

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

Klinische Forschergruppe
Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

**Feinkartierung einer Kopplungsregion auf Chromosom 10p
für frühmanifeste Adipositas mittels sieben Mikrosatellitenmarkern
an 123 Familien bestehend aus mindestens
zwei adipösen Geschwistern und ihren Eltern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Markus Vogel
aus Berlin

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 08. Mai 2003

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof.Dr. J. Hebebrand
Koreferent: Prof. Dr. Koch

Heide Vogel gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	9
1.1 Theoretische Grundlagen	11
1.1.1 <i>Adipositas</i>	11
1.1.2 <i>Regulation des Körpergewichtes</i>	14
1.2 Formalgenetik	17
1.2.1 <i>Zwillingsuntersuchungen</i>	17
1.2.2 <i>Adoptionsstudien</i>	18
1.2.3 <i>Familienuntersuchungen</i>	18
1.2.4 <i>Syndromale Formen der Adipositas</i>	19
1.2.5 <i>Gen-Umwelt-Interaktion und Kopplungsstudien</i>	19
1.2.6 <i>Tiermodelle</i>	20
1.3 Genetische Komponenten der Adipositasentstehung	21
1.3.1 <i>Monogene Formen der Adipositas beim Menschen</i>	21
1.3.2 <i>Polygene Formen der Adipositas</i>	24
1.4 Biologische Grundlagen zur Kopplung	32
1.4.1 <i>Rekombination und genetische Kopplung</i>	32
1.4.2 <i>Genetische Kartierung</i>	33
1.5 Statistische Grundlagen	34
1.5.1 <i>Modellfreie Kopplungsanalyse qualitativer Phänotypen</i>	34
2 ZIEL DER ARBEIT	36

3 MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 Das Untersuchungskollektiv.....	37
3.1.1 Aufnahme in die Studie.....	37
3.1.2 Kriterien für die Rekrutierung.....	38
3.1.3 Zusammensetzung des Kollektives	39
3.2 DNA-Extraktion.....	40
3.2.1 Blutentnahme	40
3.2.2 Extraktion der DNA	40
3.2.3 Verdünnung und Konzentrationsbestimmung.....	41
3.3 Amplifizierung der DNA	41
3.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	42
3.3.2 Wahl der Primer.....	44
3.3.3 Optimierung der PCR.....	44
3.4 Analyse des Amplifikats.....	46
3.4.1 Herstellung eines Polyacrylamid-Geles	46
3.4.2 Vorbereiten der Analyse.....	47
3.4.3 Datenerfassung mittels Infrarot-Gel-Scanner.....	47
3.4.4 Datenanalyse	48
3.5 Verwaltung der Daten	52
3.5.1 Datensicherung.....	52
3.5.2 Zentrale Datenverwaltung mit MS Access	52
3.6 Statistische Methoden	53

3.6.1 Kopplungsanalyse.....	54
3.6.2 Mean-Test	56
3.6.3 Maximum-Likelihood-Score	57
3.6.4 TDT - Transmissions Disequilibrium Test.....	59
3.6.5 Tests auf Plausibilität	61
3.6.6 Haplotypen-Vergleich.....	61
3.7 Materialien.....	63
3.7.1 Puffer / Chemikalien	63
3.7.2 DNA-Extraktion.....	63
3.7.3 PCR.....	64
3.7.4 Sequenz-Analyse	65
3.7.5 Mikrosatellitenmarker und Oligonukleotide	66
3.8 Geräte und Firmen	71
3.8.1 Geräte und Herstellerangaben.....	71
3.8.2 Firmen	71
3.8.3 Software	73
4 ERGEBNISSE	74
4.1 Allelfrequenzen und Basenpaarlängen	74
4.1.1 Quantität und Qualität der PCR-Produkte.....	75
4.2 LOD-Scores.....	84
4.3 TDT-Test - explorative Analysen	86

5 DISKUSSION	90
5.1 Genetik komplexer Phänotypen.....	90
5.2 Auswahl des Patientengutes.....	91
5.3 MLB-LOD-Scores.....	92
5.4 TDT-Tests.....	93
5.5 Abschließende Beurteilung.....	94
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	95
LITERATURVERZEICHNIS.....	96
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	113
TABELLENVERZEICHNIS.....	114
ANHANG.....	115
Abkürzungen.....	115
Verzeichnis meiner akademischen Lehrer.....	116
Lebenslauf.....	117
Danksagungen.....	118
Ehrenwörtliche Erklärung.....	119

1 Einleitung

Das Verständnis von menschlicher Fortpflanzung ist durch die Identifizierung der DNA als Erbmaterial durch Avery und Mitarbeiter (Avery et al. 1944), sowie Kenntnis ihrer Doppelhelixstruktur (Watson et al. 1953) und durch die Entschlüsselung des genetischen Codes (Nirenberg et al. 1961; Hayes 1998) auf der molekularen Ebene gelangt.

Gregor Mendel legte 1866 in seiner berühmten Schrift (Mendel 1866) den Grundstein moderner Vererbungslehre. Mendel untersuchte die Mechanismen der Weitergabe diskreter Merkmale an Pflanzen. Das Übertragen dieser Mechanismen auf den Menschen gestaltete sich jedoch schwierig. Zwar ließen sich mit der Entdeckung der Zelle als Bausteine des Lebens durch Robert Hooke (1665), Theodor Schwann (1838/39) und Rudolf Virchow (1855) und der Entdeckung der Chromosomen durch Walter Flemming (1882) als Träger von Erbinformationen (Sutton und Boveri 1902-1904) morphologische Äquivalenzen der Mendelschen Gesetze finden (Martins 1999), doch nur wenige Merkmale oder Phänotypen eines Menschen sind diskret, also entweder vorhanden oder nicht vorhanden (dichotom). Die meisten Phänotypen sind kontinuierlich messbar, also mehr oder weniger vorhanden (quantitativ). Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts hatten sich zwei Lager gebildet: die Mendel-Anhänger um den amerikanischen Forscher William Bateson (Bateson 1902) und die Biometriker um den Amerikaner Galton. Beide Gruppen konnten kein umfassendes Modell menschlicher Erbmechanismen liefern, obwohl sie jeweils eindeutige Beweise für die Richtigkeit ihrer Ansichten hatten. Fisher gelang es beide Ansätze zu vereinen (Fisher 1918). Er vertrat die Ansicht, dass quantitative Merkmale aus vielen unabhängigen dichotomen Merkmalen aufgebaut werden können (vergleiche Abbildung 1), bzw. dass viele unabhängige Mendel-Merkmale die gleiche Verteilung und familiäre Häufung zeigen, wie von den Biometrikern beschrieben. Heute können als Träger der Erbinformation einzelne Abschnitte der DNA identifiziert werden, die zum größten Teil nach Mendels Gesetzen vererbt werden und in ihrem Zusammenspiel für quantitative Phänotypen verantwortlich sind.

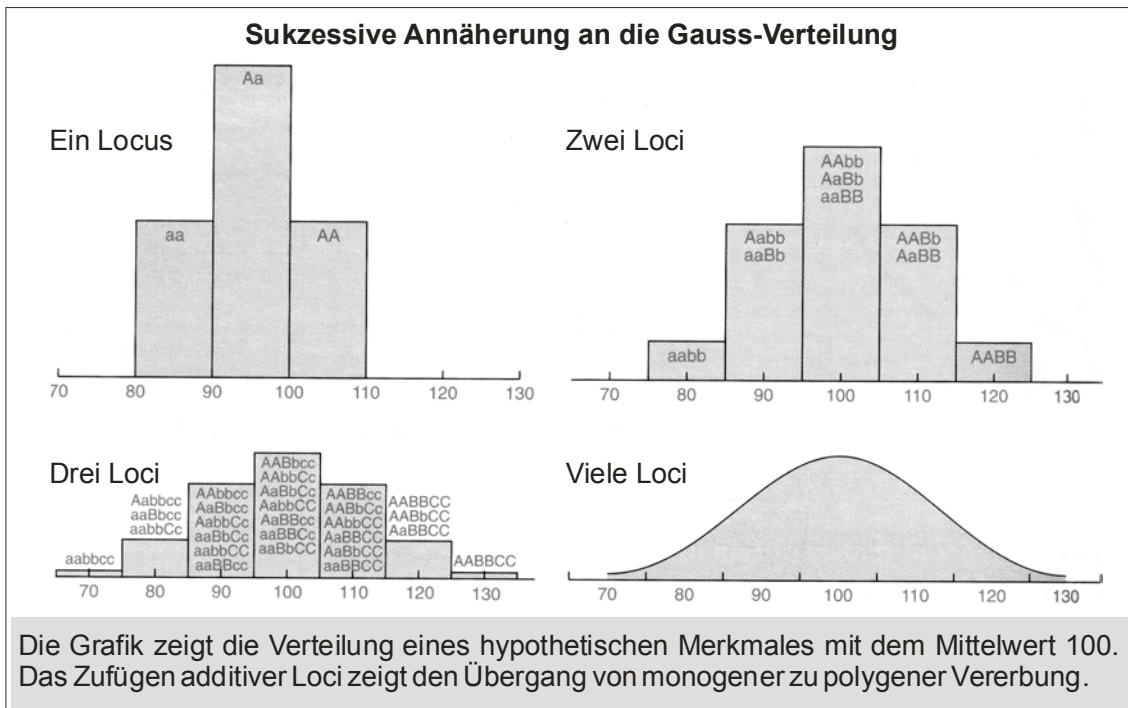


Abbildung 1, nach (Strachan et al. 1999)

Gene sind spezifische, Erbinformationen codierende DNA-Sequenzen (Ott 1999). Erkrankungen die durch Veränderungen in einem einzelnen Gen verursacht werden, nennt man monogene Erkrankungen. Polygene Erkrankungen werden durch Veränderungen an mehreren Genen verursacht. Die Aufklärung monogener Erkrankungen ist sehr weit fortgeschritten (siehe z.B. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, (McKusick 2000)). Schwieriger stellt sich die Erforschung polygener Erkrankungen bzw. quantitativer oder komplexer Phänotypen dar. Die Erforschung quantitativer oder komplexer Phänotypen erfordert ein anderes oder zusätzliches Handwerkzeug als die Entschlüsselung monogener Erkrankungen. Im Folgenden wird die Identifizierung genetischer Mechanismen komplexer Phänotypen am Beispiel der Adipositas beschrieben.

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Adipositas

Adipositas ist eine Störung, die in den westlichen Industrieländern, aber auch in vielen Schwellenländern, rapide zugenommen hat (Barth et al. 1997).

Definition

Das Körpergewicht ist –unabhängig von der Definition– eine kontinuierliche Größe, wobei jedoch die Einteilung in verschiedene Gewichtsklassen vorgenommen werden kann. Es handelt sich also um einen quantitativen Phänotyp bzw. ein komplexes Merkmal. Das Gesamtkörpergewicht ist die Summe aus der Fettmasse und der fettfreien Masse. Adipositas liegt vor, wenn der Anteil des Fettes am Gesamtkörpergewicht einen Durchschnittswert überschreitet. Pschyrembel (Pschyrembel 1998) definiert Adipositas als "die übermäßige Vermehrung oder Bildung von Fettgewebe". Die Bestimmung des Körperfettanteils ist schwierig und erfolgt nur selten in epidemiologischen Untersuchungen. Daher greift man oft auf den Body Mass Index (BMI, Quetelet-Index) zurück. Der BMI wird definiert durch (Garrow et al. 1985):

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht} \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^2} \right]}{\text{Körperlänge}^2 \left[\frac{\text{m}^2}{\text{m}^2} \right]}$$

Durch diese Formel wird eine hohe Korrelation zum Körpergewicht und eine niedrige zur Körperlänge erreicht. Weiterhin konnte gezeicht werden, dass der BMI mit dem Körperfettgehalt korreliert ($r = 0,7-0,8$) (Schey et al. 1984; Gray et al. 1991). Mit Hilfe des BMI werden verschiedene Gewichtsklassen bei Erwachsenen definiert. Tabelle 1 zeigt Einteilungen nach BMI und BMI-Perzentilen. Die WHO klassifiziert basierend auf einem Vorschlag von Garrow (Garrow 1981) nach BMI.

