Transmissions-Ungleichgewichte: a) SNP rs133074 (transmittiert/nicht-transmittiert: 27/18,  $p = 0,1797$ ; s. Tab. 4-5), b) der stichprobenartig ausgewählte, 11.646 bp von Met<sup>1</sup> entfernte, SNP rs133079 (transmittiert/nicht-transmittiert: 34/23,  $p = 0,1451$ ) sowie c) der stichprobenartig ausgewählte, 20.509 bp von Met<sup>1</sup> entfernte, SNP rs133084 (transmittiert/nicht-transmittiert: 35/26,  $p = 0,2492$ ). Damit besteht nach dem SNP rs133073 in 3' Richtung mutmaßlich keine Kopplung mehr und es ist anzunehmen, dass die zwei ancestralen Haplotypen des *MCHR1* an ihrem 3' Ende zwischen dem SNP rs133073 und dem nächsten derzeit bekannten SNP rs133074 abbrechen (s. Abb. 5-3 und Tab. 4-5). Im Gegensatz dazu ist mit dem SNP rs133062 am 5' Ende des *MCHR1* mit 4,6 kb noch kein Abbruch des Haplotyps zu erkennen (s. Abb. 5-3 und Tab. 4-5). Auch eine Genotypisierung des stichprobenartig ausgewählten, -24.579 bp von Met<sup>1</sup> entfernten, SNP rs133055 (transmittiert/nicht-transmittiert: 37/19,  $p = 0,0162$ ) sowie des, stichprobenartig ausgewählten, -41.489 bp von Met<sup>1</sup> entfernten, SNP rs133050 (transmittiert/nicht-transmittiert: 37/22,  $p = 0,0508$ ) in 61 Trios bestätigte ein bestehendes Transmissions-Ungleichgewicht. Die zwei ancestralen Haplotypen zeigen somit mit etwa 42 kb 5' des *MCHR1* noch keinen Abbruch (s. Abb. 5-4).



**Abb. 5-4: *MCHR1* Haplotypen und benachbarte Gene.** Dargestellt ist *MCHR1* mit einer 5' Region von 375 kb und einer 3' Region von 100 kb mit den benachbarten Genen *ADSL*, *MKL* und *SLC25A17*. Dem *MCHR1* ist der SNP rs133073 zugeordnet und 24,5 kb bzw. 41,5 kb 5' von *MCHR1* sind die SNPs rs133055 bzw. rs133051 gelegen, bis zu denen die in dieser Arbeit detektierten zwei ancestralen Haplotypen bestätigt wurden und ihr Abbruch noch nicht erkennbar war. Zwei Haplotypen, die sich von dem SNP rs133055 bis zu dem SNP rs139062 (~169 kb) bzw. bis zu dem SNP rs470113 (~321 kb) erstrecken (Dawson et al. 2002), können theoretisch mit den ancestralen *MCHR1* Haplotypen übereinstimmen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein oder mehrere SNPs, die außerhalb der resequenzierten Region von etwa 13,4 kb gelegen sind, zu den positiven Assoziations- und TDT-Befunden beigetragen haben und damit funktionell relevant sein könnten. Außer dem *MCHR1* war kein weiteres Kandidatengen für Adipositas in dieser Region zu identifizieren. Die Gene *megakaryoblastic leukemia 1* (*MKL1*, OMIM \* 606078), das für eine SAP DNA-Bindungs-Domäne kodiert und *adenylosuccinate lyase* (*ADSL*, OMIM \*103050), das für ein in die Purin-Biosynthese eingebundenes Enzym kodiert, befinden sich etwa 269 kb bzw. 333 kb proximal zu *MCHR1*. Das Gen für das peroxisomale Membranprotein *SLC25A17* (OMIM \* 606795) ist etwa 87 kb distal von *MCHR1* lokalisiert. Es existieren jedoch keine Hinweise darauf, dass diese Gene in die Regulation des Energiestoffwechsels und des Körpergewichts involviert sind.

### 5.1.5 Funktionelle Implikationen des SNP rs133072 und des mit Adipositas assoziierten Haplotyps

Die positiven Assoziations- und TDT-Ergebnisse wurden durch die Ergebnisse von funktionellen *in silico* und *in vitro* Analysen bezüglich der identifizierten genomischen Varianten untermauert: (a) Für den Fall der Verwendung von Met<sup>1</sup> und/oder Met<sup>6</sup> als Translationsstart beim Menschen, wäre der SNP rs133072 des *MCHR1* der einzige Missense-SNP auf dem überzufällig häufig transmittierten Haplotyp; (b) *in vitro* führt der nicht-konservative Austausch von Asp<sup>32</sup> zu Asn<sup>32</sup> (SNP rs133072) zu einer erhöhten Sensitivität des MCHR1 gegenüber dem Agonisten MCH, während beide Rezeptorvarianten mit ähnlicher Dichte an der Zelloberfläche exprimiert werden. Die Agonist-unabhängigen Basal-Aktivitäten waren für beide Rezeptorkonstrukte vergleichbar (s. Tab. 4-8). (c) In den Promoter Studien wurden genomische Fragmente verglichen, die die ersten im 5' Bereich des Translationsstarts (Met<sup>1</sup>) des *MCHR1* gelegenen 1.181 bp umfassen und entweder den mit Adipositas assoziierten Haplotyp (rs133068/rs133069/rs133070:G/A/G) oder den nicht mit Adipositas assoziierten Haplotyp (rs133068/rs133069/rs133070: C/C/A) darstellen. Diese Studien unterstützen eine Hochregulierung des MCHR1 durch den mit Adipositas assoziierten Haplotyp, da sowohl die basale als auch die cAMP-induzierte Luziferase Expression durch die regulatorische Region des mit Adipositas assoziierten Haplotyps etwa zweifach erhöht war (Abb. 4-45).

Aufgrund der funktionellen Studien zum SNP rs133072 kann davon ausgegangen werden, dass die Asn<sup>32</sup>-Variante des MCHR1 die Sensitivität gegenüber dem Agonisten MCH *in vitro* beträchtlich erhöht und somit mutmaßlich auch das MCH Signal *in vivo* erhöht. MCHR1 ist an die Phospholipase C über die G<sub>q/11</sub>-Proteine und vermutlich auch über die G<sub>i/o</sub>-Proteine gekoppelt (Hawes et al. 2000; Pissios et al. 2003), um verschiedene intrazelluläre Signalwege zu

aktivieren. Jedoch sind die Signalwege, die direkt in das durch das MCH regulierte Nahrungsaufnahmeverhalten involviert sind, noch nicht ausreichend untersucht worden (Hawes et al. 2000).

Ebenso ist noch ungeklärt, welcher Mechanismus der Sensitivitätserhöhung gegenüber MCH-Liganden zugrunde liegt. Als eine Möglichkeit könnte die Entstehung einer potentiellen Glycosylierungsstelle durch den SNP rs133072 angesehen werden. Im extrazellulären aminoterminalen Teil des MCHR1 befinden sich drei Glycosylierungsstellen (Asn<sup>13</sup>, Asn<sup>16</sup> und Asn<sup>23</sup>; bezüglich Met<sup>70</sup>), die glycosyliert werden, wobei sich die Glycosylierung des Asn<sup>23</sup> (bezüglich Met<sup>70</sup>) als bedeutend für die Expression des MCHR1 an der Zell-Oberfläche, die Ligandenbindung als auch die Signal-Weitergabe herausstellte (Saito et al. 2003). Die Glycosylierung ist ein gemeinsames posttranslationales Merkmal bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Saito et al. 2003). Der Austausch des G-Allels des SNP rs133072 durch das mit Adipositas assoziierte A-Allel führt zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin am Kodon 32 des MCHR1. Eine Funktionsänderung des MCHR1 aufgrund einer Glycosylierung des durch den SNP rs133072 eingeführten Asn<sup>32</sup> ist jedoch eher unwahrscheinlich, da nicht die für die Glycosylierung erforderliche Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr (wobei X für eine beliebige Aminosäure ausgenommen Prolin steht; Strachan und Read 1999) sondern Asn<sup>32</sup>-Cys<sup>33</sup>-Gly<sup>34</sup> vorliegt.

Die Promoterstudien lassen *in vitro* ebenso auf ein verstärktes MCH-Signal durch die mit Adipositas assoziierten Haplotypen schließen. Dieser Haplotyp enthält in den ersten 1.198 bp des 5' Bereiches des *MCHR1* vermutlich eine regulatorische Einheit, die aktiver ist als die in dem protektiven Haplotyp. Die Gen- und SNP-Analysen unter Verwendung des Programms ELDorado (<http://www.genomatix.de>) sowie die Suche nach veränderten Transkriptionsfaktorbindungsstellen im 5' Bereich des *MCHR1* mithilfe des MatInspector Professional (<http://www.genomatix.de>) ergaben keine Hinweise auf die Entstehung einer Bindungsstelle für einen die Expression hochregulierenden Transkriptionsfaktor durch einen oder mehrere der detektierten SNPs im 5' Bereich des *MCHR1*. Dieser Fall wäre eine Erklärung für die *in vitro* ermittelte Erhöhung der Expression des *MCHR1* durch den mit Adipositas assoziierten Haplotyp.

Infolge eines verstärkten Signals des orexigenen MCH ist ein erhöhtes Körpergewicht zu erwarten. Aus den Befunden der pharmakologischen und Promoterstudien kann geschlossen werden, dass der mit Adipositas assoziierte Haplotyp zu einer Hochregulierung des MCHR1 *in vitro* führt und somit mutmaßlich zu einem verstärkten MCH-Signal *in vivo* führt.

### 5.1.6 Phänotyp-orientierte *post hoc* Tests

Es wurden weitere *post hoc* Tests mit dem Ziel durchgeführt, Hypothesen bezüglich weiterer phänotypischer Auswirkungen der zwei detektierten Haplotypen zu erstellen. Diese Tests erfolgten für Phänotypen, die überwiegend bei den männlichen *Mchr1<sup>-/-</sup>* Mäusen beschrieben worden waren. Sie zeigten eine signifikante Verminderung des Körpergewichts und Körperfettgehalts, eine Resistenz gegenüber einer Diät-induzierten Adipositas und eine erhöhte physische Aktivität (Chen et al. 2002). Bei dem Vergleich von Jungen und Mädchen (Studien-  
gruppen 1 und 5) wurden bei den Jungen geringfügig stärkere Assoziationen und Transmissions-Ungleichgewichte ( $p = 0,17$ ) einzelner SNPs und des mit Adipositas assoziierten Haplotyps ( $p = 0,051$ ) auf einer deskriptiven Basis detektiert. Basierend auf den Genotypen des SNP rs133072 wurden auch geschlechtsspezifische Analysen für die körperliche Aktivität (s. Tab. 4-9), das prozentuale Körperfett und für die Aufnahme von Fett mit der Nahrung in Untergruppen der Studiengruppe 1 durchgeführt. Die Analysen der genotypabhängigen Bewegungsaktivitäten von 399 adipösen Kindern und Jugendlichen, deuten darauf hin, dass bei den adipösen Jungen der nicht mit Adipositas assoziierte GG-Genotyp, der ein reduziertes MCH-Signal impliziert, mit erhöhter körperlicher Aktivität assoziiert sein könnte. Ebenso könnten bei den Mädchen sowohl der Körperfettanteil als auch die prozentuale Energieaufnahme aus Fett von dem Genotyp des SNP rs133072 abhängen. Diese Ergebnisse sind bis zu ihrer Bestätigung als vorläufig anzusehen, denn es erfolgte keine Korrektur der einseitigen p-Werte für multiples Testen. Zudem ist die retrospektive Einstufung der körperlichen Aktivität der Kinder in verschiedenen Altersstufen nicht unabhängig. So hat z. B. ein Kind, das im Vergleich zu Gleichaltrigen im Alter von 6 bis 10 Jahren aktiver war, eine höhere Chance, auch im Alter von 11 bis 14 aktiver zu sein.

### 5.1.7 Assoziations- und Transmission-Disequilibrium-Tests in unabhängigen deutschen und ausländischen Studiengruppen

Neben der Feststellung einer zugrunde liegenden funktionellen Auswirkung ist es unbedingt notwendig, eine positive Assoziation in unabhängigen Studiengruppen zu bestätigen (Übersicht Campbell und Rudan 2002; Übersicht Hirschhorn und Altshuler 2002). Aufgrund der großen Studiengruppe von 620 adipösen Kindern und Jugendlichen (Studiengruppe 1) und der Verfügbarkeit von sowohl untergewichtigen als auch von normalgewichtigen Kontroll-Personen war es möglich, die initial identifizierte Assoziation der SNPs rs133072 und rs133073 mit Adipositas unabhängig zu bestätigen. Um die Assoziation erneut bestätigen zu können, wurde hauptsächlich der SNP rs133072 in zusätzlichen Studiengruppen genotypisiert, die sowohl Kinder als auch Erwachsene aus Deutschland, aber auch aus anderen Ländern, umfassen. Die Allel- und Genotypfrequenzen bei Kindern und Jugendlichen, die sich in der Berliner Charité vorgestellt hatten (Studiengruppe 5), waren vergleichbar mit denen, die bei den ursprünglichen Fällen und Kontroll-Personen detektiert worden waren. Auch die geschlechtsspezifischen Assoziationstests ergaben eine höhere Frequenz des A-Allels bei den Jungen (40,8 %) im Vergleich zu den Mädchen (30,1 %), d. h. sie bestätigten einen stärker ausgeprägten Effekt bei den männlichen adipösen Kindern im Vergleich zu den Mädchen. Jedoch konnten in der „Berliner“ Studiengruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällen (n = 196) und Kontroll-Personen (n = 99) ermittelt werden (alle unkorrigierten einseitigen p-Werte lagen zwischen 0,076 und 0,239), vermutlich aufgrund der geringen Anzahl der verfügbaren Probanden (s. Tab. 4-10). Um die beobachteten Allel-Unterschiede des SNP rs133072 (Frequenz des A-Allels bei Adipösen 39,1 % und bei Nicht-Adipösen 32,4 %) mit 80 % Power zu detektieren, sind Fall-Kontroll-Studien mit je 370 Individuen pro Gruppe erforderlich.

Ebenso erfolgte die Genotypisierung eines großen deutschen Studienkollektivs (n = 4.056; KORAS2000; Filipiak et al. 2001), das die Stadt und Region Augsburg repräsentiert. In dem Assoziationstest wurden die Allel- und Genotypfrequenzen der SNPs rs133072 und rs133073 zwischen 393 Individuen mit einem BMI > 90. Perzentile und 2.052 Personen mit einem BMI ≤ 50. Perzentile verglichen. Der Test war negativ, aber er zeigte eine Tendenz für ein häufigeres Auftreten des A-Allels (rs133072) in der adipösen Studiengruppe (s. Tab. 4-11). In eine *post hoc* Analyse flossen nur diejenigen adipösen Individuen mit einem BMI > 90. Perzentile ein, die jünger als 40 Jahre waren, weil die initialen positiven Befunde aus den Assoziationsanalysen und TDTs bei Kindern und Jugendlichen detektiert wurden. Hierbei konnte ein häufigeres Auftreten der mit Adipositas assoziierten Allele A des SNP rs133072

(einseitige p-Werte  $\leq 0,12$ ) und C des SNP rs133073 (einseitige p-Werte  $\leq 0,063$ ) bestätigt werden. Die nicht erreichten Signifikanzniveaus könnten auch hier Ausdruck der zu geringen Zahl der adipösen Personen sein. Dies weist darauf hin, dass der mit Adipositas assoziierte Haplotyp des *MCHR1* in den ersten Lebensjahrzehnten für die Regulation des Körpergewichts relevant sein könnte. Tatsächlich wird basierend auf einer großen longitudinal untersuchten Zwillingstichprobe angenommen, dass die genetischen Faktoren, die im Alter von 20 Jahren relevant sind, nur zu 30 % mit denen überlappen, die im Alter von 40 Jahren von Bedeutung sind. Zwischen 40 und 60 Jahren sind weitgehend die gleichen Gene relevant (Fabsitz et al. 1992). Im Gegensatz zu den geschlechtsspezifischen Assoziationsbefunden in dem Marburger Studienkollektiv deuten die Daten der KORA-Studiengruppe darauf hin, dass der Effekt der prädisponierenden Allele bei den erwachsenen Frauen unter 40 Jahren stärker war.