Adipositas-Defintionen der WHO und Hebebrand et al.

WHO 1997		Hebebrand et al. 1994	
Gewichtsklasse	BMI	Gewichtsklasse	BMI-Perzentile
Übergewicht	≥ 25		
Adipositas I	≥ 30	Adipositas	≥ 85
Adipositas II	≥ 35		
Adipositas III	≥ 40	ausgeprägte Adipositas	≥ 95

Tabelle 1

Adipositas bzw. extreme Adipositas werden durch BMI-Werte von ≥ 30 bzw. ≥ 40 kg/m² abgegrenzt. Auch die 85. und 95. BMI-Altersperzentilen können zur Definition der Adipositas bzw. der extremen Adipositas herangezogen werden. Welche Definition der Adipositas letztendlich verwendet wird, ist willkürlich. Eine altersunabhängige Definition ist jedoch problematisch, da sie nur unter Zugrundelegung einer altersentsprechenden BMI-Verteilung korrekt interpretiert werden kann. Die vorliegende Arbeit nutzt die Adipositas-Definition nach Hebebrand et al. (Hebebrand et al. 1994). Es werden BMI-Perzentilenkurven der westlichen Bundesländer Deutschlands verwandt, die einen definierten BMI zur altersentsprechenden Verteilung in Bezug setzen. So wird sichergestellt, dass in der vorliegenden Arbeit tatsächlich BMI-Maxima aus der entsprechenden Population untersucht werden.

Epidemiologie

In vielen westlichen Ländern steigt die Adipositasprävalenz zunehmend und steigert zunehmend die Morbidität und Mortalität. Nach Daten der MONICA-Studie (**MONI**tor trends in **CARD**iovascular diseases) (WHO 2002) aus der Mitte der 80er Jahre sind mehr als 10% aller Erwachsenen mittleren Lebensalters (35 - 65 Jahre) adipös. Neben den Daten aus der MONICA-Studie gibt es in Deutschland weitere epidemiologische Studien, die für die Adipositas ähnlich schwerwiegende Befunde ergaben. In der Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktorenanalytik (VERA) waren 11,6% aller über 18-jährigen Frauen in Deutschland adipös (BMI > 30 kg/m²). Bei Männern betrug die entsprechen-

de Quote 10,6%. Die extreme Adipositas (BMI > 40 kg/m²) liegt bei 0,6% der Frauen bzw. 0,1% der Männer vor. Die PROCAM-Studie (PREventiON of CoronARY heart disease Münster) ergab Ende der achtziger Jahre ähnliche Zahlen. Bei Männern stieg die Prävalenz der Adipositas von 5% zwischen 25 und 35 Jahren auf 13% zwischen 55 und 65 Jahren an, bei Frauen stieg die Prävalenz von 3,6 auf 18,1%. Diese Daten beruhen im allgemeinen auf der Erfassung von Größe und Gewicht. Eine Betrachtung der Adipositas als regionales Fettgewebsverteilungsproblem, wie beispielsweise als viszerale Adipositas, ist in diesen epidemiologischen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Angesichts der enormen volkswirtschaftlichen Relevanz der Adipositas ergibt sich die Frage nach den Ursachen dieser Epidemie. Zusätzlich zu Umweltbedingungen spielt die genetische Disposition des Einzelnen eine große Rolle (Schneider et al. 1992; Hebebrand et al. 1994; Hesecker et al. 1995). Dem Argument, dass schlicht zu viel gegessen bzw. zu wenig sich bewegt wird, sind folgende Überlegungen gegenüber zu stellen:

- Die Erbinformation eines Menschen könnte nicht mehr optimal an die heutigen Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten angepasst sein. Mussten früher Hunger- und Dürreepisoden überlebt werden, ist heute jedoch ein Überangebot an Nahrung zu tolerieren. Die Fähigkeit, Energie optimal zu speichern war überlebensnotwendig. Demzufolge könnten unter heutigen Ernährungsbedingungen Regulationsstörungen des Körpergewichtes auftreten, die unter verringerter Nährstoffzufuhr nicht zu beobachten sind (Hebebrand et al. 1995). Hier bietet sich also ein möglicher Ansatz, noch unbekannte Mechanismen zur Regulation des Körpergewichtes aufzudecken, da ein unter dem generellen Nährstoffüberangebot adipös werdendes Patientenkollektiv entsteht.
- Die Intrapaar-Korrelation für Gewichtsveränderungen ist bei eineiigen Zwillingen im Hinblick auf kurz- oder langfristige Über- bzw. Unterernährung größer als zwischen Paaren, die aus verschiedenen einzelnen Zwillingen gebildet werden (Bouchard et al. 1993).

- Die neuroendokrine Regulation des Eßverhaltens bzw. der Gewichtsregulation kann durch Medikamente, insbesondere Psychopharmaka, im Sinne einer Gewichtszunahme als auch Gewichtsabnahme moduliert werden (Malhi et al. 2001).
- Die Behandlung der Adipositas durch Nahrungsrestriktion ist begleitet von einer hohen Rückfallrate, was die Behandlung erschwert (Drenick et al. 1978).

1.1.2 Regulation des Körpergewichtes

Die Kontrolle der Energieaufnahme und -abgabe ist ein hochkomplexer Prozess, dessen Steuerung zunehmend, aber noch nicht vollständig verstanden wird. Energiehomöostase wird erreicht, wenn die Differenz aus Aufnahme und Abgabe der zugeführten Energie einen konstanten Mittelwert erreicht, der dem mittleren Energieverbrauch entspricht. Ist die Differenz positiv im Sinne von überschüssig zugeführter Energie, so kann eine Speicherung in Form von Kohlenhydraten, Eiweißen oder Fett erfolgen (Ravussin et al. 2000).

Die Aufnahme von Energie erfolgt im Wesentlichen aus der Nahrung und direkt zugeführter Wärme. Die Abgabe erfolgt im weitesten Sinne als mechanische Energie, als Wärmeenergie und als chemische Energie (Enthalpie und Entropieminimierung). Trotz kurzfristigen teils erheblichen Ungleichgewichten in der Energiebilanz sind für die meisten Menschen über einen längeren Zeitraum gesehen Energieverbrauch und Energieaufnahme erstaunlich ähnlich (Edholm 1977). Diese Exaktheit lässt einen zugrundeliegenden Regulationsprozess in Form einer Energiehomöostase vermuten.

Kennedy stellte die Hypothese auf, dass von den Körperfettspeichern inhibitorische Signale an das zentrale Nervensystem gesandt werden, die abhängig von der Größe der Fettspeicher die Nahrungsaufnahme reduzieren (Kennedy 1953). Diese Theorie wurde von Smith und Gibbs zwanzig Jahre später ergänzt, in dem sie für einzelne Mahlzeiten die Sekretion von Sättigungsfaktoren durch den Gastrointestinaltrakt postulierten, die bei ausreichender Konzentration für eine Beendigung der Mahlzeit sorgen (Gibbs et al. 1973).

Das inkretorische Pankreassekret Insulin war das erste Hormon, für das ein Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und Kontrolle des Körpergewichtes durch das ZNS hergestellt werden konnte (Woods et al. 1979). Mit dem Beweis, dass die Adipositas der *obese*-Maus durch eine fehlende Produktion des von Adipozyten sekretierten Botenstoffes Leptin verursacht wird, war ein weiterer wichtiger Regulator gefunden (Zhang et al. 1994). Beide Hormone haben Plasmakonzentrationen proportional zum Körperfettgehalt (Bagdade et al. 1967; Considine et al. 1996).

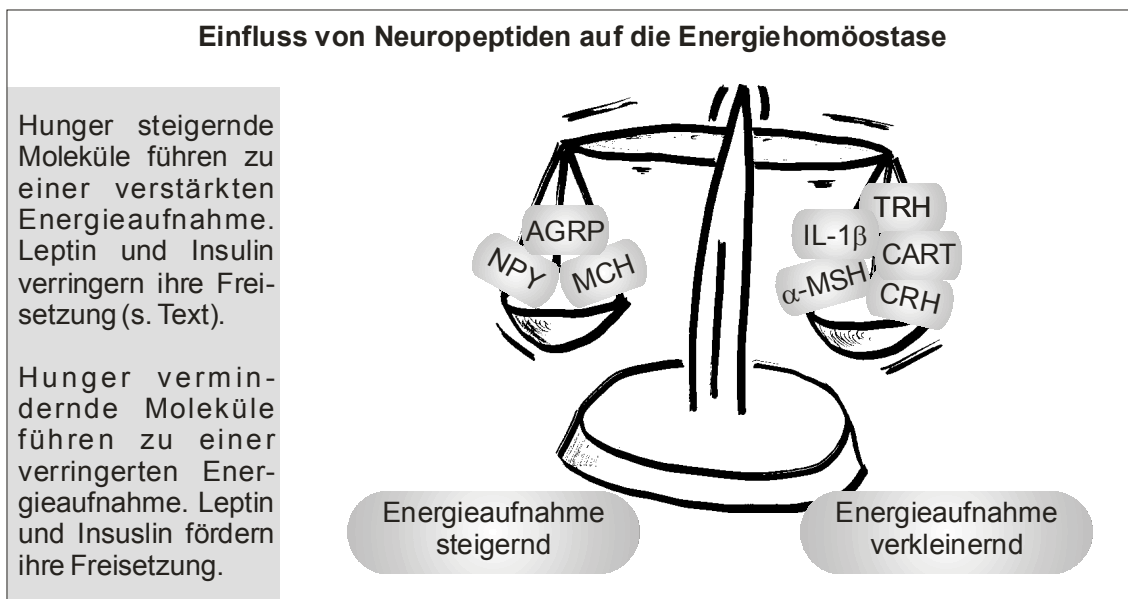


Abbildung 2

Abbildung 2 fasst den Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die Energiehomöostase zusammen. Weitere wichtige Stellgrößen im ZNS sind Dopamin, Serotonin, Gammaaminobuttersäure, Cholezystokinin, Galanin, Opioide, Wachstumshormon sowie Somatostatin. Diesen Stoffen ist eine modifizierende Wirkung zentraler Neuropeptide gemeinsam (Rosenbaum et al. 1997).

Ein wichtiger Vertreter unter den anabol wirkenden Neuropeptiden ist das Neuropeptid Y (NPY) (Stephens et al. 1995). Leptin inhibiert im Nucleus arcuatus die Sekretion von NPY (Schwartz et al. 1996) und eine NPY-knockout *obese*-Maus imponiert mit gering ausgeprägter Adipositas und Hyperphagie (Erickson et al. 1996). Geringe Leptin-/Insulinspiegel führen über eine Aktivierung NPY-produzierender Neurone im Nucleus arcuatus zu vermehrter Neurotransmitterfreisetzung, was bei deren fördernder Wirkung auf die

Energieaufnahme zur Adipositas führen kann. AGRP (agouti related protein) und MCH (melanin-concentrating hormone) konnten ebenfalls als anabol wirkende Neuropeptide identifiziert werden (Qu et al. 1996).

Auf der anderen Seite des Wirkungsspektrums stehen katabole Systeme steuernde Signalmoleküle wie α -MSH (α -melanocyte-stimulating-hormone), CRH (corticotropin-releasing-hormone), TRH (thyrotropin-releasing-hormone), CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), sowie IL-1 β (interleukin-1 β) (Kristensen et al. 1998). Zu dem melanocortinergen System zählen Peptide, die von dem POMC-Vorläufermolekül abgespalten werden (pro-opiomelanocortin). Diese Moleküle üben ihre Wirkung auf die Energiehomöostase über Melanocortin-Rezeptoren (MC3R, MC4R) aus. (Cone et al. 1996; Huszar et al. 1997).