Zusätzlich wurde der SNP rs133072 in Studiengruppen genotypisiert, die Erwachsene aus Frankreich, Dänemark und Nordamerika umfassten, um die initialen positiven Assoziations- und TDT-Ergebnisse bezüglich des A-Allels des SNP rs133072 bestätigen zu können. In der französischen Studiengruppe (Studiengruppe 8) war das A-Allel bei den adipösen Individuen nur geringfügig häufiger und die Assoziation war nicht signifikant (einseitiger p-Wert = 0,37). Im Gegensatz dazu war das A-Allel bei den adipösen Probanden der dänischen Studiengruppe (Studiengruppe 7) seltener (einseitiger p-Wert = 1). Diese Studiengruppe umfasste Wehrdienstpflichtige, die in dem Zeitraum von 1953 bis 1977 rekrutiert worden sind (Sonne-Holm et al. 1989; Echwald et al. 2001). Der BMI-Grenzwert für Adipositas ( $\text{BMI} \geq 31$ ) und Normalgewicht ( $\text{BMI} < 31$ ) wurde bei der Musterung definiert. Im Alter von 14 Jahren betrug der mittlere BMI der dänischen adipösen Studiengruppe  $26,05 \text{ kg/m}^2$  (Sørensen und Sonne-Holm 1988), was indiziert, dass das Ausmaß der Adipositas in diesem Alter nicht wirklich vergleichbar ist mit dem der Indexpatienten der Studiengruppe 1, die die initialen Hinweise für Assoziation und Transmissions-Ungleichgewicht lieferten; deren mittlerer BMI in dem mittleren Alter von 14 Jahren war  $33,4 \pm 6,6 \text{ kg/m}^2$ . Sowohl das Geschmacks-Spektrum als auch die Energiedichte der Nahrung haben sich seit 1977 grundlegend geändert. Zusätzlich bewegen sich die Kinder der heutigen Generation mit großer Wahrscheinlichkeit weniger. Es ist somit denkbar, dass sich die orexigene Wirkung des MCH über die Bindung an diejenige Rezeptorvariante, die den mit Adipositas assoziierten Haplotyp beinhaltet, verstärkt in einer veränderten Geschmackspräferenz hin zu fettreicheren Nahrungsmitteln und/oder in einer geringeren körperlichen Aktivität ausdrücken. Demzufolge könnte der Effekt des *MCHR1* Haplotyps oder eines der Allele erst in den vergangenen Jahren für die epidemiologische Ausbreitung der Adipositas relevant geworden sein. Der Transmission-Disequilibrium-Test

bei den amerikanischen Trios ( $n = 187$  Trios) war negativ ( $p = 1$ ). Ursächlich hierfür könnte u. a., wie in der Berliner Studiengruppe, ebenso die zu geringe Anzahl der in den TDT eingeflossenen Proben sein. Um die beobachtete Transmissionsrate von 58,5 % (95 % CI: 54,0 % - 62,8 %) mit 80 % Power zu finden, sind bei gegebener Allelfrequenz 206 heterozygote Eltern (etwa 250 Trios) notwendig.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Versuch, die Assoziation in anderen Studiengruppen erneut zu bestätigen, nicht erfolgreich war. Jedoch wurde in der Berliner Studiengruppe ein starker Trend in derselben Richtung wie in der Marburger Studiengruppe festgestellt. Zusätzlich deuten die *post hoc* Tests in der KORAS2000 Studiengruppe darauf hin, dass die Assoziation hauptsächlich oder ausschließlich auf die Individuen zurückzuführen ist, die jünger als 40 Jahre sind. Während die französischen Daten einen Trend in die erwartete Richtung zeigten, konnte dieser Trend sowohl durch die dänischen als auch die amerikanischen Studiengruppen nicht bestätigt werden.

Die Möglichkeit, dass die originalen und bestätigten Assoziationsbefunde falsch positiv waren, kann nicht ausgeschlossen werden. Bei einer sehr großen Anzahl von bisher untersuchten Kandidatengen in der Klinischen Forschergruppe Marburg kann prinzipiell auch von einem Zufallsbefund ausgegangen werden. Ein Signifikanzniveau von 0,05 schließt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ein und damit die Möglichkeit einer falsch positiven Assoziation bei jedem 20. Test.

Als Konsequenz sollten zusätzliche Studien folgen, um die Effekte der beiden SNPs in der CDS und der MCHR1 Haplotypen beurteilen zu können. Bei der Auswahl der Studienkollektive für zukünftige Studien sollte entsprechend der Powerkalkulation (Kooperationspartner: PhD stud. F. Geller/Prof. H. Schäfer; Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg) auf einen ausreichend großen Stichprobenumfang geachtet werden: 370 Personen für eine Fall-Kontroll-Studie sowie 250 Trios für den TDT. Die angegebenen Zahlen sollten als untere Grenzen für den Umfang der Stichproben verstanden werden, da es bekannt ist, dass initiale Studien dazu tendieren, den wahren Effekt über zu bewerten. Im Hinblick auf die vorgestellten Ergebnisse sollte bei zukünftigen Studien zum MCHR1 besonderes Augenmerk auf den Einfluss des Alters und des Geschlechts gelegt werden. Aufgrund dessen, dass sowohl das A-Allel des SNP rs133072 als auch das C-Allel des SNP rs133073 nicht nur am häufigsten bei den adipösen Probanden ( $> 90$ . BMI-Perzentile), sondern auch bei den unter- und normalgewichtigen Individuen ( $< 40$ . BMI-Perzentile) bzw. am seltensten bei den normalgewichtigen Individuen zwischen der 50. und 60. BMI-Perzentile in der KORAS2000 Studiengruppe zu verzeichnen waren (s. Tab. 4-12), sollte in zukünftigen

Studien die BMI-Verteilung der Kontroll-Gruppe nicht unbeachtet bleiben. Weiterhin fordern sowohl die *Mchr1* Knockout Daten als auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse eine zusätzliche Phänotypisierung der Körperzusammensetzung, der körperlichen Aktivität und des Fettanteils an der Gesamt-Energieaufnahme ein.

## 5.2 Beteiligung des SNP rs133072 und des *MCHR1* Haplotyps an der Entstehung der Adipositas

Insbesondere die *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Chen et al. 2002; Marsh et al. 2002) verdeutlichten die bedeutende Rolle des MCHR1 bei der Vermittlung der Effekte des MCH auf die Energiehomöostase und Nahrungsaufnahme und damit auf den Körperfettgehalt und das Körpergewicht. MCHR1 vermittelt die orexigenen Effekte des MCH, da ein über sechs Tage zentral verabreichtes MCH zu einer signifikant höheren Nahrungsaufnahme und einem signifikant höheren Körpergewicht bei den Wildtyp-Mäusen führte, jedoch zu keinem Effekt bei den *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Marsh et al. 2002). Aus diesem Grund waren bei einer Ausschaltung des *MCHR1* ein vermindertes Körpergewicht, ein verminderter Körperfettgehalt und eine verminderte Nahrungsaufnahme zu erwarten gewesen. Die *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse waren entsprechend der Erwartung durch einen verminderten Körperfettgehalt, ein vermindertes Körpergewicht, aber entgegen der Erwartung durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme gekennzeichnet (Chen et al. 2002). Die Ursache für diesen nicht erwarteten Befund könnte eine veränderte Nahrungs- und Geruchspräferenz der *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sein, da bei der Fütterung einer Diät mit hohem Fettgehalt (40 %) die signifikante Hyperphagie der *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse unter Standarddiät aufgehoben wurde (Marsh et al. 2002). Es wäre demnach denkbar, dass das orexigene MCH bei der Bindung an den MCHR1 eine Präferenz zu fetthaltigeren und damit energiereicheren Nahrungsmitteln bewirken könnte. Andererseits kann vermutet werden, dass die unerwartete erhöhte Nahrungsaufnahme bei den *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen durch die erhöhte metabolische Rate verursacht wurde, die wiederum Folge der erhöhten körperlichen Aktivität der *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sein könnte. Aber ebenso könnte die erhöhte metabolische Rate auch Folge dessen sein, dass MCH als orexigenes Neuropeptid über MCHR1 normalerweise die metabolische Rate herunter reguliert und bei *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäusen diese Hemmung nicht mehr gegeben ist.

Andererseits war die Energieeffizienz (Körpergewichtszunahme pro Kilokalorie) bei den männlichen *MCHR1* Knockout-Mäusen signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen (Chen et al. 2002). Das wiederum bedeutet, dass das orexigene MCH über den MCHR1 zu einer verbesserten Energieverwertung führen könnte, also pro Kilokalorie aufgenommener Nahrung eine verstärkte Gewichtszunahme erzielt.

Die *Mchr1*<sup>-/-</sup>-Mäuse waren signifikant aktiver im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Chen et al. 2002). Dies lässt wiederum vermuten, dass das orexigene MCH über MCHR1 die Bewegungsfreudigkeit hemmen könnte, um möglicherweise Energie einzusparen.

Zusammenfassend deuten die metabolischen und physiologischen Veränderungen der *MCHR1*<sup>-/-</sup> Mäuse (Chen et al. 2002; Marsh et al. 2002) darauf hin, dass die orexigene Wirkung des MCH, die über MCHR1 vermittelt wird, folgendes bewirkt: a) eine veränderte Geschmackspräferenz zu fettreicheren Nahrungsmitteln, b) eine bessere Energieverwertung, c) eine Senkung des Energieverbrauchs durch u. a. d) eine Verminderung der körperlichen Aktivität. Diese Änderungen entsprechen Effekten des MCH, die einerseits eine erhöhte Energieaufnahme (a) und andererseits eine Energieeinsparung (b-d) bewirken, also alles Effekte, die von einem orexigenen Neuropeptid in einer „Hunger“-Phase zu erwarten sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass MCH zusätzlich eine erhöhte Nahrungsaufnahme bewirkt, was, wenn auch nicht durch die *Mchr1*<sup>-/-</sup> Maus, aber durch zahlreiche Studien mittels i.c.v. Injektion des MCH bei Mäusen und Ratten gezeigt wurde (Qu et al. 1996; Rossi et al. 1997; Sahu 1998; Ludwig et al. 1998, 2001; Rossi et al. 1999; Suply et al. 2001; Chaffer und Morris 2002; Della-Zuana et al. 2002; Gomori et al. 2003; Ito et al. 2003; Kela et al. 2003).

In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass es als Folge der genetischen Variabilität des *MCHR1* bzw. seines 5' Bereiches zu einer Verstärkung des MCH-Signals kommt, woraus wiederum eine Präferenz zu fettreicheren Nahrungsmitteln, eine verbesserte Energieverwertung aus der Nahrung, eine Senkung des Energieverbrauchs, eine Verminderung der körperlichen Aktivität bzw. eine erhöhte Nahrungsaufnahme resultieren. Zusammengenommen führen diese Effekte zu einer Ansammlung von Körperfett, also einer Ausbildung von Adipositas.

Die *Pmchr1*<sup>-/-</sup> *ob/ob*-Doppel-Knockout-Maus (Segal-Lieberman et al. 2003), bei der die Adipositas der *ob/ob*-Maus aufgrund einer Erhöhung der metabolischen Rate und einer erhöhten physischen Aktivität abgeschwächt war, bestätigt ebenso wie die dünne *Pmchr1*<sup>-/-</sup>-Maus (Shimada et al. 1998) mit einer erhöhten metabolischen Rate eine entscheidende Rolle des MCH bei der Regulation der Energiehomöostase in Form einer Senkung des Energieverbrauchs.

Der erhöhten Präferenz zu fettreicheren Nahrungsmitteln steht entgegen, dass bei Angebot sowohl einer fett- als auch einer kohlenhydratreichen Diät bei Ratten eine i.c.v. Gabe von MCH die Aufnahme beider Diäten gleichermaßen stimuliert, die Auswahl der Nahrung also nicht beeinflusst (Clegg et al. 2003). Für eine geänderte Geschmackspräferenz aufgrund einer genetischen Variabilität des *MCHR1* spricht die Expression der *MCHR* mRNA in den olfaktorischen Regionen des Hippocampus (Lembo et al. 1999; Saito et al. 1999, 2001;

Hervieu et al. 2000; Kokkotou et al. 2001; Übersicht Saper et al. 2002; Hervieu 2003).

Die Expression des *MCHR1* im Nucleus accumbens und die Verbindung von MCH-Neuronen zum Nucleus accumbens (Übersicht Saper et al. 2002) deuten darauf hin, dass MCH ebenso an der Ausbildung des Appetits beteiligt sein könnte. MCH scheint somit auch eine Rolle bei der Erhöhung des hedonistischen Anteils der Nahrung zu spielen (Übersicht Saper et al. 2002). MCH könnte über den Nucleus accumbens die Entwicklung des Appetits fördern und somit zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme über den eigentlichen Energiebedarf des Organismus hinaus und demzufolge zu einer Anreicherung von Körperfett führen.

Die Theorie der Appetitverstärkung durch MCH über die Bindung an MCHR1 wird durch die Untersuchungsergebnisse zu dem MCHR1-Antagonisten SNAP-7941 unterstützt, der sowohl eine Hemmung des Appetits als auch der Aufnahme von schmackhafter Nahrung bewirkte (Borowsky et al. 2002).

Die Befunde zu MCH und MCHR1 bei Mäusen und Ratten bezeugen eindrücklich die Beeinflussung der Energiehomöostase und der Nahrungsaufnahme und damit des Körpergewichts durch MCH über die Bindung an den MCHR1. Beim Menschen ergab die Untersuchung des hoch plausiblen Kandidatengens *MCHR1* eine Assoziation des A-Allels des Missense-SNP rs133072 mit Adipositas und dessen überzufällige Transmission, sowie einen mit Adipositas assoziierten Haplotyp, der ebenso überzufällig häufig transmittiert wurde. Funktionelle *in vitro* Studien ergaben eine gesteigerte MCH-Aktivität bei Vorhandensein der Asn<sup>32</sup>-Variante (basierend auf dem A-Allel des SNP rs133072) und des mit Adipositas assoziierten Haplotyps. Obwohl detaillierte Informationen über die zugrundeliegenden Mechanismen nicht verfügbar sind, ist es vorstellbar, dass durch die erhöhte Sensitivität der Asn<sup>32</sup>-Variante dem Agonisten MCH gegenüber und auch durch die Hochregulierung der Expression des *MCHR1* die orexigenen Effekte des MCH über die Bindung an den MCHR1 verstärkt werden. Dies würde bedeuten, dass diejenigen Personen, die den mit Adipositas assoziierten Haplotyp und damit das A-Allel des SNP rs133072 tragen, schon frühzeitig „Hunger“-Gefühle bzw. Appetit empfinden könnten, wenn MCH bei einem nur leichten oder beginnendem Energiedefizit des Organismus erst in geringen Konzentrationen und mit einem geringen Schwellenwert über die Bindung an den MCHR1 ein frühes Signal ausübt. Mit der Förderung des Appetits werden auch die Nahrungsaufnahme sowie die Effekte des MCH zur Energieeinsparung (veränderte Geschmackspräferenz zu fettreicheren Nahrungsmitteln, bessere Energieverwertung, Senkung des Energieverbrauchs, Verminderung der körperlichen Aktivität) stimuliert. Diese Verstärkung des orexigenen MCH-Signals entspricht der eingangs gestellten Hypothese, dass bei den adipösen Probanden eine höhere Aktivität des MCHR1 zu erwarten ist. Der Befund der explorativen Analyse zur Hyperaktivität zeigt wie erwartet eine höhere Frequenz des nicht mit

Adipositas assoziierten G-Allels des SNP rs133072 bei den bewegungsfreudigeren Kindern und Jugendlichen. Die *post hoc* Analyse zum prozentualen Körperfett-Anteil zeigte einen höheren Körperfettgehalt nur bei den Mädchen, die homozygot für das mit Adipositas assoziierte A-Allel des SNP rs133072 sind, was ebenso der orexigenen Wirkung des MCH entspricht. Eine weitere *post hoc* Analyse ergab einen unerwartet hohen Anteil der Gesamtenergieaufnahme aus Fett bei den adipösen Kindern und Jugendlichen, die homozygot für das nicht mit Adipositas assoziierte G-Allel sind. In diesem Zusammenhang muss jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die phänotypisch orientierten *post hoc* Tests lediglich Hinweise auf eine eventuelle Beteiligung des Missense-SNP rs133072 des *MCHR1* an der Ausprägung der beschriebenen Phänotypen geben und keine endgültigen Ergebnisse lieferten.

Bislang konnte mittels Genom-Scans keine Kopplung für Adipositas auf Chromosom 22q13 gefunden werden (s. u. 1.3.1). In dem Genom-Scan der Klinischen Forschergruppe Marburg (Saar et al. 2003), der mit 89 Familien, basierend auf adipösen Kindern und Jugendlichen und deren adipösen Geschwistern, durchgeführt wurde, konnte für den Marker D22S283, der etwa 4,3 Mb proximal zu *MCHR1* gelegen ist, ([http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public\\_html/22smap/smap.html](http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/22smap/smap.html)) ein Maximum likelihood binominal lod score (MLB) von nur 0,2 ermittelt werden. Da das relative Risiko, das mit dem A-Allel des SNP rs133072 verbunden ist, für heterozygote Träger nur 1,5 beträgt, wären mehrere tausend Geschwisterpaare notwendig, um eine Kopplung feststellen zu können (Risch und Merikangas 1996). In der Literatur sind positive Kopplungsbefunde auf 22q für andere Phänotypen bzw. Krankheiten beschrieben worden, die in Zusammenhang zum Körpergewicht stehen. So konnte ein quantitative trait locus (QTL) für Serum Leptin-Spiegel, die für Serum Testosteron adjustiert wurden, auf Chromosom 22q in Mexikanischen Amerikanern gefunden werden (Martin et al. 2002). Auf 22q12-13 konnte bei Pima Indianern Kopplung mit Nüchtern-Plasma-Glucose-Spiegeln detektiert werden (Pratley et al. 1998). Ebenso wurde von einer Kopplung mit Diabetes mellitus Typ 2 an dem Marker D22S423 (etwa 0,7 Mb proximal zu *MCHR1*) berichtet (Ghosh et al. 2000). Leider konnte nicht durchgängig für alle in die Assoziations- und TDT-Analysen eingeflossenen Probanden der „Marburger“ Studiengruppe die Nüchtern Serum Leptin und Glucose-Spiegel erfasst werden, so dass auch Assoziationsanalysen für diese Phänotypen hätten durchgeführt werden können.