Das Fehlen bereits einer Kopie (Haploinsuffizienz) von MC4-Rezeptoren zum Beispiel führt bei Mensch und Tier zu Hyperphagie und pathologischer Gewichtszunahme (Huszar et al. 1997; Vaisse et al. 1998; Yeo et al. 1998; Chen et al. 1999; Hinney et al. 1999). Das aus der *agouti*-Maus klonierte *agouti*-Gen exprimiert ein Protein, welches antagonistisch an von Haarfollikeln exprimierten MC1-Rezeptoren wirkt. Die ektope Produktion dieses Proteins im Gehirn wiederum antagonisiert MC4-Rezeptoren und wird für die konsekutive Gewichtszunahme verantwortlich gemacht (Cone et al. 1996). Das homologe AGRP blockiert MC3- und MC4-Rezeptoren. Die hypothalamische AGRP-Produktion ist, wie NPY und POMC, im Nucleus arcuatus lokalisiert und wird durch Fasten und niedrige Leptin-Spiegel verstärkt (Shutter et al. 1997; Broberger et al. 1998; Hahn et al. 1998).

Schon lange sind der ventromediale Hypothalamus (VMH) als Sättigungs- und der laterale Hypothalamus (LHA) als Hungerzentrum bekannt (Schmidt et al. 1995). NPY/AGRP und POMC/CART produzierende Neurone im Nucleus arcuatus verfügen über Axone, die in den lateralen Hypothalamus, die paraventriculären Nuklei und perifornicale Nuklei projizieren (Elmqvist et al. 1998; Elmqvist et al. 1999). Von dort werden Signale mittels CRH, TRH und MCH weitergeleitet (Qu et al. 1996). Der Nucleus arcuatus scheint dabei eine Schlüsselrolle in der Transduzierung im Blut vorhandener Leptin- und Insulinkon-

zentrationen in eine neuronale Antwort zu spielen (Sato et al. 1997). Weitere zum Teil noch nicht voll verstandene Bedeutungen kommen Noradrenalin, Dopamin und Serotonin zu. Trotz ihrer derzeitigen Bedeutung für die pharmakologische Therapie der Adipositas scheinen die monoaminergen Systeme nicht die Hauptangriffspunkte der Adipositas-Hormone zu sein. Eine ausführliche Darstellung zentraler Mechanismen der Gewichtsregulation liefern Woods et al. und Schwartz et al. (Schwartz et al. 2000; Woods et al. 2000)

1.2 Formalgenetik

Es wurden mehrere Wege eingeschlagen, um genetische Ursachen der Adipositas aufzuzeigen und von Umwelteinflüssen abzutrennen. Hierzu zählen systematische Untersuchungen von Familien, Zwillingen, Adoptivkindern, syndromalen Erkrankungen und Tiermodellen. Die überwiegende Zahl der Untersuchungen am Menschen verwendet den BMI als analysierte Zielgröße.

1.2.1 Zwillingsuntersuchungen

Zwillingsuntersuchungen zählen zu den mit am wichtigsten Studiendesigns des Formalgenetikers, um Unterschiede zwischen umweltbedingten und vererbten Faktoren aufzuzeigen. So wurden zahlreiche Zwillingsstudien durchgeführt, um die Vererbbarkeit des BMI abzuschätzen (Poehlman et al. 1986; Stunkard et al. 1986; Bouchard et al. 1990; Stunkard et al. 1990; Price et al. 1991; Allison et al. 1996). Dabei kam es zu erstaunlich homogenen Ergebnissen: die Korrelationen zwischen monozygoten Zwillingsgeschwistern lagen unabhängig von Alter und Geschlecht zwischen 0,6 und 0,9 (Bouchard et al. 1993). Für gemeinsam oder getrennt aufgewachsene Zwillinge konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden, die Korrelationen waren ähnlich. Die Intrapaar-Korrelation des BMI monozygoter getrennt aufgewachsener Zwillinge wird für Männer mit 0,7, für Frauen mit 0,66 angegeben. Individuelle umweltbedingte Faktoren erklären die übrigen 30% der Varianz (Stunkard et al. 1990). Unter kontrollierter hochkalorischer Nahrungszufuhr bei 12 erwachsenen männlichen monozygoten Zwillingspaaren konnte eine signifikant ähnliche Gewichtszunahme innerhalb der Paare beobachtet werden. Zwischen den Paaren war die Varianz erheblich höher. Dieser Unterschied ist am ehesten auf

den gleichen bzw. ungleichen genetischen Hintergrund innerhalb bzw. zwischen den Paaren zurückzuführen (Bouchard et al. 1990).

1.2.2 Adoptionsstudien

Große Adoptionsstudien konnten zeigen, dass der BMI der adoptierten Kinder mit dem BMI der leiblichen, aber nur wenig bis gar nicht mit dem der Adoptiv-Eltern korreliert. Stunkard et al. untersuchten 540 zum Studienzeitpunkt erwachsene Adoptivkinder aufgeteilt in vier Gewichtsklassen. Dabei war die Relation zwischen der Gewichtsklasse des Adoptivkindes und dem BMI der leiblichen Eltern nicht nur auf eine Gewichtsklasse beschränkt, sondern im gesamten Gewichtsbereich vorhanden ($p < 0,0001$ für die Mütter; $p < 0,02$ für die Väter). Zu den Adoptiveltern konnte keine vergleichbare Relation gefunden werden. (Stunkard et al. 1986). Sørensen et al. ermittelten mittels einer Untersuchung von 3621 Adoptivlingen Korrelationen von bis zu 0,27 ($p < 0,001$) zwischen den Adoptivkindern und leiblichen Verwandten. Dabei konnte Umweltfaktoren keine bedeutende Rolle zugeschrieben werden (Sørensen et al. 1998). Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des dänischen Adoptionsregisters durchgeführt (Stunkard et al. 1983). Auch in anderen Studiengruppen konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Garn et al. 1976; Price et al. 1987).

1.2.3 Familienuntersuchungen

Die Vererbbarkeit des BMI gemessen anhand der Eltern-Kind- bzw. der Kind-Kind Korrelationen wurde in verschiedenen Studien und Studiengruppen mit $r = 0,16 - 0,6$ angegeben. Typischerweise liegen die Eltern-Kind-Korrelationen darunter ($r = 0,1 - 0,3$) (Friedlander et al. 1988; Bouchard et al. 1993). Mehr als 75% der Variation sind durch genetische Faktoren erklärbar. Segregationsanalysen weisen auf das Vorhandensein eines rezessiven Faktors hin (Moll et al. 1991; Esposito-Del Puente et al. 1994; Rice et al. 1999; Katzmarzyk et al. 2000). Um einen genetischen Effekt zu beweisen, können für die Untersuchungen entweder extrem diskordante oder extrem konkordante Geschwisterpaare untersucht werden. Es hat sich gezeigt, dass eine geringere Stichprobengröße bei Durchführung des konkordanten Ansatzes notwendig ist (Ziegler et al.

1998). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Familienstudien etwa 30-70% der phänotypischen Variation vererbbarer Faktoren attribuieren. 30-70% der phänotypischen intrafamiliären Unterschiede scheinen durch umweltbedingte Einflüsse erklärbar (Hebebrand et al. 1995; Echwald 1999). Eine Übersicht über epidemiologische Studien liefern Perusse et al. (Perusse 2000).

1.2.4 Syndromale Formen der Adipositas

Einige insgesamt selten auftretende Krankheiten sind regelmäßig mit Adipositas vergesellschaftet. Hierzu zählen autosomal oder X-chromosomal vererbte Syndrome wie beispielsweise das Prader-Willi-Syndrom, Bardet-Biedl-Syndrom, Cohen-Syndrom oder Borjeson-Forssman-Lehman-Syndrom (Chagnon et al. 2000). Eine Liste der Syndrome und ihrer chromosomalen Loci kann in der OMIM-Datenbank (OMIM #601665) abgefragt werden (McKusick 2000). Allerdings konnte noch kein Zusammenhang zwischen normaler Adipositas und den chromosomalen Loci adipositas-vergesellschafteter Syndrome hergestellt werden. Auch die ursächlichen Gene konnten noch nicht identifiziert werden (Reed et al. 1995; Barsh et al. 2000). Auffallend ist das stets wiederkehrende Zusammenkommen von geistiger Retardierung und Adipositas im Rahmen dieser Syndrome, welches für eine herausragende Rolle des ZNS bei der Regulation des Körpergewichtes, der Sättigung und des Energieverbrauches spricht.

1.2.5 Gen-Umwelt-Interaktion und Kopplungsstudien

Sowohl Roberts et al. (Roberts et al. 1988) als auch Ravussin et al. (Ravussin et al. 1988; Ravussin et al. 2000) konnten zeigen, dass ein geringer Energieverbrauch einen Risikofaktor für das Auftreten der Adipositas darstellt. Roberts et al. führten eine Studie an Säuglingen (Alter bis 1 Jahr) durch. Im Alter von 3 Monaten wurden über sieben Tage der Gesamtenergieverbrauch und die aufgenommene metabolisierbare Nahrungsenergie bestimmt, sowie mit 0,1 und 3 Monaten die postprandiale Stoffwechselgeschwindigkeit gemessen. Die Ergebnisse wurden dann auf die Gewichtszunahme im ersten Lebensjahr bezogen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kindern, die im Laufe des Jahres übergewichtig wurden (50% der Kinder übergewichtiger

Mütter) und denen, die nicht übergewichtig wurden festgestellt werden. Der totale Energieverbrauch im Alter von drei Monaten jedoch war bei den übergewichtigen Kindern 20,7% niedriger als in der Vergleichsgruppe. Ravussin et al. konnten in ihrer 2-Jahres-Follow-Up-Untersuchung an amerikanischen Indianern zeigen, dass der Energieverbrauch mit dem Tempo der Gewichtsänderung korreliert. In der gleichen Studie wurde an 94 Blutsverwandten aus 36 Familien nachgewiesen, dass der 24h-Energieverbrauch innerhalb der Familien aggregiert. Diese Studien zeigen einen Einfluss genetisch regulierter Mechanismen bei deren gleichzeitiger Beeinflussung durch eine Gen-Umwelt-Interaktion.

Einen weiteren Hinweis auf die Vererbarkeit der Adipositas fanden Hasstedt et al. (Hasstedt et al. 1989): es wurde ein Fettverteilungsindex (RFPI, relative-fat-pattern-index) definiert, der das Verhältnis von subskapulärer Hautfaltendicke zu der Summe aus subskapulärer und suprailiakaler Hautfaltendicke angibt. Eine nun durchgeführte Kopplungsanalyse wies auf die Existenz eines rezessiven Alleles (Frequenz 46%) hin, welches wenn es homozygot auftrat, den mittleren RFPI von 0,412 auf 0,533 anhob. Die Varianz des RFPI wurde zu 42,3% mit der Existenz eines Hauptgenlocus, zu 9,5% mit polygener Vererbung und zu 48,2% mit zufälligen Umwelteinflüssen erklärt.