In Übereinstimmung mit den Kriterien für eine solide Assoziations-Studie zu einer häufigen Krankheit (Übersicht Campbell und Rudan 2002; Dahlman et al. 2002; Übersicht Hirschhorn und Altshuler 2002) wurde initial eine Assoziation für ein Allel in einem hoch plausiblen Kandidatengen mit Adipositas detektiert, die in einer zweiten Fall-Kontroll-Studie unabhängig bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse wurden durch Familien-basierte Studien

unterstützt. Bei dem Versuch, diese Ergebnisse in der jungen deutschen Studiengruppe aus Berlin sowie in der großen epidemiologischen Studiengruppe der Region Augsburg, erneut zu bestätigen, wurden Trends in die erwartete Richtung gefunden. Die Versuche, die Assoziation außerhalb Deutschlands erneut zu bestätigen, können nicht als erfolgreich eingeschätzt werden. Eine plausible Interpretation der Befunde ist, dass die Assoziation nur für die früh-manifeste Adipositas zutreffend ist, unter Annahme eines besonderen genetischen und/oder Umwelt-Hintergrundes. Zusätzliche Studien in anderen Populationen sind notwendig.

Eine funktionelle Implikation des SNP rs133072 und der SNPs in der Promoterregion wurden in *in vitro* Assays detektiert, die auf eine Erhöhung der MCH-Wirkung *in vivo* hindeuten. Während eine gain-of-function des MCHR1 vereinbar ist mit den Befunden, dass ein verstärktes MCH-Signal in einem erhöhten Körpergewicht resultieren sollte, sind zusätzliche Studien erforderlich um zu bestimmen, welches Translationsprodukt beim Menschen existiert. Das relative Risiko von 1,51 bzw. 1,95 für heterozygote bzw. homozygote Träger des A-Allels des SNP rs133072, wie es für die Studiengruppe 1 berechnet worden ist, deuten auf einen schwachen Effekt auf das individuelle Körpergewicht hin. Die Träger des *MCHR1* Haplotyps und der Asn<sup>32</sup>-MCHR1-Variante haben jedoch ein etwa 24 %iges attributables Risiko, adipös zu werden. Dieses hohe Risiko ist in der hohen Frequenz des A-Allels begründet. Die Auswirkung eines SNPs oder Haplotyps in einem solch hohen attributablen Risiko steht in voller Übereinstimmung mit der „thrifty genotype“ Hypothese (Übersicht Neel 1999). Diese Hypothese von dem sparsamen Genotyp beschrieb eine bessere Überlebenschance derjenigen Personen mit sogenannten „sparsamen“ Genen, die die aufgenommene Nahrung mit einer höheren Effizienz in Körperfett umwandeln konnten und somit bessere Überlebenschancen in Zeiten der Nahrungsmittelknappheit hatten. In der heutigen Zeit, in der es Nahrung im Überfluss gibt, ist ein Genotyp, der zur besseren Energieverwertung aus der aufgenommenen Nahrung und damit zu einer Anreicherung von Körperfett prädisponiert, eher von Nachteil als von Vorteil. Eine genetische Prädisposition zur Adipositas führt offensichtlich erst durch entsprechende Umweltbedingungen zur Ausprägung bzw. Verstärkung der Fettleibigkeit.

Die Hinweise auf eine Beteiligung des MCHR1 an der Ausprägung des Phänotyps Adipositas eröffnet die Möglichkeit der Entwicklung von MCHR1-Antagonisten, die in Form von Medikamenten zur Prävention und Behandlung der Adipositas eingesetzt werden können.

### 5.3 Auswahl der Studienkollektive

Das für die Analyse des *MCHR1* verwendete Studienkollektiv setzt sich aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen zusammen, deren mittleres Alter bei 13 Jahren liegt. Es wird angenommen, dass die genetische Prädisposition bei der frühmanifesten Adipositas für die Ausprägung des adipösen Phänotyps stärker im Vordergrund steht und weniger durch Umweltfaktoren „verdünnt“ ist als bei der im Erwachsenenalter manifest werdenden Adipositas (Pietilainen et al. 2001). Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit des Fortbestehens einer Adipositas im Kindes- und Jugendalter ins Erwachsenenalter hinein nicht nur mit dem Ausprägungsgrad der Adipositas sondern auch bei elterlicher Belastung mit Adipositas (Whitaker et al. 1997). Da in dem Studienkollektiv der Klinischen Forschergruppe Marburg (Leiter: Prof. J. Hebebrand) etwa 50 % der rekrutierten Kinder und Jugendlichen einen BMI > 99. Perzentile hatten und zudem 50 % der Mütter bzw. Väter eine Adipositas vorwiesen, ist die Vorhersagekraft des aktuellen Gewichts für das Gewicht als Erwachsener sehr hoch. Aus diesem Grund eignet sich das aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen bestehende Studienkollektiv besonders gut zur Detektion von genetischen Varianten, die zur Ausprägung des adipösen Phänotyps prädisponieren.

Für das Mutationsscreening und die Assoziationsstudien wurden neben den Fällen (adipöse Probanden) auch Kontroll-Personen eingesetzt. Die Studiengruppe der Kontroll-Personen setzte sich aus unter- und normalgewichtigen Studenten zusammen. Eine Kontrollgruppe sollte sich idealerweise nur in einem Merkmal – dem zu untersuchenden Phänotyp Körpergewicht – von den Fällen unterscheiden. Dies wurde u. a. durch Ausschluss von Krankheiten (z. B. Diabetes mellitus) oder Verhaltensweisen, die das Körpergewicht beeinflussen können (z. B. starker Zigarettenkonsum), erzielt. Als Kontrollgruppe wurden erwachsene unter- bzw. normalgewichtige Personen herangezogen, um das Risiko zu vermindern, dass sich eine Adipositas im weiteren Verlauf entwickelt.

Um eine falsch positive Assoziation auszuschließen, können weitere Assoziationsanalysen mit unabhängigen Studiengruppen durchgeführt werden. Dies erfolgte in der vorliegenden Studie a) mit übergewichtigen versus normalgewichtigen Studenten, b) adipösen versus normalgewichtigen Kindern aus Berlin, c) adipösen versus normal- und untergewichtigen deutschen Erwachsenen aus der Stadt und Region Augsburg, d) adipösen versus normal- bzw. untergewichtigen dänischen Männern und e) adipösen versus normalgewichtigen französischen Erwachsenen.

Die Durchführung einer familienbasierten Assoziationsstudie – hier ein TDT (Spielman et al. 1993) – gibt eine zusätzliche Möglichkeit, sehr zuverlässig, falsch positive Assoziationen

auszuschließen. Für den TDT sind Trios erforderlich, d. h. die Eltern der Indexprobanden müssen zusätzlich verfügbar sein. Bestehende Transmissions-Ungleichgewichte sind in den TDTs für die kodierenden SNPs des *MCHR1* zweimal in voneinander unabhängigen Kollektiven durchgeführt worden. Jedoch sind die adipösen Kinder und Jugendlichen, auf denen die in die TDTs eingeflossenen Trios basieren, nicht unabhängig von denjenigen, die in die Assoziationsanalysen eingeflossen sind. Dieses Problem war aufgrund mangelnder Verfügbarkeit eines zusätzlichen großen Trio-Kollektivs, dessen adipöse Indexpatienten unabhängig von einer für das Mutationsscreening und damit für die Assoziationsanalysen verwendeten Studiengruppe war, unumgänglich.

## 5.4 Methoden zur Mutationsdetektion

### 5.4.1 PCR und PCR-basierte Methoden

Die PCR (s. u. 3.2) ist eine schnelle, einfache, sensitive und stabile Methode zur Amplifizierung von Ziel-DNA (Strachan und Read 1999). Die Qualität der PCR ist die entscheidende Grundlage für die Detektierung unbekannter Sequenzvarianten bzw. die Genotypisierung von SNPs. Die Spezifität der DNA-Amplifizierung durch die PCR ist v. a. abhängig von der Bindung der Primer an die Sequenz der Ausgangs-DNA (Strachan und Read 1999). Aus diesem Grund sollte bei der Generierung der Primer und bei der Optimierung der PCR sehr sorgfältig gearbeitet werden. Ziel bei der Optimierung der PCR ist es, eine hohe Ausbeute des Amplifikates sowie einen möglichst geringen Anteil an unspezifischen PCR-Produkten aufgrund der Bindung der Primer an Sequenzen, die nicht der Ziel-DNA-Sequenz entsprechen, zu erzielen. Bei der Re-Sequenzierung des *MCHR1*-Locus und 9,8 kb der 5' Region wurde das Prinzip der nested PCR verwendet, um die Spezifität der Amplifizierung zu verbessern. Die hohe Sensitivität der PCR setzt jedoch größte Vorsicht voraus. Kontaminationen der humanen Proben-DNA mit z. B. der DNA des Untersuchers sollten unbedingt vermieden werden. Um die Kontaminations- und damit Fehlerrate möglichst gering zu halten, erfolgte im Labor eine räumliche Trennung von Vor- und Nach-PCR-Bereich. Diese räumliche Trennung schloss auch eine Trennung der in den beiden Bereichen verwendeten Geräte und Materialien sowie der Schutzkleidung ein. Um eine Kontrolle über eine eventuelle Kontamination zu haben, wurde in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle in Form von Aqua bidest anstelle von DNA mitgeführt. Amplifizierte DNA mit einer positiven Kontrolle dürfen nicht weiter analysiert werden, sondern müssen verworfen werden.

Die Nachteile der PCR sind eine erforderliche Information zur Ziel-Sequenz, eine kurze Länge der amplifizierbaren Sequenz, eine limitierte Produktmenge und eine mangelnde Wiedergabetreue (Strachan und Read 1999). Die Sequenz des *MCHR1*-Locus war verfügbar (genomische DNA Z86090; mRNA AF490537). Für das Mutationsscreening des *MCHR1* wurde das Gen mittels überlappender PCR-Fragmente amplifiziert. Die Produktmenge war für die Methoden der SSCP, der dHPLC zur Mutationssuche ausreichend. Die mangelnde Wiedergabetreue ergibt sich aus der fehlenden 3'→5' Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase, die zu einer falschen Base bei 40 % der DNA-Stränge in 1 kb führt (Strachan und Read 1999). Diese fehlerhaften Basen befinden sich meist randständig, weshalb die *Taq*-Polymerase für das Mutationsscreening Sequenzierung verwendbar, aber ungeeignet für nachfolgende funktionelle Studien ist. Für die zellbasierte Klonierung muss eine Polymerase eingesetzt werden, die eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität aufweist und damit eine geringere Fehlerrate aufweist, z. B. aus *Pyrococcus furiosus* (Strachan und Read 1999). Fehlerhaft eingebaute Basen können in der dHPLC oder SSCP irrtümlich als eine Sequenzvariante detektiert werden. Aus diesem Grund erfolgte bei der Identifizierung einer neuen Sequenzvariante mittels SSCP oder dHPLC immer eine wiederholte PCR und Analyse. Die Wahrscheinlichkeit für einen Polymerase-Fehler an der gleichen Position ist sehr gering. Zum Ausschluss einer „falschen“ Sequenzvariante wurden alle neu identifizierte Sequenzvarianten durch alternative Methoden wie die Sequenzierung, PCR-RFLP oder Tetra-Primer ARMS-PCR verifiziert. Aus diesem Grund können Polymerase-Fehler bei allen gefunden Sequenzvarianten ausgeschlossen werden. Für zwei der seltenen Varianten waren weder eine PCR-RFLP aufgrund einer fehlenden Schnittstelle noch eine Tetra-Primer ARMS-PCR aufgrund unlösbarer Probleme bei der Optimierung der PCR zur Verifizierung anwendbar. Aus diesem Grund erfolgte neben dem Nachweis über die Sequenzierung ein zusätzliches Screening mittels dHPLC (s. u. 3.3.2), bei der die Varianten sichtbar wurden. Der erneute Nachweis dieser beiden Varianten kann jedoch nicht als eindeutige Verifizierung eingestuft werden, da die Position und Art des Nukleotidaustausches über die dHPLC nicht erkennbar sind.

Für die Durchführung von Assoziationsstudien von SNPs ist eine möglichst geringe Fehlerrate bei der Genotypisierung mittels PCR-basierter Methoden wie die PCR-RFLP und Tetra-Primer ARMS-PCR besonders wichtig, um eine „falsche“ Assoziation bzw. das Nicht-Auffinden einer vorhandenen Assoziation zu vermeiden. Eine zusätzliche Verminderung der Fehlerrate erfolgte jeweils über eine zweite unabhängige Auswertung durch einen zweiten unabhängigen und erfahrenen Mitarbeiter. Zusätzlich erleichterte ein Mitführen von DNAs mit bekannten Genotypen in jeder „PCR-Platte“ eine genaue Auswertung.

Eine zusätzliche Kontrolle der Genauigkeit der ermittelten Genotypen für die Assoziationsstudien ermöglichte die Durchführung des TDTs. Dieser war nicht nur zur Bestätigung der positiven Assoziationen einzelner Allele von SNPs mit Adipositas erforderlich. Er bot zudem die Möglichkeit zu überprüfen, ob die Genotypen der adipösen Kinder und Jugendlichen korrekt ermittelt worden sind. Für den TDT wurden zusätzlich zu den adipösen Indexprobanden jeweils beide Eltern genotypisiert, deren Allele entsprechend den Mendelschen Gesetzen verteilt sein müssen. Falls die erfassten Allele von Kindern und deren Eltern nicht zusammenpassten, konnte eine Wiederholung der Genotypisierung einen eventuell ungenau ausgewerteten Genotyp oder in vereinzelt Fällen einen nicht zum Kind passenden Vater aufdecken. Bei unklarer Vaterschaft flossen die betreffenden Familien nicht in die Analysen ein.

#### 5.4.2 Methoden zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten

Es existieren zahlreiche Methoden zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten, wobei die single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP) und die Sequenzierung die bisher am häufigsten verwendeten Methoden darstellten. Zunehmend werden Methoden benötigt, die das Screening einer großen Anzahl von Proben in zahlreichen Genen mit annähernd 100%iger Sensitivität schnell und einfach ermöglichen (Strachan und Read 1999).

SSCP: Die SSCP-Analyse ist einfach, erfordert nur eine preiswerte Ausstattung, ist sensitiv genug für Fragmente bis zu 200 bp, ermöglicht aber nicht die Identifizierung der Art und der Position der detektierten Varianten (Sheffield et al. 1993). Sie beruht auf der veränderten Laufgeschwindigkeit von einzelsträngiger DNA in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel, die durch veränderte Konformationen der DNA aufgrund von Sequenzvarianten hervorgerufen werden. Die Sensitivität der SSCP ist stark von den Versuchs-Bedingungen abhängig und kann u. a. durch eine Analyse bei zwei unterschiedlichen Temperaturen erhöht werden. Aus diesem Grund erfolgte das Mutationsscreening der CDS des *MCHR1* sowohl bei 4 °C in der Kühlkammer, als auch bei Raumtemperatur. Die detektierten seltenen Varianten bestätigen die Erhöhung der Sensitivität aufgrund dieser Vorgehensweise. Es konnten zwei Varianten (T305M, s. u. 4.2.1.1 und 102491 G>A, s. u. 4.2.1.4) identifiziert werden, die nur bei 4 °C detektierbar waren. Die anderen 9 seltenen Varianten sowie die zwei SNPs im kodierenden Bereich konnten sowohl bei 4 °C als auch bei RT detektiert werden.

dHPLC: Die Methode der dHPLC beruht auf der veränderten Verweildauer von Heteroduplices an der HPLC-Säule. Den Heteroduplices liegen heterozygote Formen von Mutationen zugrunde. Die Heteroduplices werden gebildet, indem die zu analysierenden PCR-Produkte durch Erhitzen

denaturiert und anschließend langsam abgekühlt werden. Für die Detektion von homozygoten Mutationen muss den zu analysierenden PCR-Produkten vor der Analyse Wildtyp-DNA zugesetzt werden. Die dHPLC ermöglicht schnelle Analysen und damit ein High-throughput-Screening von umfangreichen Stichproben, erfordert jedoch eine teure Ausstattung und ermittelt, wie die SSCP, nicht die Position der Sequenzvarianten (Strachan und Read 1999). Mehrere Mutationsscreenings verschiedener humaner Gene mit Hilfe der Methoden dHPLC und SSCP ergaben eine höhere Sensitivität der dHPLC mit nahezu 100 % im Vergleich zur SSCP mit etwa 69 %-94 % (Choy et al. 1999; Jones et al. 1999; Gross et al. 1999). Liu et al. (1997) konnten mit Hilfe der dHPLC nicht alle zuvor mittels SSCP detektierten Mutationen im Fibrillin-1 Gen (*FBN1*) identifizieren, detektierten jedoch 17 weitere und damit doppelt so viele Mutationen wie mittels der SSCP.