1.2.6 Tiermodelle

Im Tiermodell werden sowohl der genetische Hintergrund als auch die Umwelt möglichst exakt kontrolliert, wodurch Schwierigkeiten, die bei der genetischen Analyse menschlicher Adipositas entstehen, minimiert werden. Erkenntnisse über Mechanismen der Gewichtsregulation beim Menschen konnten durch die Klonierung von Mausgenen gewonnen werden, deren Mutationen für einige monogene Adipositas-Formen der Maus ursächlich sind. Diese Mutationen kennt man zum Teil bereits seit vielen Jahrzehnten als *obese*, *diabetes*, *fat*, *tubby*, *mahogany* und *agouti* (Hinney et al. 1997; Echwald 1999). Die größte Berühmtheit hat hierbei die *obese*-Maus erlangt. Die Klonierung des *obese*-Genes durch Zhang et al. (Zhang et al. 1994) hat zur Entdeckung des Leptins als wichtigem Bestandteil eines Gewichtsregelkreises geführt (siehe auch Tabelle 2 und "Regulation des Körpergewichtes"). Die Frage, ob Forschungen am

Tiermodell generell auf den Menschen übertragbar sind, bleibt zum Teil noch unbeantwortet. Für oben genannte Mutationen konnten allerdings deutliche Entsprechungen beim Menschen gefunden werden: Vor allem *leptin*, *leptin receptor*, *carboxypeptidase E* (Barsh et al. 2000; Rankinen et al. 2002). Siehe hierzu auch Tabelle 2 und Tabelle 3. Somit stellt das Tiermodell eine wichtige Erkenntnisquelle der Adipositasforschung dar.

1.3 Genetische Komponenten der Adipositasentstehung

Mit der Klonierung des Leptin-Genes hat die molekulargenetische Adipositasforschung neuen Auftrieb bekommen. Es wurden große wissenschaftliche Anstrengungen unternommen, die Systeme für Hunger und Gewichtsregulation zu verstehen. Den wenigen bereits entdeckten monogenen Formen der Adipositas beim Menschen steht die -weitaus häufigere- polygene Form gegenüber. Bei den monogenen Formen verursacht eine Mutation innerhalb eines Genes den adipösen Phänotyp. Bei der polygenen Form tragen viele Genloci als Quantitative Trait Loci (QTL) zu einer quantitativen, kontinuierlichen Ausprägung des Phänotypes bei. Die aktuellen Befunde werden zur Zeit jährlich in Form der "Human Obesity Gene Map" zusammen gestellt und sind online verfügbar (Rankinen et al. 2002).

1.3.1 Monogene Formen der Adipositas beim Menschen

Verschiedene klinische Beobachtungen am Menschen, wie z. B. rote Haarfarbe, primäre Amenorrhö und endokrinologische Auffälligkeiten wie veränderte Serum-Leptin-Spiegel oder mangelnde ACTH-Ausschüttung stellen eine Analogie zu Beobachtungen an der Maus dar. Dies führte zur Untersuchung der entsprechenden Kandidatengene am Menschen. Extrem seltene Mutationen in den für Leptin (Montague et al. 1997), Leptin-Rezeptor (Clement et al. 1998), Prohormon Convertase 1 (Jackson et al. 1997) und Pro-Opio-Melanocortin (Krude et al. 1998) codierenden Genen führen bei einer rezessiven Vererbung zu früh einsetzender massiver Adipositas, die mit Hyperphagie einhergeht. Ebenso führen Mutationen im *Single-minded (drosophila) homolog 1* zu Adipositas (Holder et al. 2000). Etwa im gleichen Zeitraum wurden die ersten autosomal dominanten Formen der Adipositas beschrieben (Vaisse et al.

1998; Yeo et al. 1998; Hinney et al. 1999; Sina et al. 1999; Dubern et al. 2001; Mergen et al. 2001). Allerdings kann bei diesen Mutationen, im Gegensatz zu den weiter oben genannten, außer der massiven Adipositas keine andere phänotypische Veränderung gefunden werden. Hier scheint es sich um relativ häufigere Mutationen zu handeln.

Clement et al. (Clement et al. 1996) untersuchten das menschliche Homolog 7q31.3 des Maus ob Locus mittels acht diese Region überspannenden Mikrosatelliten-Markern an 101 adipösen französischen Familien. Der konkordante Geschwisterpaaransatz (BMI > 35 kg/m²) ergab Hinweise auf Kopplung zu drei 2 cM nahe des OB-Genes gelegenen Markern. In einer ähnlichen Untersuchung genotypisierten Reed und Mitarbeitern (Reed et al. 1996) Geschwister aus 78 Familien. Auch sie verwendeten das OB-Gen flankierende Marker. Extrem adipöse Geschwisterpaare (BMI > 40 kg/m², n = 59) wiesen überzufällig häufig gleiche IBD-Haplotypen auf (p = 0,04). Außerdem wurde auf einen Haplotyp hingewiesen, der häufiger von heterozygoten Eltern auf extrem adipöse Kinder weitergegeben wurde, als ohne Vorliegen eines Allel-Ungleichgewichtes zu erwarten gewesen wäre (p = 0,027). Eine mögliche Erklärung dieser Erkenntnisse besteht in dem Vorhandensein von Allelvarianten innerhalb des OB-Genes, über die die extrem adipösen Individuen verfügen. Sich dem Genprodukt des OB-Genes zuwendend stellten Carlsson et al. (Carlsson et al. 1997) im Rahmen von mRNA-Expressionsstudien fest, dass Defekte des OB-Genes bei der menschlichen Adipositas nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Eine Zusammenstellung monogener Formen der Adipositas beim Menschen zeigt Tabelle 2. Für eine vollständige Übersicht siehe Rankinen et al. (Rankinen et al. 2002).

Monogene Formen der Adipositas beim Menschen
(Barsh et al. 2000; Rankinen et al. 2002)

Genort	betroffenes Gen	Veränderung auf DNA-Ebene	beim Menschen nachgewiesen
1p31 (4, <i>diabetes</i>)	Leptin-Rezeptor (LEPR)	Basentausch	(Clement et al. 1998)
2p23.3	Pro-Opio-Melanocortin (POMC)	Basentausch, Deletion	(Krude et al. 1998)
3p25	PPAR γ 2	Missense Mutation	(Ristow et al. 1998)
5q15-q21	Proprotein Convertase 1 (PCSK1)	Basentausch	(Jackson et al. 1997)
6q16.3-q21	Single-minded homolog 1 (SIM1)	Basentausch	(Holder et al. 2000)
7q31.3 (6, <i>obese</i>)	Leptin (LEP)	Deletion, Basentausch	(Montague et al. 1997; Strobel et al. 1998; Ozata et al. 1999)
18q22	Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)	Deletionen, Insertionen, Basentausch	(Vaisse et al. 1998; Yeo et al. 1998; Gu et al. 1999; Hinney et al. 1999; Sina et al. 1999; Farooqi et al. 2000; Vaisse et al. 2000; Dubern et al. 2001; Mergen et al. 2001)

Tabelle 2

Monogene Formen der Adipositas bei der Maus (Knockout-Mäuse)
(Barsh et al. 2000; Rankinen et al. 2002)

Genort	betroffenes Gen	Auswirkung	beim Menschen nachgewiesen
1p12-11	Nescient helix-loop-helix 2 (Nhlh2)	Verlust der Funktion	-
4q32 (8, <i>fat</i>)	Carboxypeptidase E (CPE)	Verlust der Funktion	-
11p15.5 (7, <i>tubby</i>)	Phosphodiesterase (TUB)	Verlust der Funktion	-
20p13 (2, <i>mahogany</i>)	Attraktin (ATRN)	Verlust der Funktion	-
20q11.2-q12 (2, <i>agouti</i>)	parakrines Signalpeptid (Ay)	ektopy Expression	-
Xq24 (X)	Serotonin-2c-Rezeptor (5HT2cR)	Verlust der Funktion	-

Tabelle 3

1.3.2 Polygene Formen der Adipositas

Zum Auffinden von Genorten, die an der Gewichtsregulation beteiligt sind existieren verschiedene Ansätze:

- Vergleich äquivalenter Regionen, die durch QTL beim Tier identifiziert wurden
- Suche nach Kandidatengenen
- Suche unbekannter Gene mittels Genomscreens

Alle diese Ansätze können prinzipiell auch zum Auffinden einer monogenen Form der Adipositas dienen. Meist führen sie jedoch zur Identifizierung eines Genortes, der das Körpergewicht quantitativ beeinflusst.

Quantitative Trait Loci (QTL)

Mit Hilfe von Tierexperimenten konnten über 165 chromosomale Loci (QTL, quantitative trait locus) aufgezeigt werden, die für polygene Formen der Adipositas verantwortlich sind. Für sie konnte größtenteils eine Entsprechung im menschlichen Genom gefunden werden. In weiteren Schritten sind eine Reihe von Kandidatengenen, die in den entsprechenden QTL beim Menschen gefunden werden konnten, auf ihre Bedeutung für die Adipositas analysiert worden (Rankinen et al. 2002).

Kandidatengene

Unter Kandidatengenen sind Gene zu verstehen, deren von der Norm abweichende Funktion zur Entstehung von Adipositas beitragen könnte. Demzufolge haben sie meist einen bewiesenen oder vermuteten Einfluss auf Nahrungsaufnahme, Energiezufuhr und -verbrauch. Eine Assoziationsstudie kann einen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus in einem Kandidatengen und einem Phänotyp feststellen, sobald ein Gen durch endokrinologische oder andere Untersuchungen als Verursacher der Adipositas plausibel erscheint. Von 182 Assoziationsstudien zeigten 174 signifikante, jedoch zum Teil sich widersprechende Assoziationen (Rankinen et al. 2002). Dies ist darauf zurückzuführen, dass nicht alle der 58 untersuchten Kandidatengene einen großen

phänotypischen Effekt haben oder relevante physiologische Systeme betreffen (Barsh et al. 2000). Eine Übersicht über relevante Kandidatengene liefern Rankinen et al. (Rankinen et al. 2002).

Genomscreen

Das Ziel des Genomscreens liegt darin, komplexen Phänotypen einen bzw. mehrere chromosomale Bereiche zuzuordnen. In der Basenabfolge eines solchen Bereiches werden Variationen in codierenden oder nicht codierenden (z.B. Promotoren) Abschnitten für ein den Phänotyp mitbestimmendes Gen erwartet. Demzufolge stellt ein Genomscreen nur einen ersten Schritt auf dem Weg zur Entdeckung eines noch unbekanntes Genes dar. Dabei sind viele der am Anfang des 20. Jahrhunderts von Morgan (Morgan 1911) und Sturtevant (Sturtevant 1913) beschriebenen Phänomene wie Rekombination und Kopplung erst durch den Einsatz moderner Computer in ihrer ganzen Breite zu analysieren. Diese Ansätze sind vielversprechend, da sie systematisch durchgeführt werden können, ohne irgendein Modell zugrunde legen zu müssen. Bereits an kleinen Studiengruppen konnten positive Kopplungsbefunde entdeckt werden (Clement et al. 1996).

Neun bisher publizierte Genomscreens, die Adipositas oder Adipositas-assoziierte Phänotypen wie den BMI, Leptinspiegel oder die prozentuale Fettmasse untersuchten, konnten insgesamt 33 chromosomale Regionen identifizieren (siehe Tabelle 4). Dabei wurden zum Teil die gleichen Studiengruppen hinsichtlich verschiedener Phänotypen untersucht. Einige Kopplungsbefunde konnten inzwischen bestätigt werden. Die folgenden Loci wurden von mindestens zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gefunden: **1p31** (Norman et al. 1998; van der Kallen et al. 2000), **2p21** (Comuzzie et al. 1997; Hager et al. 1998), **10p** (Hager et al. 1998; Hinney et al. 2000; Hsueh et al. 2001; Price et al. 2001), **7q31** (Hsueh et al. 2001; Perusse et al. 2001), **11q** (Norman et al. 1997; Hanson et al. 1998; Norman et al. 1998), **18q21** (Norman et al. 1998; Ohman et al. 2000) und **20q13** (Lembertas et al. 1997; Lee et al. 1999).

Aus den Analysen von Norman et al. (Norman et al. 1997) an Pima Indianern konnten Kandidatenregionen auf den Chromosomen 11q21-q22 und 3p24.2-

p22 identifiziert werden. Hierbei wurde der Körperfettgehalt zur Untersuchung herangezogen. Keiner der Marker erreichte einen MLS-LOD-Score $> 3,0$. Signifikante LOD-Scores für genomweite Kopplung liegen abhängig vom Studiendesign im Bereich von 3,3 - 4,0 (Lander et al. 1995). Hanson et al. (Hanson et al. 1998) konnten mit einem MLS-LOD-Score von 3,57 Kopplung zum Phänotyp Adipositas aufzeigen, ohne die Region (Chromosom 11q) jedoch weiter einzugrenzen. Da beide Untersuchungen an einer speziellen Population, den Pima-Indianern, durchgeführt wurden, kommt den Untersuchungen von Lee et al. (Lee et al. 1999) und Hager et al. (Hager et al. 1998) große Bedeutung zu. Beide führten ihre Studien an amerikanischen (Lee) und französischen (Hager) Familien durch, die über extreme Adipositas rekrutiert wurden. Lee et al. konnten für den Phänotyp BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$ die Region 20q13 mit einem LOD-Score von 3,17 und Hager et al. die Region 10p (*D10S197*) mit einem Multipoint-LOD-Score von 4,85 identifizieren. Lumbert et al. (Lumbert et al. 1997) untersuchten eine 52cM-Region ebenfalls auf 20q (20p12 - 20q13.3) an insgesamt 258 französischen Geschwisterpaaren. Sie fanden Hinweise auf Kopplung zum Körperfettgehalt, BMI und Nüchtern-Glucosespiegel auf 20q. Zwei weitere Loci auf den Chromosomen 5q und 2p ergaben Hinweise auf Kopplung zu Serum-Leptin-Spiegeln. Der gefundene Bereich auf Chromosom 2 deckt sich mit einer Region, die vorher von Comuzzie et al. (Comuzzie et al. 1997) als gekoppelt an Leptin-Spiegel und Fettmasse einer mexikanisch-amerikanischen Bevölkerung beschrieben worden war. Genau dort liegt auch der POMC-Gen-Locus für den von Krude et al. (Krude et al. 1998) Mutationen bei übergewichtigen Menschen gefunden wurden. Die Region auf Chromosom 10p12 konnten Hinney et al. (Hinney et al. 2000) im Rahmen ihrer Untersuchung bestätigen, so dass dort die Existenz eines bislang unbekanntes Adipositas-Genes angenommen werden kann.

Der Locus auf Chromosom 10p könnte für 21-36 % der Fettleibigkeit in der von Hager et al. untersuchten Studiengruppe verantwortlich sein (Hager et al. 1998). Hager et al. untersuchten 514 Personen aus 158 Kernfamilien. Die Familien wurden über einen Index-Probanden mit einem BMI $> 40 \text{ kg/m}^2$ und mindestens ein leibliches Geschwisterkind mit einem BMI $> 27 \text{ kg/m}^2$ rekrutiert. Die Genotypisierung erfolgte mit 380 Mikrosatellitenmarkern, was einem

durchschnittlichen Markerabstand von $9,1 \pm 2,5$ cM entspricht. Die modellfreie Multipoint-Kopplungsanalyse führte zur Identifizierung von neun Regionen mit zumindest einem Hinweis auf Kopplung ($MLS > 1,0$) zur Adipositas (BMI). Lediglich eine Region auf Chromosom 10p12 zeigte einen Beweis für Kopplung in einem genomweiten Kontext ($MLS > 4,85$). Die Ränder des Peaks (definiert bei $MLS > 1,0$) lagen bei *D10S548* und *D10S208* und umfassen einen genomischen Bereich von etwa 15 cM. Bei den Markern *D10S197* und *D10S611*, welche weniger als 4 cM auseinanderliegen, fanden sich die höchsten MLS-Werte. Einen höheren Wert als 4,85 wurde in 100 von Hager et al. simulierten Genom-Scans lediglich ein einziges Mal gefunden.

In der Arbeit von Hinney et al. (Hinney et al. 2000) wurden 386 Personen aus 93 Familien für 11 Marker genotypisiert. Die Familien wurden über einen Index-Probanden mit einem BMI $> 95.$ Perzentile und mindestens einem leiblichen Geschwisterkind mit einem BMI $> 90.$ Perzentile rekrutiert. Die Marker lagen inner- und außerhalb der von Hager et al. beschriebenen Region und umfassten 23 cM. Der durchschnittliche Markerabstand betrug 2,23 cM (0,03 - 4,7 cM). Beim Marker *TCF8* fand sich der höchste MLS von 2,32 (Adipositas, BMI), was bezogen auf die Größe der Region (23 cM) nach Lander et al. (Lander et al. 1995) als Beweis für Kopplung anzusehen ist. *TCF8* liegt etwas mehr zentromerwärts, als der bei Hager et al. den höchsten Peak liefernde Marker *D10S197* (vergleiche Abbildung 3).

In einer sich ebenfalls auf die von Hager et al. gefunden Region konzentrierenden Untersuchung von Price et al. konnten ebenfalls Hinweise auf Kopplung zum Phänotyp Adipositas ($BMI \geq 27$ kg/m²) gefunden werden. Insgesamt 1074 Personen (862 Personen aus 170 kaukasischen sowie 212 aus 43 afrikanischen Familien, Index BMI ≥ 40 kg/m², mind. ein Geschwister BMI ≥ 30 kg/m²) wurden mit 13 Markern, davon 4 auf 10p, genotypisiert. Auch hier konnte ein Peak bei *D10S197* gefunden werden (LOD = 2,55 bzw. LOD = 1,83 für die kaukasische Kohorte) (Price et al. 2001).

In einem kürzlich durchgeführten Genomscreen konnten Hsueh et al. an einer Amish-Gruppe bestehend aus 672 Personen einen weiteren Kopplungsbefund zum Phänotyp BMI-bezogene Leptinspiegel auf Chromosom 10p ermitteln. Der

gefundene Peak bei *D10S220* (LOD = 2,73) liegt ungefähr 21 cM von dem von Hager et al. und 19 cM von dem von Hinney et al. ermittelten Lokus entfernt (Hsueh et al. 2001).

Diese mehrfache Bestätigung des Kopplungsbefundes auf Chromosom 10 macht zur weiteren Eingrenzung der chromosomalen Region die in dieser Dissertation durchgeführte Feinkartierung sinnvoll. Abbildung 3 liefert eine grafische Übersicht der bisher von verschiedenen Arbeitsgruppen erhobenen Befunde.

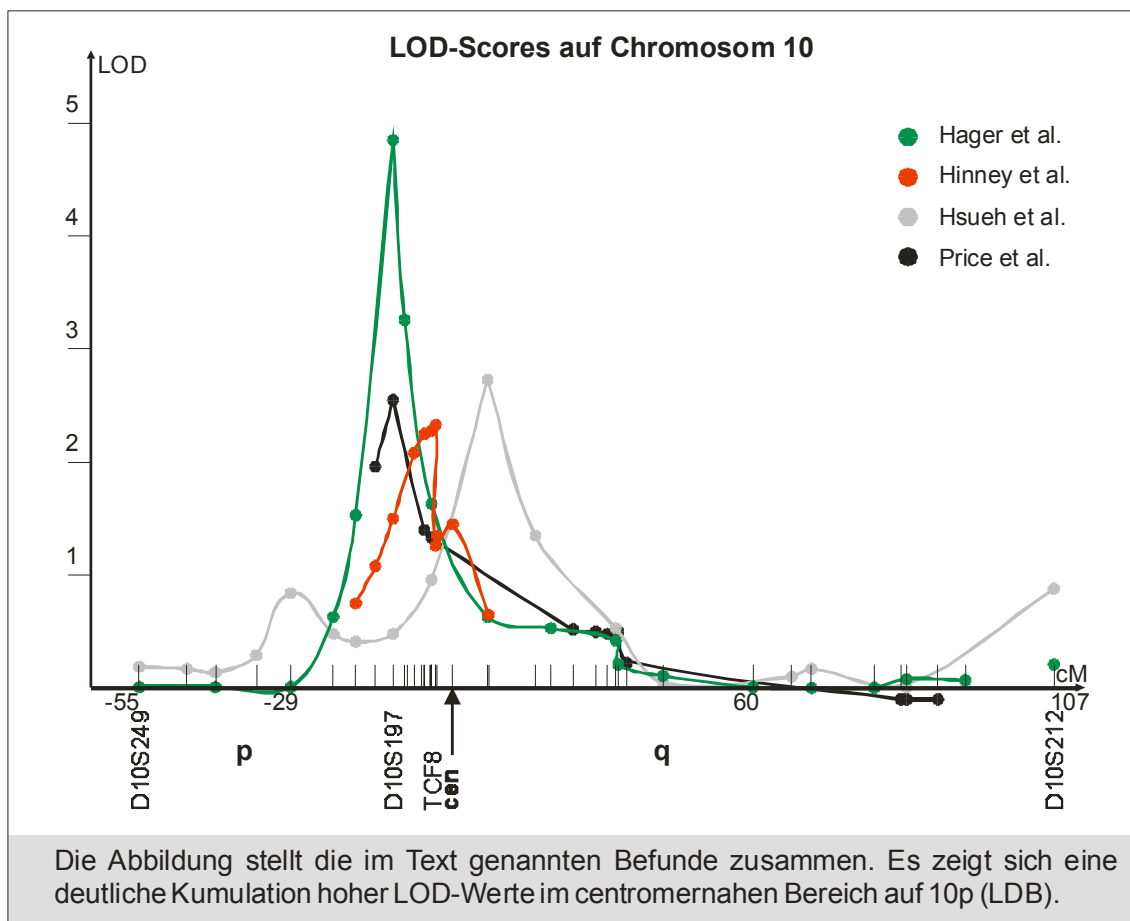


Abbildung 3

Eine Zusammenstellung von chromosomalen Regionen, die mittels Genomscreens identifiziert werden konnten zeigt Tabelle 4. Die unterschiedlichen Rekrutierungsschemata bzw. die untersuchte Studiengruppe, sowie der betrachtete Phänotyp sind ebenso aufgelistet, wie die sich in den QTL befindlichen Kandidatengene.

Übersicht mittels Genomscreens bzw. Kopplungsanalysen ermittelter chromosomaler Regionen
zum Phänotyp Adipositas und abhängiger Phänotypen (nach Rankinen et al. 2002).

Region	Marker	LOD, p	Phänotyp	Untersuchte Studiengruppe	Literatur
2p21	D2S1788	4,95 MLS	Leptin, Fettmasse	458 Amerikaner aus 10 Familien aus der "San Antonio Family Heart Study" Kandidatengene: GCKR, POMC	(Comuzzie et al. 1997)
8q11.1	D8S1110	2,2 LOD	Leptin		
20p12- 20q13.3	PLC1 ADA D20S17 D20S120 MC3R	0,013 0,0079 0,0078 0,004 0,037	%Fett, Fettmasse	650 Mitglieder aus 152 kanadischen Familien, rekrutiert aus der Quebec Family Study Kandidatengene: ADA, PLC1, MC3R	(Lembertas et al. 1997)
3p24.2-p22 11q22	D3S2432 D11S2366, 2000	2,0 MLS 2,8 MLS	%Körperfett	283 Pima-Indianer aus 88 Familien NIDDM und Adipositas rekrutiert	(Norman et al. 1997)
2p22-p21 5p11 6p 10p12.3 10p Xp	D2S165, 367 D5S426 D6S344 D10S197 D10S611 DXS1226	2,4<MLS<2,7 2,93 MLS 2,40 MLS 4,85 MLS 4,85 MLS 2,42 MLS	Leptin Leptin BMI, Adipositas BMI, Adipositas BMI, Adipositas BMI, Adipositas	514 Mitglieder aus 158 französischen Familien, rekrutiert durch einen extrem adipösen Index-Patienten Kandidatengen: POMC	(Hager et al. 1998)
11q	D11S4464	3,57 MLS	BMI	966 Mitglieder aus 264 Pima-Indianer-Familien, informativ für NIDDM und Adipositas, Alter > 15 Jahre	(Hanson et al. 1998)