Sequenzierung: Die Sequenzierung ist im Gegensatz zur SSCP-Analyse eine teure Methode des Mutationsscreenings, bei der alle Sequenzveränderungen sowie deren Natur und Position detektierbar sind (Strachan und Read 1999). Aus diesem Grund wurde diese Methode ausgewählt, um diejenigen Proben mit auffälligem SSCP-Muster bzw. mit von den Wildtypproben abweichenden dHPLC-Graphen zu sequenzieren und die Varianten bzw. SNPs zu bestätigen und genauer zu charakterisieren. Ebenso wurden einige Wildtyp-Proben pro amplifiziertem Fragment sequenziert, um sicherzustellen, dass das beabsichtigte Fragment des *MCHR1* amplifiziert wurde. Die Sequenzierung diente auch dem Mutationsscreening des gesamten *MCHR1*-Locus sowie von 9,8 kb seiner 5' Region zur Aufspürung neuer Sequenzvarianten und SNPs. Die Sequenzierung war für das Screening dieser großen Regionen geeignet, wobei eine SSCP-Analyse mit nur bis zu 200 bp screenbaren Fragmenten einen unangemessenen Arbeits- und Zeitaufwand bedeutet hätte. Die Sequenzierung erfolgte bei vergleichsweise wenigen Individuen, da sie für ein Screening großer Probandenzahlen aufgrund der hohen Kosten und der aufwendigen Auswertung ungeeignet ist. Die Sequenzierung der CDS des *MCHR1*, die zuvor mittels SSCP gescreent worden ist und des Introns bzw. der ersten 317 bp der 5' Region des *MCHR1*, die zuvor mittels dHPLC gescreent worden sind, ermöglicht eine Validierung der Methoden SSCP und dHPLC. Die Sequenzierung bestätigte die mittels SSCP ermittelten SNPs rs133072 und rs133073 sowie des mittels dHPLC detektierten neuen SNPs 001745619 im Intron. Andererseits konnte bei dem Screening dieser Bereiche mittels Sequenzierung keine weiteren SNPs detektiert werden, die mittels SSCP und dHPLC zuvor nicht detektiert worden waren. Damit wird die Sensitivität der SSCP und der dHPLC unter den für den beschriebenen Mutationsscreen verwendeten Bedingungen als sehr hoch eingeschätzt. Ebenso ist die der SSCP und der dHPLC zugrundeliegende Arbeitsweise als sehr präzise einzuschätzen.

## 6 Literaturverzeichnis

- An S, Cutler G, Zhao JJ, Huang SG, Tian H, Li W, Liang L, Rich M, Bakleh A, Du J, Chen JL, Dai K (2001) Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7576-81
- Abbott CR, Kennedy AR, Wren AM, Rossi M, Murphy KG, Seal LJ, Todd JF, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR (2003) Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* 144:3943-9
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-402. Review
- Anand BK und Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123-140
- Atwood LD, Heard-Costa NL, Cupples LA, Jaquish CE, Wilson PW, D'Agostino RB B (2002) Genomewide linkage analysis of body mass index across 28 years of the Framingham Heart Study. *Am J Hum Genet* 71:1044-50
- Audinot V, Beauverger P, Lahaye C, Suply T, Rodriguez M, Ouvry C, Lamamy V, Imbert J, Rique H, Nahon JL, Galizzi JP, Canet E, Levens N, Fauchere JL, Boutin JA (2001a) Structure-activity relationship studies of melanin-concentrating hormone (MCH)-related peptide ligands at SLC-1, the human MCH receptor. *J Biol Chem* 276:13554-62
- Audinot V, Lahaye C, Suply T, Beauverger P, Rodriguez M, Galizzi JP, Fauchere JL, Boutin JA (2001b) [125I]-S36057: a new and highly potent radioligand for the melanin-concentrating hormone receptor. *Br J Pharmacol* 133:371-8
- Bächner D, Kreienkamp HJ, Richter D (2002) MIZIP, a highly conserved, vertebrate specific melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein. *FEBS Lett* 526:124-8
- Bächner D, Kreienkamp H, Weise C, Buck F, Richter D (1999) Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Lett* 457:522-4
- Barsh GS and Schwartz MW (2002) Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 3:589-600. Review
- Barth N, Ziegler A, Himmelmann GW, Coners H, Wabitsch M, Hennighausen K, Mayer H, Renschmidt H, Schafer H, Hebebrand J (1997) Significant weight gains in a clinical sample of obese children and adolescents between 1985 and 1995. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:122-6
- Baker BI (1991) Melanin-concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. *Int Rev Cytol* 126:1-47. Review
- Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW (1999) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48:828-33
- Bednarek MA, Feighner SD, Hreniuk DL, Palyha OC, Morin NR, Sadowski SJ, MacNeil DJ, Howard AD, Van der Ploeg LH (2001) Short segment of human melanin-concentrating hormone that is sufficient for full activation of human melanin-concentrating hormone receptors 1 and 2. *Biochemistry* 40:9379-86

- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319:218-45
- Bonfield JK, Smith K, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* 23:4992-4999
- Borecki IB, Rice T, Pérusse L, Bouchard C, Rao DC (1994) An exploratory investigation of genetic linkage with obesity phenotypes: the Quebec Family Study. *Obes Res* 2:213-9
- Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C (2002) Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med* 8:825-30
- Bouchard C and Perusse L (1993) Genetics of obesity. *Annu Rev Nutr* 13:337-54. Review
- Boutin JA, Suply T, Audinot V, Rodriguez M, Beauverger P, Nicolas JP, Galizzi JP, Fauchere JL (2002) Melanin-concentrating hormone and its receptors: state of the art. *Can J Physiol Pharmacol* 80:388-95. Review
- Boutin P, Dina C, Vasseur F, Dubois S, Corset L, Seron K, Bekris L, Cabellon J, Neve B, Vasseur-Delannoy V, Chikri M, Charles MA, Clement K, Lernmark A, Froguel P (2003) GAD2 on Chromosome 10p12 Is a Candidate Gene for Human Obesity. *PLoS Biol* 1: E68
- Bradley RL, Mansfield JP, Maratos-Flier E, Cheatham B (2002) Melanin-concentrating hormone activates signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E584-92
- Bradley RL, Kokkotou EG, Maratos-Flier E, Cheatham B (2000) Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes* 49:1073-7
- Breton C, Schorpp M, Nahon JL (1993) Isolation and characterization of the human melanin-concentrating hormone gene and a variant gene. *Brain Res Mol Brain Res* 18:297-310
- Brenner S, Prosch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C (2003) cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem* 278:5597-604
- Britz B, Siegfried W, Ziegler A, Lamertz C, Herpertz-Dahlmann BM, Remschmidt H, Wittchen HU, Hebebrand J (2000) Rates of psychiatric disorders in a clinical study group of adolescents with extreme obesity and in obese adolescents ascertained via a population based study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(12):1707-14
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15043-8
- Bruford EA, Riise R, Teague PW, Porter K, Thomson KL, Moore AT, Jay M, Warburg M, Schinzel A, Tommerup N, Tornqvist K, Rosenberg T, Patton M, Mansfield DC, Wright AF (1997) Linkage mapping in 29 Bardet-Biedl syndrome families confirms loci in chromosomal regions 11q13, 15q22.3-q23, and 16q21. *Genomics* 41:93-9
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48:137-44
- Bultmann SJ, Michaud EJ, Woychik RP (1992) Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71:1195-204

- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-9
- Campbell H and Rudan I (2002) Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J* 2:349-60. Review
- Carmi R, Rokhlina T, Kwitek-Black AE, Elbedour K, Nishimura D, Stone EM, Sheffield VC (1995) Use of a DNA pooling strategy to identify a human obesity syndrome locus on chromosome 15. *Hum Mol Genet* 4:9-13
- Chaffer CL and Morris MJ (2002) The feeding response to melanin-concentrating hormone is attenuated by antagonism of the NPY Y(1)-receptor in the rat. *Endocrinology* 143:191-7
- Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Perusse L, Bouchard C (2003) The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res* 11:313-67. Review
- Chagnon YC, Chung WK, Perusse L, Chagnon M, Leibel RL, Bouchard C (1999) Linkages and associations between the leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:278-86
- Chagnon YC, Perusse L, Lamothe M, Chagnon M, Nadeau A, Dionne FT, Gagnon J, Chung WK, Leibel RL, Bouchard C (1997) Suggestive linkages between markers on human 1p32-p22 and body fat and insulin levels in the Quebec Family Study. *Obes Res* 5:115-21
- Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, Foley JJ, Martin J, Liu WS, Park J, Ellis C, Ganguly S, Konchar S, Cluderay J, Leslie R, Wilson S, Sarau HM (1999) Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* 400:261-5
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 84:491-5
- Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M, Hsiung HM, Fox N, Sliker LJ, Yang DD, Heiman ML, Shi Y (2002) Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* 143:2469-77
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-92
- Choy YS, Dabora SL, Hall F, Ramesh V, Niida Y, Franz D, Kasprzyk-Obara J, Reeve MP, Kwiatkowski DJ (1999) Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. *Ann Hum Genet* 63:383-91
- Clegg DJ, Air EL, Benoit SC, Sakai RS, Seeley RJ, Woods SC (2003) Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R494-9
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392:398-401
- Clement K, Garner C, Hager J, Philippi A, LeDuc C, Carey A, Harris TJ, Jury C, Cardon LR, Basdevant A, Demenais F, Guy-Grand B, North M, Froguel P (1996) Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes* 45:687-90

- Cole TJ and Green PJ (1992) Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med* 11:1305-19
- Collins CA and Kym PR (2003) Prospects for obesity treatment: MCH receptor antagonists. *Curr Opin Investig Drugs* 4:386-94
- Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, Mitchell BD, Mahaney MC, Dyer TD, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J (1997) A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nat Genet* 15:273-6
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001) The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord Suppl* 5:S63-7. Review
- Cooling J and Blundell J (1998) Differences in energy expenditure and substrate oxidation between habitual high fat and low fat consumers (phenotypes). *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:612-18
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-61
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-4
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623-30
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-9
- Dahlman I, Eaves IA, Kosoy R, Morrison VA, Heward J, Gough SC, Allahabadi A, Franklyn JA, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Cucca F, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Stevens H, Carr P, Nutland S, McKinney P, Shield JP, Wang W, Cordell HJ, Walker N, Todd JA, Concannon P (2002) Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat Genet* 30:149-50
- Davidowa H, Li Y, Plagemann A (2002) Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. *Regul Pept* 108:103-11
- Davuluri RV, Grosse I, Zhang MQ (2001) Computational identification of promoters and first exons in the human genome. *Nat Genet* 29:412-7
- Dawson E, Abecasis GR, Bumpstead S, Chen Y, Hunt S, Beare DM, Pabial J, Dibling T, Tinsley E, Kirby S, Carter D, Pappaspyridonos M, Livingstone S, Ganske R, Lohmussaar E, Zernant J, Tonisson N, Remm M, Magi R, Puurand T, Vilo J, Kurg A, Rice K, Deloukas P, Mott R, Metspalu A, Bentley DR, Cardon LR, Dunham I (2002) A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature* 418:544-8
- de los Santos T, Schweizer J, Rees CA, Francke U (2000) Small evolutionarily conserved RNA, resembling C/D box small nucleolar RNA, is transcribed from PWCR1, a novel imprinted gene in the Prader-Willi deletion region, which is highly expressed in brain. *Am J Hum Genet* 67:1067-82

- Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N (2002) Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1289-95
- Dempfle A, Hinney A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Geller F, Gudermann T, Schäfer H, Hebebrand J. Large Quantitative Effect of Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations on BMI, eingereicht
- Deng HW, Deng H, Liu YJ, Liu YZ, Xu FH, Shen H, Conway T, Li JL, Huang QY, Davies KM, Recker RR (2002) A genomewide linkage scan for quantitative-trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet* 70:1138-51
- Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell JC (1991) Body mass index as a measure of body fatness: age- and sex-specific prediction formulas. *Br J Nutr* 65:105-14
- Dietz WH and Robinson TN (1998) Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. *J Pediatr* 132:191-3
- DiLeone RJ, Georgescu D, Nestler EJ (2003) Lateral hypothalamic neuropeptides in reward and drug addiction. *Life Sci* 73:759-68. Review
- Donahue LR and Beamer WG (1993) Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J Endocrinol* 136:91-104
- Dong C, Wang S, Li WD, Li D, Zhao H, Price RA (2003) Interacting genetic loci on chromosomes 20 and 10 influence extreme human obesity. *Am J Hum Genet* 72:115-24
- Dubern B, Clement K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, Tounian P (2001) Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr* 139:204-9
- Duggirala R, Stern MP, Mitchell BD, Reinhart LJ, Shipman PA, Uresandi OC, Chung WK, Leibel RL, Hales CN, O'Connell P, Blangero J (1996) Quantitative variation in obesity-related traits and insulin precursors linked to the OB gene region on human chromosome 7. *Am J Hum Genet* 59:694-703
- Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS (2002) Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 360:473-82. Review
- Echwald SM, Sørensen TIA, Andersen T, Pedersen O (2001) The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1563-1565
- Ehringer MA, Thompson J, Conroy O, Xu Y, Yang F, Canniff J, Beeson M, Gordon L, Bennett B, Johnson TE, Sikela JM (2001) High-throughput sequence identification of gene coding variants within alcohol-related QTLs. *Mamm Genome* 12:657-663
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775-86
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442-59
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22:221-32. Review

- Elmqvist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535-47
- Fabsitz RR, Carmelli D, Hewitt JK (1992) Evidence for independent genetic influences on obesity in middle age. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16:657-66
- Falk CT and Rubinstein P (1987) Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet* 51:227-33
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348:1085-95
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S (2002) Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110:1093-103
- Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106:271-9
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341:879-84
- Feitosa MF, Borecki IB, Rich SS, Arnett DK, Sholinsky P, Myers RH, Leppert M, Province MA (2002) Quantitative-trait loci influencing body-mass index reside on chromosomes 7 and 13: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Hum Genet* 70:72-82
- Filipiak B, Heinrich J, Schafer T, Ring J, Wichmann HE (2001) Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany - results from the MONICA/KORA study Augsburg. *Clin Exp Allergy* 31:1829-1838
- Flier JS and Maratos-Flier E (1998) Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92:437-40. Review
- Forray C (2003) The MCH receptor family: feeding brain disorders? *Curr Opin Pharmacol* 3:85-9. Review
- Funakoshi A, Miyasaka K, Shinozaki H, Masuda M, Kawanami T, Takata Y, Kono A (1995) An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 210:787-96
- Ghosh S, Watanabe RM, Valle TT, Hauser ER, Magnuson VL, Langefeld CD, Ally DS, Mohlke KL, Silander K, Kohtamaki K, Chines P, Balow Jr J, Birznieks G, Chang J, Eldridge W, Erdos MR, Karanjawala ZE, Knapp JI, Kudelko K, Martin C, Morales-Mena A, Musick A, Musick T, Pfahl C, Porter R, Rayman JB (2000) The Finland-United States investigation of non-insulin-dependent diabetes mellitus genetics (FUSION) study. I. An autosomal genome scan for genes that predispose to type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 67:1174-85
- Gilhuis HJ, van Ravenswaaij CM, Hamel BJ, Gabreels FJ (2000) Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 4:39-43. Review
- Glavac D and Dean M (1993) Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 2:404-14

- Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Ito M, Tanaka T, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A (2003) Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E583-8
- Gonzalez MI, Vaziri S, Wilson CA (1996) Behavioral effects of alpha-MSH and MCH after central administration in the female rat. *Peptides* 17:171-7
- Gray DS (1989) Diagnosis and prevalence of obesity. *Med Clin North Am* 73:1-13
- Grillon S, Herve C, Griffond B, Fellmann D (1997) Exploring the expression of the melanin-concentrating hormone messenger RNA in the rat lateral hypothalamus after goldthioglucose injection. *Neuropeptides* 31:131-6
- Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M (1999) A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and dHPLC. *Hum Genet* 105:72-8
- Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci.* 20:399-427. Review.
- Gu W, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Duprat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer FX, Allison DB (1999) Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 48:635-9
- Gunn TM, Miller KA, He L, Hyman RW, Davis RW, Azarani A, Schlossman SF, Duke-Cohan JS, Barsh GS (1999) The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* 398:152-6
- Gutkind JS (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17(11 Reviews):1331-42. Review
- Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P (1998) A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 20:304-8
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1:271-2
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-6
- Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18:559-72
- Hakansson ML, Hulting AL, Meister B (1996) Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus-relationship with *NPY* neurones. *Neuroreport* 7:3087-92
- Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273:669-72. Review
- Hanada R, Nakazato M, Matsukura S, Murakami N, Yoshimatsu H, Sakata T (2000) Differential regulation of melanin-concentrating hormone and orexin genes in the agouti-related protein/melanocortin-4 receptor system. *Biochem Biophys Res Commun* 268:88-91
- Hanson RL, Ehm MG, Pettitt DJ, Prochazka M, Thompson DB, Timberlake D, Foroud T, Kobes S, Baier L, Burns DK, Almasy L, Blangero J, Garvey WT, Bennett PH, Knowler WC (1998) An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am J Hum Genet* 63:1130-8.

- Hawes BE, Kil E, Green B, O'Neill K, Fried S, Graziano MP (2000) The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 141:4524-32
- Hayashi K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1:34-8. Review
- Hebebrand J, Friedel S, Schäuble N, Geller F, Hinney A (2003) Perspectives: molecular genetic research in human obesity. *Obes Rev* 4:139-46. Review
- Hebebrand J, Hinney A, Oeffner F (2001) Molekulare Grundlagen der Adipositas. In: Ganten D/Ruckpaul K (Hrsg.) *Endokrinopathien*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; S. 387-425
- Hebebrand J, Wulfstange H, Goerg T, Ziegler A, Hinney A, Barth N, Mayer H, Remschmidt H (2000) Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating? *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:345-53.
- Hebebrand J, Hinney A, Roth H, Ziegler A (1998) Genetische Aspekte der Adipositas. In: Wechsler JG (Hrsg.) *Adipositas/Ursachen und Therapie*. Berlin-Wien: Ex Libris Roche-Blackwell; S. 105-117
- Hebebrand J and Remschmidt H (1995) Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Medizinische Klinik* 90:403-410
- Hebebrand J, Hesecker H, Himmelmann GW, Schäfer H, Remschmidt H (1994) Altersperzentilen für den Body Mass Index aus Daten der Nationalen Verzehrsstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren. *Aktuelle Ernährungsmed* 19:259-265
- Herpertz-Dahlmann B, Geller F, Bohle C, Khalil C, Trost-Brinkhues G, Ziegler A, Hebebrand J (2003) Secular trends in body mass index measurements in preschool children from the City of Aachen, Germany. *Eur J Pediatr* 162:104-9
- Hervieu G (2003) Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress. *Expert Opin Ther Targets* 7:495-511
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, Leslie RA (2000) The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 12:1194-216
- Hervieu G and Nahon JL (1995) Pro-melanin concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptides expression in peripheral tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 61:348-64
- Hetherington AW and Ranson SW (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 78:149-72
- Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK, Muir AI (2001) Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *J Biol Chem* 276:20125-9
- Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schafer H, Gudermann T, Hebebrand J (2003) Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4258-67

- Hinney A, Hebebrand J (2001) Neue Erkenntnisse zu genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation. In: Pädiat Prax 59; 373-9. Hans Marseille Verlag GmbH München
- Hinney A, Ziegler A, Oeffner F, Wedewardt C, Vogel M, Wulftange H, Geller F, Stubing K, Siegfried W, Goldschmidt HP, Remschmidt H, Hebebrand J (2000) Independent confirmation of a major locus for obesity on chromosome 10. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2962-5
- Hinney A, Schmidt A, Nottobom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J (1999) Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1483-6
- Hinney A, Lentes KU, Rosenkranz K, Barth N, Roth H, Ziegler A, Hennighausen K, Coners H, Wurmser H, Jacob K, Romer G, Winnikes U, Mayer H, Herzog W, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Blum WF, Pirke KM, Schafer H, Grzeschik KH, Remschmidt H, Hebebrand J (1997) Beta 3-adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight or anorexia nervosa. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:224-30
- Hirschhorn JN and Altshuler D (2002) Once and again-issues surrounding replication in genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4438-41. Review
- Hirschhorn JN, Lindgren CM, Daly MJ, Kirby A, Schaffner SF, Burt NP, Altshuler D, Parker A, Rioux JD, Platko J, Gaudet D, Hudson TJ, Groop LC, Lander ES (2001) Genomewide linkage analysis of stature in multiple populations reveals several regions with evidence of linkage to adult height. *Am J Hum Genet* 69:106-16
- Ho G and MacKenzie RG (1999) Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *J Biol Chem* 274:35816-22
- Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9:101-8
- Hoogduijn MJ, Ancans J, Suzuki I, Estdale S, Thody AJ (2002) Melanin-concentrating hormone and its receptor are expressed and functional in human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 296:698-701
- Hsueh WC, Mitchell BD, Schneider JL, St Jean PL, Pollin TI, Ehm MG, Wagner MJ, Burns DK, Sakul H, Bell CJ, Shuldiner AR (2001) Genome-wide scan of obesity in the Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1199-205
- Hung T, Mak K, Fong K (1990) A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 18:4953
- Hunt SC, Abkevich V, Hensel CH, Gutin A, Neff CD, Russell DL, Tran T, Hong X, Jammulapati S, Riley R, Weaver-Feldhaus J, Macalma T, Richards MM, Gress R, Francis M, Thomas A, Frech GC, Adams TD, Shattuck D, Stone S (2001) Linkage of body mass index to chromosome 20 in Utah pedigrees. *Hum Genet* 109:279-85
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-41
- Innis MA and Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Hrsg.) PCR-Protocols. San Diego: Academic Press, 1. Auflage; S. 3-20

- Inui A (1999) Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res* 59:4493-501. Review
- Ito M, Gomori A, Ishihara A, Oda Z, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Ito M, Sano H, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A (2003) Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E940-5
- Iwasaki N, Cox NJ, Wang YQ, Schwarz PE, Bell GI, Honda M, Imura M, Ogata M, Saito M, Kamatani N, Iwamoto Y (2003) Mapping genes influencing type 2 diabetes risk and BMI in Japanese subjects. *Diabetes* 52:209-13
- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 16:303-6
- Jacobson P, Ukkola O, Rankinen T, Snyder EE, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Lonn L, Cowan GS Jr, Sjostrom L, Bouchard C (2002) Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4442-6
- Jaeger U, Zellner K, Kromeyer-Hauschild K, Ludde R, Eisele R, Hebebrand J (2001) [Body height, body weight and body mass index of German military recruits. Historical retrospect and current status] *Anthropol Anz* 59:251-73
- Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc JL, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* 17:357-61
- Jequier E. (2002) Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 967:379-88. Review
- Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC (1999) Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 45:1133-40
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68-100. Review
- Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, Stubdal H, Theriault K, Siebert E, Chickering T, Morgenstern JP, Tartaglia LA, Lillie J (1999) Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signalling by insulin. *J Biol Chem* 274:24980-6
- Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67-70
- Kawano H, Honma S, Honma A, Horie M, Kawano Y, Hayashi S (2002) Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding. *Anat Sci Int* 77:149-60. Review
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI (1983) Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 305:321-3
- Kela J, Salmi P, Rimondini-Giorgini R, Heilig M, Wahlestedt C (2003) Behavioural analysis of melanin-concentrating hormone in rats: evidence for orexigenic and anxiolytic properties. *Regul Pept* 114:109-14

- Kennedy AR, Todd JF, Stanley SA, Abbott CR, Small CJ, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, *in vivo* and *in vitro*, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology* 142: 3265-8
- Killeen PR, Vanderburg D, Harlan WR (1978) Application of weight-height ratios and body indices to juvenile populations--the National Health Examination Survey Data. *J Chronic Dis* 31:529-37
- Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, Marks JA, Krakower GR, Jacob HJ, Weber J, Martin L, Blangero J, Comuzzie AG (2000) Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14478-83
- Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Moore KJ et al (1996) Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. *Cell* 85:281-90
- Knippers R (1997) *Molekulare Genetik*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 7., durchgesehene und korrigierte Auflage; S. 38
- Kobayashi H, Ogawa Y, Shintani M, Ebihara K, Shimodahira M, Iwakura T, Hino M, Ishihara T, Ikekubo K, Kurahachi H, Nakao K (2002) A Novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes* 51:243-6
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-60
- Kokkotou EG, Tritos NA, Mastaitis JW, Sliker L, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology* 142:680-6.
- Kokkotou E, Mastaitis JW, Qu D, Hoersch D, Sliker L, Bonter K, Tritos NA, Maratos-Flier E (2000) Characterization of [Phe(13), Tyr(19)]-MCH analog binding activity to the MCH receptor. *Neuropeptides* 34:240-7
- Kolakowski LF Jr, Jung BP, Nguyen T, Johnson MP, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1996) Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors. *FEBS Lett* 398:253-8
- Kozak M (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* 7:563-74. Review
- Kozak M (1997) Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 16:2482-92
- Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234:187-208. Review
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-6

- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel A, Jaeger U, Johnsen D, Korte W, Menner K, Müller G, Müller JM, Niemann-Pilatus A, Remer T, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Ziegler A, Hebebrand J (2001) Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 149:807-818
- Krude H and Grüters A (2000): Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 11:15-22. Review
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19:155-7
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58:1347-63
- Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C, Donlon TA (1999) Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene. *Am J Hum Genet* 64:70-6
- Kwitek-Black AE, Carmi R, Duyk GM, Buetow KH, Elbedour K, Parvari R, Yandava CN, Stone EM, Sheffield VC (1993) Linkage of Bardet-Biedl syndrome to chromosome 16q and evidence for non-allelic genetic heterogeneity. *Nat Genet* 5:392-6
- Lakaye B, Minet A, Zorzi W, Grisar T (1998) Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene. *Biochim Biophys Acta* 1401:216-20
- Lander ES and Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11:241-7
- Lander ES and Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-48. Review
- Lapsys NM, Furler SM, Moore KR, Nguyen TV, Herzog H, Howard G, Samaras K, Carey DG, Morrison NA, Eisman JA, Chisholm DJ (1997) Relationship of a novel polymorphic marker near the human *obese* (*OB*) gene to fat mass in healthy women. *Obes Res* 5:430-3
- Lee JH, Reed DR, Li WD, Xu W, Joo EJ, Kilker RL, Nanthakumar E, North M, Sakul H, Bell C, Price RA (1999) Genome scan for human obesity and linkage to markers in 20q13. *Am J Hum Genet* 64:196-209
- Lembertas AV, Perusse L, Chagnon YC, Fisler JS, Warden CH, Purcell-Huynh DA, Dionne FT, Gagnon J, Nadeau A, Lusia AJ, Bouchard C (1997) Identification of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *J Clin Invest* 100:1240-7
- Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St-Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P. (1999) The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol* 1:267-71
- Lindsay RS, Kobes S, Knowler WC, Bennett PH, Hanson RL (2001) Genome-wide linkage analysis assessing parent-of-origin effects in the inheritance of type 2 diabetes and BMI in Pima Indians. *Diabetes* 50:2850-7
- Liu WO, Oefner PJ, Qian C, Odom RS, Francke U (1997) Denaturing HPLC-identified novel FBN1 mutations, polymorphisms, and sequence variants in Marfan syndrome and related connective tissue disorders. *Genet Test* 1:237-42

- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107:379-86
- Ludwig DS, Mountjoy KG, Tatro JB, Gillette JA, Frederich RC, Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *Am J Physiol* 274:E627-33
- Macdonald D, Murgolo N, Zhang R, Durkin JP, Yao X, Strader CD, Graziano MP (2000) Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone/receptor complex: identification of critical residues involved in binding and activation. *Mol Pharmacol* 58: 217-25
- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ (1997) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27:325-51. Review
- Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3240-5
- Martin LJ, Mahaney MC, Almasy L, Hixson JE, Cole SA, MacCluer JW, Jaquish CE, Blangero J, Comuzzie AG (2002) A quantitative trait locus on chromosome 22 for serum leptin levels adjusted for serum testosterone. *Obes Res* 10:602-7
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387:113-6
- Ming JE, Blagowidow N, Knoll JH, Rollings L, Fortina P, McDonald-McGinn DM, Spinner NB, Zackai EH (2000) Submicroscopic deletion in cousins with Prader-Willi syndrome causes a grandmatrilineal inheritance pattern: effects of imprinting. *Am J Med Genet* 92:19-24
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV (1998) Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in *ob/ob* and *db/db* mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47:294-7
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903-8
- Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR (2001) Angiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides* 22:1043-7
- Monzon ME and De Barioglio SR (1999) Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol Behav* 67:813-7
- Mori M, Harada M, Terao Y, Sugo T, Watanabe T, Shimomura Y, Abe M, Shintani Y, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 283:1013-8

- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50
- Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH (1992) Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med* 327:1350-5
- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH (1995) Hyperproinsulinaemia in obese *fat/fat* mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* 10:135-42
- Nagle DL, McGrail SH, Vitale J, Woolf EA, Dussault BJ Jr, DiRocco L, Holmgren L, Montagno J, Bork P, Huszar D, Fairchild-Huntress V, Ge P, Keilty J, Ebeling C, Baldini L, Gilchrist J, Burn P, Carlson GA, Moore KJ (1999) The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* 398:148-52
- Nahon JL (1994) The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene. *Crit Rev Neurobiol* 8:221-62. Review.
- Nahon JL, Presse F, Bittencourt JC, Sawchenko PE, Vale W (1989) The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology* 125:2056-65
- Naito N, Kawazoe I, Nakai Y, Kawauchi H (1988) Melanin-concentrating hormone-like immunoreactive material in the rat hypothalamus; characterization and subcellular localization. *Cell Tissue Res* 253:291-5
- Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishina PM (1996) A candidate gene for the mouse mutation *tubby*. *Nature* 380:534-8
- Neel JV (1962) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14:353-62
- Neel JV (1999) The "thrifty genotype" in 1998. *Nutr Rev* 57:S2-9. Review
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296:1636-9. Review
- Norman RA, Tataranni PA, Pratley R, Thompson DB, Hanson RL, Prochazka M, Baier L, Ehm MG, Sakul H, Foroud T, Garvey WT, Burns D, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C, Ravussin E (1998) Autosomal genomic scan for loci linked to obesity and energy metabolism in Pima Indians. *Am J Hum Genet* 62:659-68
- Norman RA, Thompson DB, Foroud T, Garvey WT, Bennett PH, Bogardus C, Ravussin E (1997) Genomewide search for genes influencing percent body fat in Pima Indians: suggestive linkage at chromosome 11q21-q22. Pima Diabetes Gene Group. *Am J Hum Genet* 60:166-73
- Oefner PJ and Underhill PA (1998) Detection of nucleic acid heteroduplex molecules by denaturing high-performance liquid chromatography and methods for comparative sequencing. US Patent 5,795,976
- Öhman M, Oksanen L, Kaprio J, Koskenvuo M, Mustajoki P, Rissanen A, Salmi J, Kontula K, Peltonen L (2000) Genome-wide scan of obesity in Finnish sibpairs reveals linkage to chromosome Xq24. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3183-90
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD (1999) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 64:397-413
- Onions K, Hunt S, Rutkowski M et al. (1998) Genetic markers at the leptin (OB) locus are not significantly linked to hypertension in African Americans. *Hypertension* 31:1230-4

- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-70
- Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J (1999) 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. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3686-95
- Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16(20):9775-87
- Palmer LJ, Buxbaum SG, Larkin E, Patel SR, Elston RC, Tishler PV, Redline S (2003) A whole-genome scan for obstructive sleep apnea and obesity. *Am J Hum Genet* 72:340-50
- Passarge E (2001) *Color Atlas of Genetics*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, second edition, enlarged and revised
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science*. 269:540-3
- Perola M, Ohman M, Hiekkalinna T, Leppavuori J, Pajukanta P, Wessman M, Koskenvuo M, Palotie A, Lange K, Kaprio J, Peltonen L (2001) Quantitative-trait-locus analysis of body-mass index and of stature, by combined analysis of genome scans of five Finnish study groups. *Am J Hum Genet* 69:117-23
- Perusse L, Rice T, Chagnon YC, Despres JP, Lemieux S, Roy S, Lacaille M, Ho-Kim MA, Chagnon M, Province MA, Rao DC, Bouchard C (2001) A genome-wide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec Family Study. *Diabetes* 50:614-21
- Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K (2001) Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 27:121-4
- Pietiläinen KH, Kaprio J, Rasanen M, Winter T, Rissanen A, Rose RJ 2001 Tracking of body size from birth to late adolescence: contributions of birth length, birth weight, duration of gestation, parents' body size, and twinship. *Am J Epidemiol* 154:21-9
- Pissios P, Trombly DJ, Tzamelis I, Maratos-Flier E (2003) Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways. *Endocrinology* 144:3514-23
- Pratley RE, Thompson DB, Prochazka M, Baier L, Mott D, Ravussin E, Sakul H, Ehm MG, Burns DK, Foroud T, Garvey WT, Hanson RL, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C (1998) An autosomal genomic scan for loci linked to prediabetic phenotypes in Pima Indians. *J Clin Invest* 101:1757-64
- Presse F, Hervieu G, Imaki T, Sawchenko PE, Vale W, Nahon JL (1992) Rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid expression: marked changes during development and after stress and glucocorticoid stimuli. *Endocrinology* 131:1241-50
- Presse F, Nahon JL, Fischer WH, Vale W (1990) Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. *Mol Endocrinol* 4:632-7
- Price RA, Li WD, Bernstein A, Crystal A, Golding EM, Weisberg SJ, Zuckerman WA (2001) A locus affecting obesity in human chromosome region 10p12. *Diabetologia* 44:363-6

- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypok R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-7
- Rance TA and Baker BI (1979) The teleost melanin-concentrating hormone – a pituitary hormone of hypothalamic origin. *Gen Comp Endocrinol* 37:64-73
- Reed DR, Ding Y, Xu W, Cather C, Green ED, Price RA (1996) Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes* 45:691-4
- Reese MG and Eckman FH (1995) "Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition" Accepted talk for The seventh international Genome sequencing and analysis conference, Hyatt Regency, Hilton Head Island, South Carolina September 16-20, 1995
- Risch N and Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-7
- Risch N and Zhang H (1995) Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 268:1584-9
- Robinson WP, Bottani A, Xie YG, Balakrishnan J, Binkert F, Machler M, Prader A, Schinzel A (1991) Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet* 49:1219-34
- Rodriguez M, Beauverger P, Naime I, Rique H, Ouvry C, Souchaud S, Dromaint S, Nagel N, Suply T, Audinot V, Boutin JA, Galizzi JP (2001) Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. *Mol Pharmacol* 60:632-9
- Rossi M, Beak SA, Choi SJ, Small CJ, Morgan DG, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR (1999) Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake--action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Res* 846:164-70
- Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR (1997) Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology* 138:351-5
- Roth H, Hinney A, Ziegler A, Barth N, Gerber G, Stein K, Bromel T, Mayer H, Siegfried W, Schafer H, Remschmidt H, Grzeschik KH, Hebebrand J (1997) Further support for linkage of extreme obesity to the *obese* gene in a study group of obese children and adolescents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105:341-4
- Rotimi CN, Comuzzie AG, Lowe WL, Luke A, Blangero J, Cooper RS (1999) The quantitative trait locus on chromosome 2 for serum leptin levels is confirmed in African-Americans. *Diabetes* 48:643-4
- Saar K, Geller F, Ruschendorf F, Reis A, Friedel S, Schauble N, Nurnberg P, Siegfried W, Goldschmidt HP, Schafer H, Ziegler A, Remschmidt H, Hinney A, Hebebrand J (2003) Genome scan for childhood and adolescent obesity in German families. *Pediatrics* 111: 321-7
- Sachs L (1974) *Angewandte Statistik: Planung und Auswertung; Methoden und Modelle*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 4.Auflage
- Sahu A (1998) Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology* 139:4739-42
- Sailer AW, Sano H, Zeng Z, McDonald TP, Pan J, Pong SS, Feighner SD, Tan CP, Fukami T, Iwaasa H, Hreniuk DL, Morin NR, Sadowski SJ, Ito M, Ito M, Bansal A, Ky B, Figueroa DJ, Jiang Q, Austin CP, MacNeil DJ, Ishihara A, Ihara M, Kanatani A, Van der Ploeg LH,