Region	Marker	LOD, p	Phänotyp	Untersuchte Studiengruppe	Literatur
1p31-p21 11q22 11q23 18q21 20q11.2	D1S550 D11S2366 D11S976 D18S877 D20S601	2,8 LOD 2,1 LOD 2,0 LOD 2,3 LOD 3,0 LOD	24h RQ % Körperfett 24h EE % Körperfett 24h RQ	451 Mitglieder aus 126 Pima-Indianer-Familien, informativ für NIDDM und Adipositas Kandidatengene: LEPR, ASIP	(Norman et al. 1998)
20q13 20q13 20q13 10q 10q	D20S476 D20S211 D20S149 D10S1211 D10S537	3.17 LOD 3.16 LOD 1.52 LOD 0.0081 0.0074	BMI ≥ 30 BMI ≥ 30 BMI ≥ 30 BMI ≥ 30 BMI ≥ 30	513 Mitglieder aus 92 amerikanischen Familien, rekrutiert durch extreme Adipositas Kandidatengene: ASIP, CEBPB, GNAS1	(Lee et al. 1999)
7p15.3 15q25-q26 18q12	D7S1808 IGF1R, D15S652, D15S657 D18S877, 535	2,7 LOD 2,0<LOD<3,6 3,6 LOD	fettfreies KG fettfreies KG fettfreies KG	336 Personen	(Chagnon et al. 2000)
10p12	D10S204, 193, 1781, TCF8	1,1<LOD<2,5	BMI, Adipositas	386 Personen aus 93 Familien	(Hinney et al. 2000)
Xq24 18q21	DXS6804 D18S1155	3,14 MLS 2,42 MLS	BMI	188 Mitglieder aus 87 finnischen Familien, rekrutiert über BMI ≥ 32 Kandidatengene: 5HT2C, MC4R	(Ohman et al. 2000)
1p31 10q-ter	D1S1665 AFM198ZB	3,4 LOD 3,3 LOD	Leptin BMI	198 Personen aus 18 Stammbäumen mit FCH Kandidatengen: LEPR	(van der Kallen et al. 2000)
3q21 13q11	D3S1768 D13S175-221	3,4 LOD 3,3 LOD	BMI BMI	580 finnische Familien (Diabetiker)	(Watanabe et al. 2000)
10p12	D10S197	2,55 LOD	BMI	1074 Personen aus 212 Familien	(Price et al. 2001)

Region	Marker	LOD, p	Phänotyp	Untersuchte Studiengruppe	Literatur
1p11.2	D1S534	2,3 LOD	abdom. sc. Fett	521 Personen aus 156 Familien	(Perusse et al. 2001)
4p15.1	D4S2397	2,3 LOD	abdom. sc. Fett		
4p32.1	D4S2417	1,8 LOD	abdom. sc. Fett		
7q31.1	D7S1875	2,0 LOD	abdom. sc. Fett		
9q22.1	D9S1122, 257	2,1<LOD<2,4	abdom. sc. Fett		
12q22-q23	IGF1	1,9 LOD	abdom. sc. Fett		
12q24.3	D12S2078, 1045	1,5<LOD<2,9	abdom. sc. Fett		
13q34	D13S285	1,9 LOD	abdom. sc. Fett		
17q21	D17S2180, 1290, 1301	1,5<LOD<2,2	abdom. sc. Fett		
8q23.3	D8S556	2,0 LOD	BMI	521 Personen aus 99 Familien	(Chagnon et al. 2001)
9q34.3	D9S158	2,3 LOD	BMI		
14q11-q11.2	D14S283, 742, 1280	1,7<LOD<2,4	BMI, KG, fettfr. KG		
19p13	LDL	p = 0,0009	Leptin		
3p25.2	D3S3608	1,6 LOD	% Körperfett	672 Personen aus 28 erweiterten Stammbäumen der Old Order Amish mit Diabetes Mellitus Typ 2	(Hsueh et al. 2001)
7q31-q36	D7S640, 636	1,9 LOD	Leptin (BMI)		
10p12-p11	D10S220	2,7 LOD	Leptin (BMI)		
14q22-q31	D14S276	1,8 LOD	Hüftumfang		
	D14S74, 280	2,5 LOD	Leptin (BMI)		
16p	D16S510	1,7 LOD	Leptin (BMI)		

Tabelle 4

Bedeutung der Abkürzungen: siehe Anhang

1.4 Biologische Grundlagen zur Kopplung

Die oben dargestellten Erkenntnisse wären ohne ein genaues Wissen um biologische Vorgänge auf zellulärer Ebene nicht zu erheben gewesen. Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über biologische und statistische Grundlagen zur Durchführung von Kopplungsuntersuchungen.

1.4.1 Rekombination und genetische Kopplung

Wenn bei fortschreitender Meiose (Reifeteilung) sich die homologen Chromosomen voneinander entfernen, bleiben sie an wenigen Stellen, den Chiasmata, miteinander verbunden. An diesen Stellen findet das „Crossing Over“ statt. Beim Crossing Over wird Erbmaterial zwischen mütterlichen und väterlichen Chromatiden ausgetauscht. Diese Bildung neuer Genkombinationen aus genetisch verschiedenen Genomen wird Rekombination genannt (Koecke et al. 2000). Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines zweiten Chiasmas in der Nähe eines bereits vorhandenen Chiasma ist kleiner, als bei rein zufälliger Verteilung über das Chromosom zu erwarten wäre (Chiasma Interferenz) (Strachan et al. 1999). Da es dabei zu Unterbrechungen in der DNA kommt, können vorher benachbarte Loci nach dem Crossing Over getrennt sein. Dies ist umso wahrscheinlicher, je weiter die beiden Loci voneinander entfernt sind. Für die durchschnittliche Anzahl der Crossing Over zwischen zwei Loci wurde von Morgan der Begriff genetische Distanz geprägt (Morgan 1911; Strachan et al. 1999).

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei benachbarte Genloci durch ein Crossing Over voneinander getrennt werden, wird als Rekombinationswahrscheinlichkeit (θ) bezeichnet. Die Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen zwei Loci an entgegengesetzten Enden des Chromosoms beträgt höchstens 50% ($\theta = 0,5$) (Ott 1999; Strachan et al. 1999).

Werden zwei Genloci unabhängig voneinander vererbt, sollten Rekombinanten und Nicht-Rekombinanten im gleichen Verhältnis unter den Nachkommen zu finden sein. Loci in unmittelbarer Nähe zueinander werden jedoch seltener durch ein Rekombinationsereignis getrennt und das Verhältnis von rekombi-

nanten und nicht-rekombinanten Nachkommen weicht von 1:1 ab. Dieses Phänomen wird genetische Kopplung genannt ($\theta < 0,5$) (Strachan et al. 1999).

1.4.2 Genetische Kartierung

Das von Morgan entwickelte Konzept der Messung einer genetischen Distanz zweier Loci über die Bestimmung der Rekombinationswahrscheinlichkeit wurde schnell erweitert. Nur wenn sichergestellt werden kann, dass lediglich ein Crossing Over zwischen zwei Loci auftritt, entspricht eine genetische Distanz x der Rekombinationswahrscheinlichkeit θ . In diesem Fall lautet die Kartenfunktion:

$$x = \Theta$$

Die Distanz zwischen weiter entfernten Loci berechnet sich in diesem Fall aus der Summe der Einzelintervalle (Sturtevant 1913; Morgan 1928). Liegen mehrere Chiasmata zwischen den Loci sind die Distanzen nicht länger additiv. Denn die beobachtete Rekombinationswahrscheinlichkeit ist in diesem Fall kleiner als die Summe der einzelnen Werte zweier benachbarter Loci. Haldane beschrieb dieses Phänomen mit folgender Formel (Haldane 1919):

$$x = -0,5 \cdot \ln(1 - 2\Theta)$$

Neben der Haldane-Funktion wurden noch zahlreiche andere Funktionen entwickelt, von denen die Kosambi-Funktion große Verbreitung gefunden hat (Kosambi 1944):

$$x = 0,5 \cdot \tanh^{-1}(2\Theta) = \frac{1}{4} \cdot \ln\left(\frac{1 + 2\Theta}{1 - 2\Theta}\right)$$

Diese verschiedenen Funktionen entstehen aus verschiedenen Beschreibungen der Chiasma-Interferenz. Mit anderen Worten: die Wahrscheinlichkeit, dass in der Nähe eines Chiasma ein weiteres entsteht, wird durch jede dieser Funktionen in anderer Weise berücksichtigt. Dabei stellt die Morgan-Funktion einen Extremfall dar. Sie geht von kompletter Interferenz aus, d. h. die Entstehungswahrscheinlichkeit eines weiteren Chiasma ist gleich Null. Eine Übersicht liefert Ott (Ott 1999).

1.5 Statistische Grundlagen

Der Kopplungsuntersuchung liegt unter Verwendung oben genannter Grundlagen eine komplizierte Teststatistik zugrunde, die im folgenden erläutert wird.

1.5.1 Modellfreie Kopplungsanalyse qualitativer Phänotypen

Es wurde eine modellfreie Kopplungsanalyse durchgeführt. Dies bedeutet, dass zu dem zu untersuchenden Phänotyp Adipositas kein spezieller Vererbungsmechanismus angenommen wurde. Durch die Dichotomisierung des Phänotyps Adipositas konnte weiterhin statt einer quantitativen eine qualitative Untersuchung durchgeführt werden. Eine Dichotomisierung wird mittels zweier Kriterien erreicht: Der Phänotyp gilt als vorhanden, wenn eine bestimmte BMI-Perzentile (Kriterium 1, 90. Perzentile) von mindestens zwei leiblichen Geschwistern (Kriterium 2) erreicht ist. Die modellfreie Kopplungsanalyse für qualitative Phänotypen hat eine lange Tradition. Die erste Arbeit hierzu stammt von Penrose (Penrose 1935). Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl verschiedener statistischer Tests vorgeschlagen, die alle das Prinzip der Ähnlichkeit verwenden (Ziegler 1999). "Prinzip der Ähnlichkeit" bedeutet, dass im Fall von Kopplung eine genetische Ähnlichkeit zwischen Geschwistern erwartet wird, weil sie sich auch phänotypisch ähneln.

Identical By Descent (IBD)

In den im Labor gewonnenen Daten achtet man darauf, wie häufig ein betroffenes Geschwisterpaar die gleichen Kopien elterlicher (Marker-)Allele geerbt hat. Ist sichergestellt, dass ein bei beiden Geschwistern vorhandenes Allel jeweils eine Kopie desselben elterlichen Alleles ist, spricht man von "Identical By Descent" (IBD) (Fishman et al. 1978). Dabei werden drei Fälle unterschieden:

IBD 0: Kein Allel der Nachkommen ist eine Kopie desselben elterlichen Allels.

IBD 1: Ein Allel ist eine Kopie desselben Allels.

IBD 2: Beide Allele sind Kopien derselben Allele.

Wenn nun jeder der verwendeten Marker nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wird, so werden bei den Nachkommen obige IBD-Werte im Verhältnis

1:2:1 vorkommen (H_0). Befindet sich der Marker jedoch in der Nähe eines den Phänotyp relevant beeinflussenden Genes, dann wird bei einem oder beiden Elternteilen ein bestimmtes Marker-Allel womöglich mit dem den Phänotyp auslösenden Allel gekoppelt und demzufolge bevorzugt an beide Kinder vererbt. Liegt also Kopplung vor, wird eine abweichende Verteilung zu höheren IBD-Werten erwartet (H_1). Es existieren zahlreiche Testverfahren, um auf das Vorhandensein und die Signifikanz einer Abweichung vom 1:2:1 - Verhältnis zu testen. Als Beispiel sei der Transmissions-Disequilibriums-Test (TDT) genannt. Beruhend auf einer χ^2 -Teststatistik werden die Anzahl aller von den heterozygoten Eltern an die Kinder weitergegebenen Allele (transmittierte Allele) mit der Anzahl der nicht weitergegebenen Allele verglichen (Spielman et al. 1993). Eine Vorstellung der in dieser Arbeit benutzten Testverfahren erfolgt im Methodenteil.