- Howard AD, Liu Q (2001) Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7564-9
- Saito Y, Tetsuka M, Yue L, Kawamura Y, Maruyama K (2003) Functional role of N-linked glycosylation on the rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *FEBS Lett* 533:29-34
- Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001) Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:26-40
- Saito Y, Nothacker HP, Civelli O (2000) Melanin-concentrating hormone receptor: an orphan receptor fits the key. *Trends Endocrinol Metab* 11:299-303. Review
- Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O (1999) Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 400:265-9
- Salomon Y, Landos C, Rodbell M (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* 58:541-8
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-8
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199-211. Review
- Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS (1990) Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* 18:7465
- Sawchenko PE (1998) Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in *J Comp Neurol* 402:435-41. Review
- Schaid DJ (1998) Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations. *Am J Hum Genet* 63:935-41
- Schaid DJ and Sommer SS (1994) Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *Am J Hum Genet* 55:402-9
- Schaid DJ and Sommer SS (1993) Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet* 53:1114-26
- Scheinert P, Schalk HJ, Kroll C (1997) Optimierung der PCR-Amplifikation komplexer Mischungen durch spezifitätssteigernde Additive und Temperaturgradienten-PCR. *Biotech* 5: 54-55
- Schöneberg T, Sandig V, Wess J, Gudermann T, Schultz G (1997) Reconstitution of mutant V2 vasopressin receptors by adenovirus-mediated gene transfer. Molecular basis and clinical implication. *J Clin Invest* 100:1547-56
- Schwartz MW and Gelling RW (2002) Rats lighten up with MCH antagonist. *Nat Med* 8: 779-81
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-71. Review
- Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH (1999) Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol* 277:R1144-51.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46:2119-23
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996a) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98:1101-6

- Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D Jr, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS (1996b) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* mice. *Diabetes* 45:531-5
- Segal DG and Sanchez JC (2001) Childhood obesity in the year 2001. *Endocrinologist* 11:296-306. Review
- Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X, Bates S, Myers MG Jr, Flier JS, Maratos-Flier E (2003) Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10085-90
- Sekiya K, Ghatei MA, Lacoumenta S, Burnet PW, Zamir N, Burrin JM, Polak JM, Bloom SR (1988) The distribution of melanin-concentrating hormone-like immunoreactivity in the central nervous system of rat, guinea-pig, pig and man *Neuroscience* 25:925-30
- Shearman LP, Camacho RE, Sloan Stribling D, Zhou D, Bednarek MA, Hreniuk DL, Feighner SD, Tan CP, Howard AD, Van der Ploeg LH, MacIntyre DE, Hickey GJ, Strack AM (2003) Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *Eur J Pharmacol* 475:37-47
- Sheffield VC, Carmi R, Kwitek-Black A, Rokhlina T, Nishimura D, Duyk GM, Elbedour K, Sunden SL, Stone EM (1994) Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 3:1331-5
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16(2):325-32
- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396:670-4
- Shimomura Y, Mori M, Sugo T, Ishibashi Y, Abe M, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Sumino Y, Fujino M (1999) Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 261:622-6
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-8. Review
- Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J (1999) Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am J Hum Genet* 65:1501-7
- Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N (1985) Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull* 15:635-49
- Slavotinek AM, Stone EM, Mykytyn K, Heckenlively JR, Green JS, Heon E, Musarella MA, Parfrey PS, Sheffield VC, Biesecker LG (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:15-6
- Sonne-Holm S, Sørensen TIA, Jensen G, Schnohr P (1989) Independent effects of weight change and attained body weight on prevalence of arterial hypertension in obese and non-obese men. *Br Med J* 299:767-770
- Sørensen TIA, Sonne-Holm S (1988) Risk in childhood of development of severe adult obesity: retrospective, population-based case-cohort study. *Am J Epidemiology* 127:104-113

- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390: 521-5
- Spiegelman BM and Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-43. Review
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52:506-16
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the *obese* gene product. *Nature* 377:530-2
- Stone S, Abkevich V, Hunt SC, Gutin A, Russell DL, Neff CD, Riley R, Frech GC, Hensel CH, Jammulapati S, Potter J, Sexton D, Tran T, Gibbs D, Iliev D, Gress R, Bloomquist B, Amatruda J, Rae PM, Adams TD, Skolnick MH, Shattuck D (2002) A major predisposition locus for severe obesity, at 4p15-p14. *Am J Hum Genet* 70:1459-68
- Strachan T and Read AP (1999) *Human Molecular Genetics 2*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, second edition; reprinted 2000
- Strauss RS (1999) Comparison of measured and self-reported weight and height in a cross-sectional sample of young adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:904-8
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18:213-5
- Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE (1990) The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322:1483-7
- Stunkard AJ, Sorensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F (1986) An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 314:193-8
- Suply T, Della Zuana O, Audinot V, Rodriguez M, Beauverger P, Duhault J, Canet E, Galizzi JP, Nahon JL, Levens N, Boutin JA (2001) SLC-1 receptor mediates effect of melanin-concentrating hormone on feeding behavior in rat: a structure-activity study. *J Pharmacol Exp Ther* 299:137-46
- Suviolahti E, Oksanen LJ, Ohman M, Cantor RM, Ridderstrale M, Tuomi T, Kaprio J, Rissanen A, Mustajoki P, Jousilahti P, Vartiainen E, Silander K, Kilpikari R, Salomaa V, Groop L, Kontula K, Peltonen L, Pajukanta P (2003) The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J Clin Invest* 112: 1762-72
- SYNAPTIC PHARM CORP (Marzabadi MR, Wetzell J, DeLeon JE, Jiang Y; 2003): Substituted anilinic piperidines as MCH selectic antagonists. WO-03004027 (*Patent Literatur*)
- Tadayyon M, Welters HJ, Haynes AC, Cluderay JE, Hervieu G (2000) Expression of melanin-concentrating hormone receptors in insulin-producing cells: MCH stimulates insulin release in RINm5F and CRI-G1 cell-lines. *Biochem Biophys Res Commun* 275:709-12
- Takekawa S, Asami A, Ishihara Y, Terauchi J, Kato K, Shimomura Y, Mori M, Murakoshi H, Kato K, Suzuki N, Nishimura O, Fujino M (2002) T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 438:129-35
- Tan CP, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, Feighner SD, Palyha OC, Pong SS, Figueroa DJ, Austin CP, Jiang MM, Yu H, Ito J, Ito M, Guan XM, MacNeil DJ, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD (2002) Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics* 79:785-92

- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6. Review
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-71
- Taylor P., Munson K., Gjerde D Detection of Mutations and Polymorphisms on the Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System. Transgenomic, Inc. 1998, 2000; Application Note 101
- Terwilliger JD and Ott J (1992) A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum Hered* 42:337-46
- Thompson RC and Watson SJ (1990) Nucleotide sequence and tissue-specific expression of the rat melanin concentrating hormone gene. *DNA Cell Biol* 9:637-45
- Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. *Endocrinology* 138:5063-6
- Toumaniantz G, Ferreira PC, Allaey I, Bittencourt JC, Nahon JL (2000) Differential neuronal expression and projections of melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH-gene-overprinted-polypeptide (MGOP) in the rat brain. *Eur J Neurosci* 12:4367-80
- Toumaniantz G, Bittencourt JC, Nahon JL (1996) The rat melanin-concentrating hormone gene encodes an additional putative protein in a different reading frame. *Endocrinology* 137(10):4518-21
- Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, Maratos-Flier E (2001) Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. *Brain Res* 895:160-6
- Tritos NA, Vicent D, Gillette J, Ludwig DS, Flier ES, Maratos-Flier E (1998) Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes* 47:1687-92
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-13
- Turleau C, Demay G, Cabanis MO, Lenoir G, de Grouchy J (1988) 6q1 monosomy: a distinctive syndrome. *Clin Genet* 34:38-42
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Herberg S, Guy-Grand B, Froguel P (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106:253-62
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20:113-4
- van der Kallen CJ, Cantor RM, van Greevenbroek MM, Geurts JM, Bouwman FG, Aouizerat BE, Allayee H, Buurman WA, Lusi AJ, Rotter JI, de Bruin TW (2000) Genome scan for adiposity in Dutch dyslipidemic families reveals novel quantitative trait loci for leptin, body mass index and soluble tumor necrosis factor receptor superfamily 1A. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1381-91
- Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W (1989) Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 125:1660-5
- Viale A, Ortola C, Hervieu G, Furuta M, Barbero P, Steiner DF, Seidah NG, Nahon JL (1999) Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals. *J Biol Chem* 274:6536-45

- Viale A, Zhixing Y, Breton C, Pedetour F, Coquerel A, Jordan D, Nahon JL (1997) The melanin-concentrating hormone gene in human: flanking region analysis, fine chromosome mapping, and tissue-specific expression. *Brain Res Mol Brain Res* 46:243-55
- Villa A, Urioste M, Bofarull JM, Martinez-Frias ML (1995) De novo interstitial deletion q16.2q21 on chromosome 6. *Am J Med Genet* 55:379-83. Review
- Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moeller P, Heinze E, Debatin K-M, Hauner H (2001) Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:8-15
- Waibel AH, Hanazawa T, Hinton GE, Shikano K, Lang KJ (1989) "Phoneme Recognition Using Time-Delay Neural Networks" *IEEE Transactions on Acoustic, Speech, and Signal Processing* Vol. 37 no.3, 328-339
- Wang S, Behan J, O'Neill K, Weig B, Fried S, Laz T, Bayne M, Gustafson E, Hawes BE (2001) Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2. *J Biol Chem* 276:34664-70
- Watanabe RM, Ghosh S, Langefeld CD, Valle TT, Hauser ER, Magnuson VL, Mohlke KL, Silander K, Ally DS, Chines P, Blaschak-Harvan J, Douglas JA, Duren WL, Epstein MP, Fingerlin TE, Kaleta HS, Lange EM, Li C, McEachin RC, Stringham HM, Trager E, White PP, Balow Jr J, Birznieks G, Chang J, Eldridge W (2000) The Finland-United States investigation of non-insulin-dependent diabetes mellitus genetics (FUSION) study. II. An autosomal genome scan for diabetes-related quantitative-trait loci. *Am J Hum Genet* 67:1186-200
- Watson PE, Watson ID, Ratt RD (1979) Obesity indices. *Am J Clin Nutr* 32:736-737
- Weeks DE and Lathrop GM (1995) Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet* 11:513-9. Review
- Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL (1995) Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. *J Clin Invest* 96:2065-70
- Weyer C, Wolford JK, Hanson RL, Foley JE, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE (2001) Subcutaneous abdominal adipocyte size, a predictor of type 2 diabetes, is linked to chromosome 1q21--q23 and is associated with a common polymorphism in LMNA in Pima Indians. *Mol Genet Metab* 72:231-8
- Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH (1997) Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 337:869-73
- Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE (2003) Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J Neurosci* 23:2882-8
- Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS (1995) Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 4:223-30
- Wirth J, Back E, Huttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K (2001) A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* 10:201-10.
- Wittau N, Grosse R, Kalkbrenner F, Gohla A, Schultz G, Gudermann T (2000) The galanin receptor type 2 initiates multiple signaling pathways in small cell lung cancer cells by coupling to G(q), G(i) and G(12) proteins. *Oncogene* 19:4199-4209
- World Health Organization (1998) Obesity. Preventing and managing the global epidemic. WHO, Geneva

- Wu X, Cooper RS, Borecki I, Hanis C, Bray M, Lewis CE, Zhu X, Kan D, Luke A, Curb D (2002) combined analysis of genomewide linkage scans for body mass index from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Blood Pressure Program. *Am J Hum Genet* 70:1247-56
- Xiao W and Oefner PJ (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 17:439-74. Review
- Xie X, Ott J (1993) Testing linkage disequilibrium between a disease gene and marker loci. *Am J Hum Genet* 53:1107 (Abstract)
- Yanovski JA (2001) Pediatric obesity. *Rev Endocr Metab Disord* 2:371-83. Review
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29:E88-88
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20:111-2
- Young TL, Penney L, Woods MO, Parfrey PS, Green JS, Hefferton D, Davidson WS (1999) A fifth locus for Bardet-Biedl syndrome maps to chromosome 2q31. *Am J Hum Genet* 64:900-4
- Zamir N, Skofitsch G, Jacobowitz DM (1986) Distribution of immunoreactive melanin-concentrating hormone in the central nervous system of the rat. *Brain Res* 373:240-5
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32
- Zhu X, Cooper RS, Luke A, Chen G, Wu X, Kan D, Chakravarti A, Weder A (2002) A genome-wide scan for obesity in African-Americans. *Diabetes* 51:541-4



```

101881 ccattgtgcac cctcatcacg gccatggatg ccaatagtca gttcaccagc acctacatcc
184 M C T L I T A M D A N S Q F T S T Y I L
R210H a t 101966 C>T
101941 tgaccgccat ggccattgac cgctactctgg ccaactgtcca ccccatctct tccacgaagt
204 T A M A I D R Y L A T V H P I S S T K F
102001 tccggaagcc ctctgtggcc accctggatg tctgcctcct gtgggcccctc tccttcatca
224 R K P S V A T L V I C L L W A L S F I S
102061 gcatcaccac tgtgtggctg tatgccagac tcatcccctt cccaggaggt gcagtgggct
244 I T P V W L Y A R L I P F P G G A V G C
102121 gcggcatcacg cctgcccac ccagacactg acctctactg gttcaccctg taccagtttt
264 G I R L P N P D T D L Y W F T L Y Q F F
t 102218 C>T
102181 tcttggcctt tgccctgcct tttgtgttca tcacagccgc atacgtgagg atcctgcagc
284 L A F A L P F V V I T A A Y V R I L Q R
t T305M a R317Q
102241 gcatgacgtc ctacagtggcc cccgcctccc agcgcagcat cccgctgagg acaaagaggg
304 M T S S V A P A S Q R S I R L R T K R V
102301 tgaccgcac agccatcgcc atctgtctgg tcttctttgt gtgctggcca ccctactatg
324 T R T A I A I C L V F F V C W A P Y Y V
102361 tgctacagct gaccagttg tccatcagcc gcccgaccct cacctttgtc tacttataca
344 L Q L T Q L S I S R P T L T F V Y L Y N
t P377S
102421 atgcgcccat cagcttgggc tatgccaca gctgcctcaa cccctttgtg tacatcgtgc
364 A A I S L G Y A N S C L N P F V Y I V L
a 102491 G>A a 102515G>A
102481 tctgtgagac gttccgcaaa cgcttggctc tgtcggtgaa gcctgcagcc caggggcagc
384 C E T F R K R L V L S V K P A A Q G Q L
t T411M
102541 ttgcgctgt cagcaacgct cagacggctg acgaggagag gacagaaagc aaaggcacct
404 R A V S N A Q T A D E E R T E S K G T S T
102601 gatacttccc ctgccaccct gcacacctcc aagtcagggc accacaacac gccaccggga
OP
102661 gagatgctga gaaaaaccca agaccgctcg ggaatgcag gaaggccggg ttgtgagggg
102721 ttgttgcaat gaaataaata cattccatgg ggctcacacg ttgctgggga ggcctggagt
102781 caggtttggg gttttcagat atcagaaatc cccttggggg agcaggatga gacctttgga
102841 tagaacagaa gctgagcaag agaacatgtt ggtttggata accggttgca ctatatctgt
102901 gagctctcaa atgtcttctt cccaaggcaa gaggtggaag ggtactgact gggtttgttt
102961 aaagtcaggc agggctggag tgagcagcca gggccatggt gcacaaggcc tgagagacgg
103021 gaaagggccc gatcgctctt tcccgcctct cactgggtgag atggaaggtg gcctttctcc
103081 caagctggtg gataatgaaa aataaagcat cccatctctc ggcgttccag catcctgtca
c rs133074
103141 atctcccttt tgctctagag gatgcatggt tatttgaggg gatgtggcac tgagcccaca
SNP 001745620 a
103201 ggagtaaaag cccagtttgc taggaggtct gcttactgaa aacaaggaga cctgggggtgg
103261 gtgtggttgg gggctttaa actaataaaa gctgggggtcg ggggctttt gcagctctgg
t rs3087592
103321 tgacattctc tccacggggc acatttgcct agtactaat ccagcttgag tgtccgtgtg
103381 ttctgcatgt gcaggggtca ttctagtgcc cgggtgtgtt gcateatctt tttgctctag
103441 cccttctct caaaataaaa atcaataaaa ggaaaatctc caccacatc actctggatg

```

nt: Nukleotide  
AS: Aminosäuren  
xx: Exon 1 und Exon 2  
fett: Promotervorhersage durch FirstEF (<http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF>)  
: SNPs  
: seltene Varianten  
: Transmembrandomänen