2 Ziel der Arbeit

Die von den Arbeitsgruppen Hager und Hebebrand identifizierte Kopplungsregion auf Chromosom 10 sollte feinkartiert, d.h. die Vorbefunde auf eine kleinere chromosomale Region eingegrenzt, werden. Dazu wurden an einem erweiterten Kollektiv weitere Genotypisierungen vorgenommen. Es erfolgt eine Kopplungsanalyse einerseits und die Testung auf ein Transmissionsungleichgewicht andererseits. Es wurden sieben Mikrosatelliten-Marker (*D10S1639*, *D10S1732*, *D10S1426*, *D10S183*, *D10S208*, *D10S1654*, *D10S1768*) verwandt, deren distalster und proximalster Marker flankierend zum von Hinney et al. (Hinney et al. 2000) gefundenen Peak (*TCF8*) liegen und einen Bereich von 5,25 cM überspannen. *D10S1639* liegt 4,09 cM p-terminal, *D10S1768* 1,66 cM centromerwärts von *TCF8*. Der durchschnittliche Abstand der sich dazwischen gruppierenden Marker betrug 0,88 cM. Ziel war die Bestätigung der bisherigen Kopplungsergebnisse im Sinne signifikanter LOD-Score einerseits, sowie die weitere Eingrenzung der Region im Sinne signifikanter Transmissionsungleichgewichte einzelner Marker-Allele oder Allel-Haplotypen andererseits. Eine Eingrenzung der Region mittels Feinkartierung ist notwendige Voraussetzung auf dem Weg zur Klonierung eines neuen bzw. Identifikation eines bereits bekannten Gens.

3 Material und Methoden

3.1 Das Untersuchungskollektiv

Die vorliegende Studie konzentriert sich auf die extreme frühmanifeste Adipositas. Als Untersuchungsgut wurde mit EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraacetat) versetztes Blut der Probanden verwendet.

3.1.1 Aufnahme in die Studie

Für die Studien wurden wie folgt extrem adipöse Kinder- und Jugendliche sowie deren Eltern und Geschwister aus folgenden Orten rekrutiert:

- Klinik Hochried, Murnau (Spezialklinik zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas)
- Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA, Berchtesgarden (Langzeittherapie für Jugendliche mit extremer Adipositas)
- Spessartklinik, Bad Orb (Rehabilitationsklinik für Kinder- und Jugendliche)
- Universität Giessen, Abt. für Allgemeine Pädiatrie und Neuropädiatrie

Mit allen Probanden und ihren Eltern wurden semi-strukturierte Interviews zur Gewichtsanamnese, Erfassung soziodemographischer Daten und organischer Erkrankungen durchgeführt. Psychiatrische Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung der Essstörung wurde mit dem "Composite International Diagnostic Interview" (CIDI; WHO, 1990) durchgeführt. Jeder Proband wurde über die Studie anhand eines Informationsblattes aufgeklärt und unterzeichnete eine Einverständniserklärung. 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.

3.1.2 Kriterien für die Rekrutierung

1. frühmanifeste und extreme Adipositas beim Indexpatienten definiert durch $\text{BMI} \geq 95.$ der geschlechts- und altersspezifischen Altersperzentile (Hinney et al. 2000)
2. mindestens ein adipöses Geschwisterkind mit einem $\text{BMI} \geq 90.$ Altersperzentile (Hinney et al. 2000)
3. Rekrutierung beider Eltern möglich
4. keine organischen Erkrankungen sowie Zigarettenkonsum unter 10 Zigaretten täglich

Es resultiert eine Gruppe von Indexprobanden mit Geschwistern, die das zu untersuchende Merkmal, hier die Adipositas, in extremer Weise ausprägen. Diese Selektionsstrategie hat sich zum Auffinden humaner QTL im Sinne einer hohen statistischen Aussagekraft bewährt (Gu et al. 1997; Ziegler et al. 1998).

3.1.3 Zusammensetzung des Kollektives

An der Studie nahmen 123 Familien bestehend aus insgesamt 509 Personen teil. Die Studiengruppe wurde ausführlich von Hinney et al. (Hinney et al. 2000) beschrieben. Alle extrem konkordanten Indexprobanden und Geschwister (n=263) haben einen BMI über der 90. Perzentile. 128 Kinder (48,67%) der Indexprobanden und Geschwister haben einen BMI über der 99. Perzentile. In allen Familien wurden beide Elternteile genotypisiert. Tabelle 5 fasst die Daten des Untersuchungskollektivs zusammen.

Daten des untersuchten Personenkollektivs

Studiengruppe	Anzahl	Alter $\bar{x} \pm SD$	BMI (kg / m ²) $\bar{x} \pm SD$	BMI-Perz. $\bar{x} \pm SD$
Index und Geschwister	n = 263 m = 121, w = 142	14,2 ± 4,3	30,2 ± 5,9	98,4 ± 2,4
Mütter	n = 123	41,5 ± 5,3	31,2 ± 6,2	87,0 ± 17,4
Väter	n = 123	44,5 ± 6,0	31,1 ± 5,2	83,0 ± 23,1

Tabelle 5

3.2 DNA-Extraktion

Die durchgeführten genetischen Untersuchungen basieren auf der Verfügbarkeit genomischer DNA. Demzufolge ist eine leichte und effiziente Methode zur Gewinnung der DNA notwendig. Es existieren verschiedene Protokolle zur DNA-Extraktion, die zu unterschiedlicher Menge und Reinheit der gewonnenen DNA führen (Lim et al. 1990). Die hier verwendete Methode basiert auf einem Protokoll von Miller (Miller et al. 1988) zur Gewinnung leukozytärer DNA aus peripherem Vollblut.

3.2.1 Blutentnahme

20ml Vollblut werden aus einer peripheren Vene entnommen und in heparinisierte Standard-Röhrchen (Sarstedt) gefüllt. Das heparinisierte Blut wird nun weiterverarbeitet.

3.2.2 Extraktion der DNA

In einem geeigneten Gefäß wird der Inhalt des Blutentnahmeröhrchens mit 30 ml RCLB (siehe Tabelle 8) vermenget. Während der nun folgenden 15 minütigen Inkubationszeit auf Eis kommt es zur Lyse der roten Blutzellen. Zwischenzeitlich wird drei- bis viermal gemischt.

Zur Trennung der Bestandteile wird das Gemisch für 10 Minuten bei 4 °C in einer Heraeus-Kühlzentrifuge mit 3000 U/min. zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abgossen und das Sediment in 25 ml RCLB aufgenommen. Durch erneute Zentrifugation wie oben wird die Reinheit erhöht. Wiederum nach Abgießen des Überstandes wird das Sediment zur Verdauung von Zell- und Kernproteinen in 5,5 ml Pronase E-Mix (siehe Tabelle 9) aufgenommen und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Darin enthaltenes SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) löst Zell- und Kernmembranen, so dass intrazelluläre Proteine von *Streptomyces griseus* Proteinase (Pronase E, Sigma) gespalten werden können.

Eine 10 Minuten dauernde Inkubation bei 55 °C bewirkt nach Zugabe von jeweils 5 ml SE-Puffer (siehe Tabelle 10) einen Verdau restlicher Oligo- und

Polypeptide, so daß nun durch Hinzufügen von 2,5 ml 5M NaCl-Lösung die Fällung der Proteine erfolgen kann. Präzipitat und Überreste der Zellbestandteile werden durch 15 minütiges Zentrifugieren (Biofuge, Heraeus) bei 13000 U/min entfernt. Der Überstand wird in ein neues Gefäß gegeben und mit dem circa 2,5 fachen Volumen absolutem Alkohol (Ethanol) auf 45 ml aufgefüllt. Hierdurch wird die DNA gefällt und steigt an die Oberfläche, wo sie mit einem Glashaken gefischt, dann kurz in 70% igem Ethanol gereinigt und schließlich in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (siehe Tabelle 11) durch 1-2 stündiges Schütteln bei 50 °C (im Wasserbad) gelöst wird. Sollte die DNA nicht gefischt werden können, so ist erneut bei 13000 U/min für 20 min zu zentrifugieren und das Pellet in 1,5 ml 70% Ethanol zu waschen. Dem Entfernen des Ethanols geht eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 13000 U/min voraus. Zuletzt wird das Pellet wie oben in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.

3.2.3 Verdünnung und Konzentrationsbestimmung

Vor der Konzentrationsbestimmung wird die DNA 1:200 verdünnt (5 µl DNA-Lösung auf 995 µl H₂O). Die Messung der Konzentration erfolgt im Spektralphotometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten mit einer Kantenlänge von 1 cm. Die vorliegende Konzentration wurde unter der Annahme ermittelt, dass eine Extinktion von $E_{260} = 1,0$ einer Konzentration von 50 µg/ml DNA entspricht. Zur Bestimmung der Reinheit wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Eine Verunreinigung der Probe durch Proteine führt zu einer großen Extinktion bei dieser Wellenlänge. Das Verhältnis der Extinktionen E_{260}/E_{280} (DNA/Protein) gibt also den Reinheitsgrad der Probe an. Die DNA-Konzentration sollte sich zwischen 300 - 1000 µg/ml bewegen, wobei ein Reinheitsgrad $\geq 1,5$ zufriedenstellend ist. In einem letzten Arbeitsschritt wird die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 20 ng DNA/µl verdünnt.

3.3 Amplifizierung der DNA

Die extrahierte genomische DNA enthält prinzipiell die gesamte menschliche Erbinformation. Zum Nachweis einer bestimmten Sequenz oder eines be-

stimmt Alleles ist dessen Amplifizierung und Isolierung aus dem Gemisch notwendig. Isolierung bedeutet hier, dass eine Sequenz als eine einzelne molekulare Einheit amplifiziert wird, während die restliche genomische DNA (die Matrize) unamplifiziert bleibt. Ein geeignetes Werkzeug für die Amplifizierung polymorpher Allele (d. h. der Mikrosatelliten) ist die Polymerase Kettenreaktion (Rose 1991; Koreth et al. 1996).