**PCR für Mutationsscreening des Exon1 des *MCHR1*****(Fragment 1: Met<sup>1</sup> bis Met<sup>70</sup>)**

Primer forward MCHR-1 long-f AGC CTG GGA CTG AAG AAG TT  
Primer reverse MCHR-1 long-r GCT CAG CTC GGT TGT GG  
Produkt-Größe: 241 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 65 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C  
Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	3,0 µl	(3 mM)
Primer f	0,4 µl	(10,0 pmol)
Primer r	0,4 µl	(10,0 pmol)
dNTP	0,4 µl	(0,4 mM)
<i>Taq</i> (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	15,6 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**PCR für Mutationsscreening des Exon 1 des MCHR1****(Fragment 2: ab Met70)**

Primer forward MCHR-1-f GCT CAG CTC GGT TGT GG  
Primer reverse MCHR-1-r GCA GTT TGG CTC AGG GG  
Produkt-Größe: 199 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 63 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C  
Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	2,0 µl	(2 mM)
Primer f	0,2 µl	(5,0 pmol)
Primer r	0,2 µl	(5,0 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
Taq (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	17,15 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**PCR für Mutationsscreening des Exon 2 des *MCHR1*****(Fragment 2a)**

Primer forward	MCHR-2a-f	GCC CAT GTC AAA CAG CCA AC
Primer reverse	MCHR-2a-r	AGG GTG AAC CAG TAG AGG TC
Produkt-Größe:	588 bp	

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	30 sec	62 °C
Elongation	30 sec	72 °C
Elongation	5 min	72 °C
Abkühlen		4 °C
Anzahl der Zyklen:	30	

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (MWG)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (MWG)	1,5 µl	(1,5 mM)
Primer f	0,25 µl	(6,25 pmol)
Primer r	0,25 µl	(6,25 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
<i>Taq</i> (MWG)	0,5 µl	(2,5 U)
Aqua bidest	17,25 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**PCR für Mutationsscreening des Exon 2 des *MCHR1*****(Fragment 2b)**

Primer forward	MCHR-2b-f	TGC CAG ACT CAT CCC CT
Primer reverse	MCHR-2b-r	TTG GAG GTG TGC AGG GT
Produkt-Größe:	550 bp	

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	30 sec	60 °C
Elongation	30 sec	72 °C
Elongation	5 min	72 °C
Abkühlen		4 °C
Anzahl der Zyklen:	30	

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	1,5 µl	(1,5 mM)
Primer f	0,4 µl	(10 pmol)
Primer r	0,35 µl	(8,75 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
<i>Taq</i> (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	17,3 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**PCR für Mutationsscreening der ersten 317 bp der 5' Region des *MCHR1***

Primer forward MCHR-Prom-f AGC CTT TGA TTC CCA AGC TA  
Primer reverse MCHR-Prom-r TCC CAC AAC CGA GCT GAG  
Produkt-Größe: 560 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 58 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C  
Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	1,5 µl	(1,5 mM)
Primer f	0,25 µl	(6,25 pmol)
Primer r	0,25 µl	(6,25 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
<i>Taq</i> (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	17,55 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**PCR für Mutationsscreening des Introns des MCHR1**

Primer forward	MCHR-I1a-f	TGT GGG TGG AAA ATG GGA AG
Primer reverse	MCHR-I1a-r	CCT CTC CCA GGT GGC AGT AA
Produkt-Größe:	400 bp	
Primer forward	MCHR-I1b-f	CCC TGG GAA GGG AAG ACT
Primer reverse	MCHR-I1b-r	CTT TTC CTA TGT GTA GCC CTG A
Produkt-Größe:	401 bp	
Primer forward	MCHR-I1c-f	CTT ACT TTT GTG TCC TTC TGG CTA
Primer reverse	MCHR-I1c-r	GCT GTT TGA CAT GGG CTT TG
Produkt-Größe:	322 bp	

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	30 sec	64 °C
Elongation	30 sec	72 °C
Elongation	5 min	72 °C
Abkühlen		4 °C
Anzahl der Zyklen:	30	

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	3,0 µl	(3,0 mM)
Primer f	0,25 µl	(6,25 pmol)
Primer r	0,25 µl	(6,25 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
Taq (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	16,05 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133050 (G/A)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs133050-f AGG GGA GAG AGC AAC AAG GT

Primer reverse SNP rs133050-r TGG ATA GAG CAG CAC CCT CT

Produkt-Größe: 404 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 30 sec 60 °C

Elongation 30 sec 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
10x Puffer (Perkin Elmer)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (Perkin Elmer)	1,5 µl	(1,5 mM)
Primer f	0,25 µl	(6,25 pmol)
Primer r	0,25 µl	(6,25 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
Taq (Perkin Elmer)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	17,55 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym <i>Xmn</i> I (20 U/µl)	0,05 µl (1 U)
Puffer NEB 2	2,0 µl (1 x)
BSA:	0,2 µl
Aqua bidest:	1,75 µl
PCR:	16 µl PCR

Wasserbad 37 °C; 1 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen

A-Allel: 161 bp, 243 bp

G-Allel: 404 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133051 (T/C)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs133051-f TTT CCT CTG GGG AAC TGT CA  
Primer reverse SNP rs133051-r CTG GTG GGA GTG CCT TTT AG  
Produkt-Größe: 297 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 61 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C  
Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
10x Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 2,5 µl (2,5 mM)  
Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
*Taq* (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 16,55 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Bse*DI (5 U/µl) 0,3 µl (1,5 U)  
Puffer Y<sup>+</sup> Tango 3,0 µl (1 x)  
Aqua bidest: 11,7 µl  
PCR: 15 µl PCR

Wasserbad 55 °C; 2 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

T-Allel: 297 bp

C-Allel: 94 bp, 203 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133062 (G/A)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs133062-f ACT TCA CCC ATG AGG ACC AG

Primer reverse SNP rs133062-r TGC ATC ATC TAG CAC CCT CA

Produkt-Größe: 393 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 30 sec 61 °C

Elongation 30 sec 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 33

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)

Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)

MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 1,5 µl (1,5 mM)

Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)

Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)

dNTP 0,25 µl (0,25 mM)

Taq (SIGMA) 0,2 µl (1 U)

Aqua bidest 17,55 µl

Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Cfr*13I (10 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)

Puffer Y<sup>+</sup>Tango 3,00 µl (1 x)

Aqua bidest: 11,7 µl

PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 1 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

A-Allel: 393 bp

G-Allel: 138 bp, 255 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs2032512 (C/A)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs2032512-f GCC AGA AGT GGA TCT TGA GG

Primer reverse SNP rs2032512-r CCA CAC CTG GCC TAC TCA TT

Produkt-Größe: 377 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 30 sec 62 °C

Elongation 30 sec 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)

Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)

MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 3,0 µl (3,0 mM)

Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)

Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)

dNTP 0,25 µl (0,25 mM)

Taq (SIGMA) 0,2 µl (1 U)

Aqua bidest 16,05 µl

Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym BamHI (10 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)

Puffer BamHI<sup>+</sup> 3,00 µl (1 x)

Aqua bidest: 11,7 µl

PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 1,5 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 120bp, 257 bp

A-Allel: 377 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133063 (T/C)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs133063-f ATG AGT AGG CCA GGT GTG GT

Primer reverse SNP rs133063-r GGA CTG GCT CCA GCT ACA TC

Produkt-Größe: 384 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 30 sec 63 °C

Elongation 30 sec 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	1,0 µl	(1,0 mM)
Primer f	0,25 µl	(6,25 pmol)
Primer r	0,4 µl	(10 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
Taq (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	17,9 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**RFLP:**Verdau-Mix:Enzym *Hpa*CH4 (5 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)

Puffer NEB4 3,00 µl (1 x)

Aqua bidest: 11,7 µl

PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 17 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

T-Allel: 55 bp, 329 bp

C-Allel: 384 bp

## Genotypisierungsprotokoll SNP 1745616 (A/G)

### Methode: PCR-RFLP:

Primer forward SNP 1745616-f ACC TGG CCA GCT ACA CAC TT  
Primer reverse SNP 1745616-r AGG GGA AGC TTT TTG CAG TA  
Produkt-Größe: 190 bp

### PCR:

#### Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 58 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

#### Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 1,5 µl (0,6 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 2,0 µl (2 mM)  
Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer R 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
Taq (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 17,55 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

### RFLP:

#### Verdau-Mix:

Enzym *Bgl*II (10 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)  
Puffer O<sup>+</sup> 300 µl (1 x)  
Aqua bidest: 11,7 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 2 h

#### Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

A-Allel: 31, 159 bp

G-Allel: 31bp, 45 bp, 114 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP 1745617 (C/T)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP 1745617-f AGA ATC TGC CCT TCC TGC TC  
Primer reverse SNP 1745617-r CTG AAG GAA GTG AGG AAG CA  
Produkt-Größe: 498 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 61 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 35

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 3,5 µl (3,5 mM)  
Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
Taq (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 15,55 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym PfiFI (10 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)  
Puffer NEB4 3,00 µl (1 x)  
BSA: 0,35 µl  
Aqua bidest: 11,35 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 17 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 183 bp, 315 bp

T-Allel: 498 bp

## Genotypisierungsprotokoll SNP 1745618 (T/C)

### Methode: PCR-RFLP:

Primer forward SNP 1745618-f CTC CTG AGC TCA AGC AAT CC  
Primer reverse SNP 1745618-r GTG GGG GAT AAA GTC CCT GT  
Produkt-Größe: 415 bp

### PCR:

#### Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 61 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

#### Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 1,0 µl (1 mM)  
Primer F 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer R 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
*Taq* (SIGMA) 0,1 µl (0,5 U)  
Aqua bidest 18,15 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

### RFLP:

#### Verdau-Mix:

Enzym *Bsr*I (10 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)  
Puffer NEB3 3,00 µl (1 x)  
Aqua bidest: 11,7 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 65 °C; 2 h

#### Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

T-Allel: 415 bp

C-Allel: 135 bp, 280 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133068 (C/G)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP 133068-f CCT CCA CCT CTG CTG GTA TT  
Primer reverse SNP 133068-r GTG GGG GAT AAA GTC CCT GT  
Produkt-Größe: 150 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 64 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 1,5 µl (1,5 mM)  
Primer F 0,3 µl (7,5 pmol)  
Primer R 0,3 µl (7,5 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
*Taq* (SIGMA) 0,3 µl (1,5 U)  
Aqua bidest 17,35 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *FauI* (2 U/µl) 0,30 µl (0,6 U)  
Puffer SEB 3,00 µl (1 x)  
Aqua bidest 11,7 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 55 °C; 1 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 150 bp

G-Allel: 94 bp, 106 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133069 (C/A)****Methode: PCR-RFLP:**

innerer Primer f (A-Allel) GGA CTT TAT CCC CCA CCC CAC CCT CA  
 innerer Primer r (C-Allel) TTT TGC AGT AAA AAA AAA AGA AAA AAA GGG  
 äußerer Primer f GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGC CAA TAC CAT GAA  
 TTG TCT TTT GAG GGG T  
 äußerer Primer r TTG GGT TCA TCC AAC AAA CAT TCA TTG A  
 Produkt-Größe: 115 bp (A-Allel); 147 bp (C-Allel); 206 bp (zwei äußere Primer)

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
 Denaturierung 30 sec 94 °C  
 Annealing 30 sec 60 °C  
 Elongation 30 sec 72 °C  
 Elongation 5 min 72 °C  
 Abkühlen 4 °C  
 Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix (A-Allel):

DNA	2,5 µl (50 ng)
Puffer (Perkin Elmer)	2,5 µl (1 x)
MgCl <sub>2</sub> (Perkin Elmer)	3,0 µl (3 mM)
Primer f innerer pmol)	0,25 µl (6,25
Primer r äußerer pmol)	0,25 µl (6,25
dNTP	0,25 µl (0,25 mM)
Taq (Perkin Elmer)	0,25 µl (1,3 U)
Aqua bidest	16,0 µl
Gesamt-Volumen	25,0 µl

Reaktions-Mix (C-Allel):

DNA	2,5 µl (50 ng)
Puffer (Perkin Elmer)	2,5 µl (1 x)
MgCl <sub>2</sub> (Perkin Elmer)	3,0 µl (3 mM)
Primer f äußerer pmol)	0,25 µl (6,25
Primer r innerer pmol)	0,25 µl (6,25
dNTP	0,25 µl (0,25 mM)
Taq (Perkin Elmer)	0,3 µl (1,5 U)
Aqua bidest	15,95 µl
Gesamt-Volumen	25,0 µl

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Normalerweise werden alle 4 Primer in einem Ansatz verwendet. Bei diesen Primern wurde jedoch ein Allel im Gesamtansatz unterdrückt, weshalb 2 getrennte PCR-Ansätze pipettiert wurden und nach der Amplifikation getrennt aufgetragen wurden.

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133072 (G/A; Asp-32-Asn)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP 133072-f GCA GGC ATT CAG AAG TGG A  
Primer reverse SNP 133072-r AGG TCC ATC CAG CCA GTG  
Produkt-Größe: 302 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 59 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 1,5 µl (1,5 mM)  
Primer f 0,3 µl (7,5 pmol)  
Primer r 0,6 µl (15 pmol)  
dNTP 0,5 µl (0,5 mM)  
Taq (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 16,90 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Hpy*188III (5 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)  
Puffer NEB4 3,0 µl (1 x)  
BSA 0,35 µl  
Aqua bidest : 11,35 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 2 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

A-Allel: 302 bp

G-Allel: 178 bp, 124 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133073 (T/C)****Methode: PCR-RFLP:**

innerer Primer f (T-Allel) CTG CTG CCC ACT GGT CCC CAT

innerer Primer r (C-Allel) GCC ATC AGA GGT GTT GCT GTC G

äußerer Primer f GAA GGG AGT GGG GAG GGC AGT T

äußerer Primer r GCC CCT CAG AGC AAA GCA GAC C

Produkt-Größe: 202 bp (T-Allel); 247 bp (C-Allel); 406 bp (zwei äußere Primer)

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 1 min 65 °C

Elongation 1 min 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)

Puffer (Perkin Elmer) 2,5 µl (1 x)

MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer) 2,5 µl (2,5 mM)

Primer f innerer 0,25 µl (6,25 pmol)

Primer r innerer 0,25 µl (6,25 pmol)

Primer f äußerer 0,1 µl (2,5 pmol)

Primer r äußerer 0,1 µl (2,5 pmol)

dNTP 0,25 µl (0,25 mM)

Taq (Perkin Elmer) 0,2 µl (1 U)

Aqua bidest 16,35 µl

Gesamt-Volumen 25,00 µl

**Genotypisierungsprotokoll SNP 1745619 (T/G)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP 1745619-f CTT ACT TTT GTG TCC TTC TGG CTA  
Primer reverse SNP 1745619-r GAG CCA TCT GTC TTG GAA GG  
Produkt-Größe: 146 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 65 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 3,0 µl (3 mM)  
Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
*Taq* (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 16,05 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Tf*I (10 U/µl) 0,6 µl (1,5 U)  
Puffer NEB3 3,00 µl (1 x)  
Aqua bidest: 11,4 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 65 °C; 17 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

T-Allel: 146 bp

G-Allel: 65 bp, 81 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133074 (C/T)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP 133074-f TCC CAA GCT GGT GGA TAA TG  
Primer reverse SNP 133074-r ACC CCA GGT CTC CTT GTT TT  
Produkt-Größe: 181 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 62 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 1,5 µl (1,5 mM)  
Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
*Taq* (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 17,55 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Tsp509I* (5 U/µl) 0,30 µl (1,5 U)  
Puffer NEB1 3,00 µl (1 x)  
Aqua bidest 11,7 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 65 °C; 1 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 181 bp

T-Allel: 62 bp, 119 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs3087592 (C/T)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs3087592-f AGC CCA GTT TGC TAG GAG GT

Primer reverse SNP rs3087592-r ACA CAC GGA CAC TCA AGC TG

Produkt-Größe: 173 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 30 sec 61 °C

Elongation 30 sec 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA	2,5 µl	(50 ng)
Puffer (SIGMA)	2,5 µl	(1 x)
MgCl <sub>2</sub> (SIGMA)	2,0 µl	(2 mM)
Primer f	0,25 µl	(6,25 pmol)
Primer r	0,25 µl	(6,25 pmol)
dNTP	0,25 µl	(0,25 mM)
Taq (SIGMA)	0,2 µl	(1 U)
Aqua bidest	17,05 µl	
Gesamt-Volumen	25,00 µl	

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym <i>Nla</i> III (10 U/µl)	0,2 µl (1,0 U)
Puffer: Puffer 5	3,00 µl (1 x)
BSA:	0,35 µl
Aqua bidest:	11,45 µl
PCR:	15 µl

Wasserbad 37 °C; 17 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 173 bp

T-Allel: 45 bp, 108 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133079 (T/C)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs133079-f CGC TTT ATC TTT GCA CAC CA  
Primer reverse SNP rs133079-r TTC GTA GAG ACG GGG TTT TG  
Produkt-Größe: 197 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C  
Denaturierung 30 sec 94 °C  
Annealing 30 sec 60 °C  
Elongation 30 sec 72 °C  
Elongation 5 min 72 °C  
Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)  
Puffer (SIGMA) 2,5 µl (1 x)  
MgCl<sub>2</sub> (SIGMA) 1,5 µl (1,5 mM)  
Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)  
Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)  
dNTP 0,25 µl (0,25 mM)  
Taq (SIGMA) 0,2 µl (1 U)  
Aqua bidest 17,55 µl  
Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Msp*I (10 U/µl) 0,3 µl (3,0 U)  
Puffer: Y<sup>+</sup> Tango 3,00 µl (1 x)  
Aqua bidest: 11,7 µl  
PCR: 15 µl

Wasserbad 37 °C; 1 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 91 bp, 106 bp

T-Allel: 197 bp

**Genotypisierungsprotokoll SNP rs133084 (T/C)****Methode: PCR-RFLP:**

Primer forward SNP rs133084-f AGG GTA CCC AAG GCA TCA CT

Primer reverse SNP rs133084-r GCA CCC CAG CCA AAG TAG TA

Produkt-Größe: 170 bp

**PCR:**Thermozykler:

Denaturierung 5 min 94 °C

Denaturierung 30 sec 94 °C

Annealing 30 sec 62 °C

Elongation 30 sec 72 °C

Elongation 5 min 72 °C

Abkühlen 4 °C

Anzahl der Zyklen: 30

Reaktions-Mix:

DNA 2,5 µl (50 ng)

Puffer (Perkin Elmer) 2,5 µl (1 x)

MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer) 1,5 µl (1,5 mM)

Primer f 0,25 µl (6,25 pmol)

Primer r 0,25 µl (6,25 pmol)

dNTP 0,25 µl (0,25 mM)

Taq (Perkin Elmer) 0,2 µl (1 U)

Aqua bidest 17,55 µl

Gesamt-Volumen 25,00 µl

**RFLP:**Verdau-Mix:

Enzym *Cac8I* (0,4 U/µl) 0,1 µl (0,04 U)

Puffer NEB3 2,00 µl (1 x)

Aqua bidest: 1,9 µl

PCR: 16 µl

Wasserbad 37 °C; 2,5 h

Auftrag auf Agarose-Gel (2,5 %)

Fragmentlängen:

C-Allel: 60 bp, 110 bp

T-Allel: 170 bp

## DANKSAGUNG

Prof. Dr. Johannes Hebebrand, dem Leiter der Klinischen Forschergruppe der Kinder- und Jugend-Psychiatrie der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und insbesondere für die hervorragende fachliche Betreuung der vorliegenden Dissertation. Bei Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg bedanke ich mich für die Betreuung und Vertretung der vorliegenden Dissertation im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement der Justus Liebig Universität Gießen.

Prof. Dr. Dr. Helmut Remschmidt, dem Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Möglichkeit der Dissertation an seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Anke Hinney, der Laborleiterin der Klinischen Forschergruppe, für ihre individuelle Begleitung der Dissertation, ihre andauernde Gesprächsbereitschaft sowie ihre konstruktive Kritik und Motivation bei auftretenden Problemen und Fragen. Mein Dank geht ebenso an alle im Labor tätigen Mitarbeiter der Klinischen Forschergruppe, die mich bei der Durchführung der umfangreichen praktischen Tätigkeiten, v. a. bei der Genotypisierung von SNPs in mehreren Studiengruppen, unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle die herausragende Einsatzbereitschaft von Gudrun Höhn und ihre umfassende, unermüdliche Unterstützung herausheben.

An die Ärzte im Praktikum der Klinischen Forschergruppe, die mit ihrer Arbeit die Erstellung des großen, aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen bestehenden, Studienkollektivs sowie der Kontrollkollektive ermöglichten, richtet sich mein Dank. Den Leitern der Rehabilitationskliniken Dr. Wolfgang Siegfried (Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA, Berchtesgaden) und Dr. Hans-Peter Goldschmidt (Spessartklinik Bad Orb) danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung der Rekrutierungen. Den Kindern und Familien sowie Studenten sei an dieser Stelle für ihre Teilnahme an der vorliegenden Studie gedankt.

Eine große Anzahl an Kooperationspartnern sowohl aus Deutschland als auch aus dem Ausland ermöglichte die Untersuchung des *MCHR1* in dem hier vorgelegten Umfang. Einen entscheidenden Anteil am Gelingen des gesamten Vorhabens trugen dabei Dr. Kathrin Reichwald, Dr. Matthias Platzer und Dr. Klaus Huse sowie die Mitarbeiter ihrer Arbeitsgruppe (Abteilung für Genomanalyse; Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena). Sie haben nicht nur einen großen Anteil der experimentellen Untersuchungen und der *in silico* Datenbank-Analysen übernommen, sondern waren ebenso bei der Planung des Projektes und der Diskussion der Ergebnisse unsere wichtigsten Partner, wofür ich Ihnen außerordentlich dankbar bin. Dr. Kathrin Reichwald bin ich zudem sehr dankbar für die enge Zusammenarbeit, ihr Nichtaufgeben und ihre aufmunternden Worte.

An Prof. Dr. Helmut Schäfer und insbesondere PhD stud. Frank Geller aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg richtet sich mein besonderer Dank für ihre zahlreichen statistischen Auswertungen, Berechnungen und die Studie begleitenden Beratungen bezüglich des Studiendesigns.

Für die Durchführung der funktionellen Studien danke ich Dr. Cornelia Platzer (Institut für Anatomie II, Jena) sowie Dr. Claudia Hess und Prof. Dr. Thomas Gudermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg).

Bei Dr. Heike Biebermann und Dr. Heiko Krude (Poliklinik für pädiatrische Endokrinologie des Kinderkrankenhauses der Charité, Humboldt Universität, Berlin) bedanke ich mich für ihre herzliche und offene Aufnahme während eines Gastaufenthaltes in ihrem Labor, für ihre Unterstützung und Bereitstellung von Probenmaterial für die Genotypisierung eines SNPs.

Für die zur Verfügung gestellten Proben von dänischen adipösen Patienten und Kontrollpersonen möchte ich mich bei Prof. Dr. Thorkild I. A. Sørensen (Dänisches Wissenschaftszentrum für Epidemiologie, Institut für Präventive Medizin, Universitäts-Krankenhaus Kopenhagen, Kopenhagen, Dänemark), Prof. Arne Astrup (Institut für Ernährung des Menschen, Königliche Veterinär- und Landwirtschafts-Universität, Frederiksberg Copenha-gen, Dänemark), Dr. Oluf Pedersen (Steno Diabetes Zentrum, Gentofte, Dänemark) und insbesondere bei PhD stud. Lesli Hingstrup Larsen (Dänisches Wissenschaftszentrum für Epidemiologie, Institut für Präventive Medizin, Universitäts-Krankenhaus Kopenhagen, Kopenhagen, Dänemark; Steno Diabetes Zentrum, Gentofte, Dänemark) bedanken.

Für die Genotypisierungsarbeiten an ihren adipösen Studienkollektiven und Kontrollpersonen und die Beisteuerung ihrer Daten zu der vorliegenden Studie bedanke ich mich bei PhD stud. Wei-Dong Li und Prof. Dr. R. Arlen Price (Center for Neurobiology and Behavior, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA), bei PhD stud. Caren Vollmert, Prof. Dr. H.-Erich Wichmann und Dr. Thomas Illig (GSF-Nationales Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Epidemiologie, Neuherberg; Genomanalysen Zentrum, GSF-Nationales Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg) sowie bei PhD stud. Delphine Eberle und Dr. Karine Clément (Hotel Dieu, Laboratoire de Nutrition, Paris, Frankreich).

Prof. John E. Blundell (PsychoBiology Research Unit, University of Leeds, Leeds, UK) danke ich für die zur Verfügung gestellten Fragebögen (Leeds Food Frequency Questionnaire; L-FFQ) und Prof. Dr. Martin Wabitsch (Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Universität Ulm, Ulm) für die bereitgestellten Präadipozyten-Zelllinien.

Die vorliegende Arbeit wurde durch verschiedene Träger finanziell getragen. Die Patienten-Rekrutierung der Deutschen Studiengruppen 1-4 wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziert. Die Pharma-Firma Aventis (Hoechst) sowie das Bundesministerium für Bildung und Forschung haben maßgeblichen finanziellen Anteil am Zustandekommen der vorliegenden Studie. Ebenfalls erhielten wir finanzielle Unterstützung aus dem EU-Projekt „Diät und Adipositas“. Die Genotypisierung der KORAS2000 Studiengruppe wurde teilweise durch das Deutsche Nationale Genom-Forschungs-Netz (NGFN; Plattform 6) finanziert.

Für das unermüdliche und zeitaufwendige Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit und ihre moralische Unterstützung bin ich insbesondere meiner Mutter Dr. Franziska Süss und Dr. Anke Hinney dankbar. Meinem Bruder Tilman Süss danke ich für seine Hilfe bei der Klärung technischer Schwierigkeiten und grafischer Fragestellungen.

Bei meinen Eltern, meinem Mann und meinen beiden Kindern möchte ich mich ganz besonders für ihre Liebe, ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre unendliche Geduld und ihre fortwährende Ermutigung bedanken, die mir die Kraft zur Fertigstellung der vorliegenden Dissertation gaben.

## PUBLIKATIONEN

- Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, **Wermter A-K**, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schafer H, Gudermann T, Hebebrand J (2003) Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4258-4267
- Hebebrand J, Geller F, Dempfle A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Gerber G, **Wermter A-K**, Horro FF, Blundell J, Schafer H, Remschmidt H, Herpertz S, Hinney A (2004) Binge-eating episodes are not characteristic of carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations. *Mol Psychiatry* 9:796-800
- Hebebrand J, **Wermter A-K**, Hinney A (2004) Adipositas - Genetik und Gen-Umwelt-Interaktionen. *Monatsschrift Kinderheilkd* 152:870-876
- Hinney A, **Wermter A-K**, Friedel S, Hinney C, Remschmidt H, Hebebrand J (2004) Genetische Faktoren der Adipositas. *medgen* 16:327-333
- Friedel S, Fontenla Horro F, **Wermter A-K**, Geller F, Dempfle A, Reichwald K, Smidt J, Konrad K, Herpertz-Dahlmann B, Warnke A, Hemminger U, Linder M, Kiefl H, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Hinney A, Hebebrand J. Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): Identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder, in press
- Wermter A-K\***, Reichwald K\*, Geller F, Platzer C, Huse K, Hess C, Remschmidt H, Gudermann T, Preibisch G, Siegfried W, Goldschmidt H-P, Li WD, Price RA, Biebermann H, Krude H, Vollmert C, Wichmann H-E, Illig T, Sørensen TIA, Astrup A, Hingstrup Larsen L, Pedersen O, Eberle D, Clément K, Blundell J, Wabitsch M, Schäfer H, Platzer M, Hinney A, Hebebrand J. Evidence for the contribution of a haplotype encompassing a putative non-conservative missense SNP in the *MCHR1* gene to human obesity in German children and adolescents, eingereicht (\* both authors contributed equally)

## PATENTE

- PCT/EP02/09316 (2003) Use of SNPs of MCH-R for identifying genetic disorders in maintaining the normal body weight. Aventis Pharma GmbH Deutschland. Hebebrand J, Hinney A, **Wermter A-K**, Geller F, Ziegler A
- PCT/EP03/05917 (2003) *MCHR1* variant associated with human obesity. Hebebrand J, Hinney A, **Wermter A-K**, Reichwald K, Platzer M, Huse K, Gudermann T, Hess C, Schäfer H, Geller F, Platzer C

## VORTRÄGE / POSTER

### Vortrag

„Maßgeblicher Beitrag eines *MCHR1* Haplotyps zur Adipositas beim Menschen“

**Anne-Kathrin Wermter** \*, Kathrin Reichwald \*, Frank Geller, Cornelia Platzer, Klaus Huse, Claudia Hess, Helmut Remschmidt, Thomas Gudermann, Helmut Schäfer, Matthias Platzer, Anke Hinney, Johannes Hebebrand

- 18. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft, 10/2002, Dresden

„Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation – Untersuchung eines Kandidatengens: Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons“

**Anne-Kathrin Wermter**, Kathrin Reichwald\*, Frank Geller, Cornelia Platzer, Klaus Huse, Claudia Hess, Helmut Remschmidt, Thomas Gudermann, Gerald Preibisch, Wolfgang Siegfried, Hans-Peter Goldschmidt, Wei-Dong Li, R. Arlen Price, Heike Biebermann, Heiko Krude, Caren Vollmert, H.-Erich Wichmann, Thomas Illig, Thorkild I. A. Sørensen, Arne Astrup, Lesli Hingstrup Larsen, Oluf Pedersen, Delphine Eberle, Karine Clément, John E. Blundell, Martin Wabitsch, Helmut Schäfer, Matthias Platzer, Anke Hinney, Johannes Hebebrand (\* beide Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen)

- Internationale Woche des Gehirns; anlässlich der Ausschreibung des Dissertationspreises durch die Dana Alliance for the Brain (EDAB), 17. März 2004, Marburg

### Poster

„Involvement of a melanin-concentrating hormone receptor allele in human obesity“

**Anne-Kathrin Wermter**, Frank Geller, Anke Hinney, Johannes Hebebrand

- 9th International Congress on Obesity, 8/2002, Sao Paulo, Brasilien

“Major contribution of a haplotype encompassing a non-conservative missense cSNP in the *MCHR1* gene to human obesity” Kathrin Reichwald \*, **Anne-Kathrin Wermter** \*, Frank Geller, Cornelia Platzer, Klaus Huse, Helmut Remschmidt, Claudia Hess, Thomas Gudermann, Helmut Schäfer, Matthias Platzer, Anke Hinney, Johannes Hebebrand (\* beide Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen)

- 2. Weimar Conference of Genetics, 9/2002, Weimar
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 9/2002, Leipzig
- 5th International Meeting on SNP and Complex Genome Analysis, 10/2002, Reykjavik

“Major contribution of a haplotype encompassing a non-conservative missense cSNP in the *MCHR1* gene to human obesity” **Anne-Kathrin Wermter** \*, Kathrin Reichwald \*, Frank Geller, Cornelia Platzer, Klaus Huse, Helmut Remschmidt, Claudia Hess, Thomas Gudermann, Helmut Schäfer, Matthias Platzer, Anke Hinney, Johannes Hebebrand (\* beide Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen)

- DHGP/NGFN-Symposium “The Genetic and Molecular Basis of Human Disease”, 11/2002, Berlin

## AUSZEICHNUNG

2. Platz bei der Verleihung des Dissertationspreises durch die Dana Alliance for the Brain (EDAB), 17. März 2004, Marburg

„Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation – Untersuchung eines Kandidatengens: Rezeptor 1 des Melanin-konzentrierenden Hormons“

**Wermter A-K\***, Reichwald K\*, Geller F, Platzer C, Huse K, Hess C, Remschmidt H, Gudermann T, Preibisch G, Siegfried W, Goldschmidt H-P, Li WD, Price RA, Biebermann H, Krude H, Vollmert C, Wichmann H-E, Illig T, Sørensen TIA, Astrup A, Hingstrup Larsen L, Pedersen O, Eberle D, Clément K, Blundell J, Wabitsch M, Schäfer H, Platzer M, Hinney A, Hebebrand J.

# LEBENS LAUF

## BERUFSTÄTIGKEIT

- Dez. 2003 Klinische Forschergruppe der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg  
• Wissenschaftliche Angestellte
- Aug. 2000 Klinische Forschergruppe der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg
- Febr. 2003 • Wissenschaftliche Angestellte zur Promotion

## PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN VOR UND WÄHREND DES STUDIUMS

- Sept. 1989 Klinikum für Innere Medizin der Medizinischen Akademie Magdeburg
- Okt. 1989 • DNA-Isolation aus Knochenmarksbiopsien, PCR, Elektrophorese
- Jan. 1993 Bayerische Landesanstalt für Wald- und Forstwirtschaft in Freising
- März 1996 • Wasser- und Pflanzenanalytik: Probenaufschluss, CN-Elementaranalyse, ICP-Analytik, Qualitätskontrolle, Datenvalidierung
- April 1996 Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum der JLU
- Aug. 2000 Gießen/Präsenzlabor der Medizinischen Klinik:  
• Analysen klinisch-chemischer Parameter, Blutgasanalysen, Bestimmungen des kleinen Blutbildes, der Blutglucose und von Medikamenten- und Drogenspiegeln, Abnahme von kapillarem Blut bei Patienten, Qualitäts- und Plausibilitätskontrolle

## STUDIUM

- Okt. 1992 TU München Zweigstelle Freising – Weihenstephan
- Sept. 1995 • Hochschulstudium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften  
• Studienschwerpunkte: Präventivmedizin, Psychologie und Verhaltensmodifikation, Beratungs- und Kommunikationslehre
- Okt. 1995 Justus-Liebig-Universität in Gießen
- Juni 2000 • Hochschulstudium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften  
• Hauptstudium: Fachrichtung Ernährungswissenschaft  
• Studienschwerpunkte: Biochemie, Pathophysiologie, Beratungs- und Kommunikationswesen  
• Diplomarbeit: „Modifizierung einer *in vitro*-Methode zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Mineralstoffen beim Monogastrier“ (Note 1,3)  
• DIPLOM-OECOTROPHOLOGIN (Note 2,1)

## BERUFSAUSBILDUNG

- Sept. 1988 Akademie der Wissenschaften – Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena
- Aug. 1989 • Biologielaborantin/Labordiagnostik (Note 1,1)
- Nov. 1989 Medizinische Berufsfachschule der Medizinischen Akademie Magdeburg
- Aug. 1992 • MEDIZINISCH-TECHNISCHE LABORASSISTENTIN (Note 1,1)

## SCHULBILDUNG

- Sept. 1976 Allgemein bildende Oberschule Jena
- Juni 1988 Erweiterte Internatsoberschule Wickersdorf  
Erweiterte Oberschule Jena; Abitur (Note 1,6)