3.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Nach *Mullis et al.* (Mullis et al. 1986) erfolgt die einfache Amplifizierung einer DNA-Sequenz durch wiederholte Zyklen von erstens Denaturierung des Reaktionsgemisches, zweitens Hybridisierung der Nukleinsäuren und drittens Synthese der Stränge durch eine DNA-Polymerase. Die Einführung der hitzestabilen Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*) ermöglicht einen automatischen Ablauf der Reaktion, ohne daß eine durch den Denaturierungsschritt inaktivierte Polymerase ergänzt werden muß (Saiki et al. 1988). Neben einer Polymerase sind für die Reaktion noch Nukleotide und Puffer notwendig. Die Menge des PCR-Produktes ist von der eingesetzten Menge Matrize, der Zyklenzahl und der Effizienz der Reaktion abhängig. Eine einfache Formel liefern Arnheim et al. (Arnheim et al. 1992):

$$N = n \cdot (1 + E)^c \quad (1)$$

N: Menge des Reaktionsproduktes, n: Anzahl der DNA-Matrizen,
c: Anzahl der Zyklen, E: Effizienz ($0 \leq E \leq 1$)

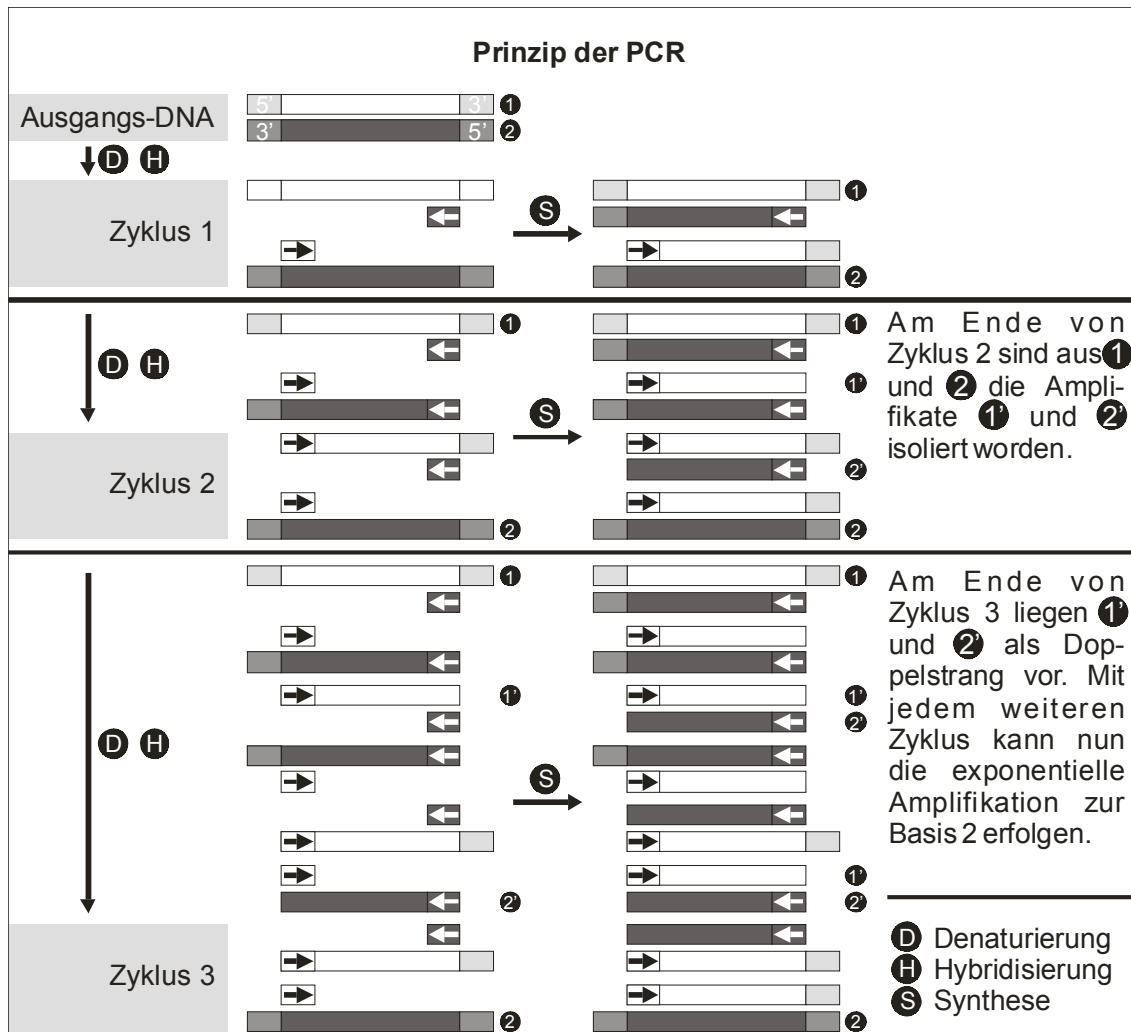


Abbildung 4, nach (Mullis et al. 1986)

Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 4 dargestellt. Das Prinzip wird anhand von drei PCR-Zyklen erläutert. Ausgangs-DNA und Primer sind in Form unterschiedlich schraffierter Rechtecke dargestellt. Erst nach dem zweiten Zyklus liegt das gewünschte Amplifikat vor. Nach dem dritten Zyklus erfolgt die exponentielle Vermehrung des Amplifikates bei nur linearer Zunahme langkettiger Nebenprodukte, so dass nach einer ausreichenden Zyklenzahl das Amplifikat in ausreichender Reinheit und Menge zur Analyse vorliegt. Die Effizienz der Reaktion wird durch die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und die Reaktionsbedingungen entscheidend beeinflusst.

3.3.2 Wahl der Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen entstammen ausschließlich der Genome Database (GDB, www.gdb.org). Mit diesen Primern kann eine standardisierte Amplifikation der Mikrosatelliten erreicht werden. Jeweils einer der Primer eines Primerpaares wurde mit einer Infrarotfarbstoffmarkierung geordert, um die Auswertung auf einem hochauflösenden Gel-Scanner möglich zu machen.

3.3.3 Optimierung der PCR

Bevor mit dem Screening des Untersuchungsgutes begonnen werden kann, sind zunächst die geeigneten Reaktionsbedingungen für die PCR zu ermitteln. Ziel ist die Herstellung eines möglichst reinen, spezifischen PCR-Produktes. Eine allein durch Variation der Reaktionsbedingungen im PCR-Ansatz erzielbare Änderung äußert sich in gut abgrenzbaren, kontrastreichen Banden. Aus schwer bis gar nicht auswertbaren Banden werden halbautomatisch quantifizierbare Daten. Initial wurde mit folgenden Bedingungen begonnen:

Primer

Aus den vom Hersteller der Primer angegebenen Anlagerungstemperaturen (T_m) wurde der Mittelwert der Anlagerungstemperaturen eines Primerpaares berechnet und 1°C subtrahiert. Beim Erhalt unspezifischer Amplifikate wurde die Anlagerungstemperatur in 1°C -Schritten erhöht und/oder die Zeit für Anlagerung des Primers (Hybridisierungszeit) von 60 s bis auf 40 s reduziert. Die Primerkonzentration wurde mit maximal $0.8 \text{ pmol}/25 \mu\text{l}$ angesetzt und gegebenenfalls auf minimal $0,06 \text{ pmol}/25 \mu\text{l}$ reduziert.

Ionenkonzentration und pH-Wert

Die Faktoren pH-Wert und Ionenkonzentration beeinflussen den gesamten Reaktionsablauf. Kationen schwächen durch Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyribose-Rückgrats der DNA die elektrostatischen Abstossungskräfte zwischen den einzelnen DNA-Strängen, so dass die Anlagerung des Primers an die Matrize erleichtert wird (Löffert et al. 1997).

Um einen gut reproduzierbaren PCR-Ablauf zu gewährleisten, wurden dem Reaktionsansatz nur industriell hergestellte Reagenzien zugefügt. Zur Optimierung wurden stets 2,5 µl 10x-Puffer (MWG-Biotech AG, Tabelle 12) in 25 µl Ansatz gegeben. Dies entspricht einer KCl-Konzentration von 50 mM bei einem pH-Wert von 8,3. Lediglich die MgCl₂-Konzentration wurde variiert, wobei sich eine Konzentration von 3,5 mM stets als optimal erwies.

Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) und DNA-Matrize

Um eine ausreichende Amplifikation der DNA-Matrize bzw. des Mikrosatelliten sicherzustellen, müssen Primer- und dNTP-Moleküle im Überschuss vorhanden sein. Das Auftreten unspezifischer Reaktionsprodukte begrenzt die einsetzbare Menge. Dem Reaktionsansatz wurden 20 ng DNA-Matrize zugesetzt. Mit oben genannten Primerkonzentrationen entspricht dies einem Verhältnis Primer : DNA von ~10⁹ : 1. Auf weitere Zusätze konnte verzichtet werden.

Standard-PCR

Im Allgemeinen wurde die PCR in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt: Je 25 µl Reaktionsansatz enthielten: 20 ng genomische DNA, je 20 mM dNTP, 0,4 U *Taq*-Polymerase (MWG Biotech), Primer, Puffer und MgCl₂ wie oben angegeben. Zur Kontrolle auf Verunreinigungen, z.B. durch andere PCR-Produkte, wurde einem Reaktionsansatz anstelle von DNA steriles *aqua bidest.* (H₂O-Kontrolle) beigegeben. Der Thermozykler (Perkin Elmer) wurde vor Zugabe des Reaktionsansatzes auf 94°C aufgeheizt und der fertige Reaktionsansatz unmittelbar nach Zugabe der *Taq*-Polymerase zur Denaturierung der genomischen DNA im Zyklus plaziert. Initial wurde 3 min bei 94°C denaturiert und der sich anschließende PCR-Zyklus 30 - 35 mal wiederholt. Nach Ende der Zyklen wurde das Reaktionsmix auf 4 °C gekühlt.

Testen der PCR auf Erfolg

Zum Nachweis einer spezifischen Amplifikation wurde nach Beendigung der PCR ein Lauf auf dem Infrarot-Gel-Scanner (LiCor 4200-2) gestartet. Hierzu wurden 1 - 2 µl PCR-Produkt mit 2 - 5 µl Ladepuffer (*formamide loading dye*,

Amersham Pharmacia) sowie gegebenenfalls zusätzlich 1 - 2 μl H_2O (*aqua bidest.*) verdünnt. Der Probelauf erfolgte mit Standard-Scanner-Parametern (vergleiche Tabelle 8).

3.4 Analyse des Amplifikats

Nach erfolgreicher Amplifikation eines Mikrosatelliten und gelungenem Probelauf erfolgte die Analyse auf dem Infrarot-Gel-Scanner (LiCor 4200-2). Die hierbei gewonnenen Bilder (Scans) wurden auf Festplatte und CD-ROM gespeichert, bearbeitet, nochmals gespeichert und in einem zweiten Schritt mit der Bild-Analyse-Software OneDScan (MWG, Scanalytics) schematisiert ausgewertet. Die Bearbeitung der Bilder umfasste einen Helligkeits-, Kontrast-, Intensitätsausgleich sowie eine Reduktion des Bildmaterials. Zur Datenreduktion wurden für die Analyse irrelevante Informationen wie beispielsweise die Primerbanden gelöscht.

3.4.1 Herstellung eines Polyacrylamid-Geles

Zur Typisierung der Mikrosatelliten wurden hochauflösende 25 cm lange Gele nach den Richtlinien des Herstellers (Li-Cor 1997) zubereitet. Vor der Herstellung der Gel-Lösung wurden die Glasplatten der Elektrophoreseeinheit zunächst mit *Aqua bidest* und anschließend mit Isopropanol gereinigt und sodann montiert. In einen 50 ml Falcon wurden gemäß Tabelle 14 die Zutaten gegeben und danach die Polymerisation durch Hinzufügen von 25 μl TEMED (Tetramethylethyldiamin, Fa. Roth) und 175 μl frisch hergestelltem APS 10% (Ammoniumpersulfat, Fa. Roth) gestartet. Bevor die Mischung in die Gelphase überging wurde sie gefiltert (2 μm Minisart, Sarstedt) und unter Vermeidung von Blasenbildung zwischen die Glasplatten gegeben. Vor dem Starten des Vorlaufes wurde eine bis eineinhalb Stunden abgewartet, um die vollständige Polymerisation sicherzustellen.

3.4.2 Vorbereiten der Analyse

Zur Analyse des PCR-Produktes wurden stets folgende Schritte durchgeführt:

- Entnahme von 1 - 2 µl PCR-Produkt aus dem Reaktions-Cup und Gabe in ein Einweg-Cup
- Zugabe von 2 - 5 µl Ladepuffer (je nach Probelaufergebnis) + ggf. H₂O
- Versiegeln der Cups mit Klebefolie
- Zentrifugation bei ca. 2000 U/min (Heraeus Biofuge 13)
- Denaturierung der Probe (5 min, 95 °C)
- anschließend sofortige Kühlung auf Eis
- Starten der Analyse mit 1 µl der PCR-Produkt-Ladepuffer-Mischung

Das hohe spezifische Gewicht des Ladepuffers erschwert die Diffusion der Mischung aus der Geltasche in das umgebende TBE-1x-Puffermedium (Tabelle 13). Der Formamid enthaltende Ladepuffer und die sofortige Kühlung verhindern eine Rehybridisierung der nach Denaturierung getrennten DNA-Stränge (Blake et al. 1996). Hierdurch wurde eine bessere Auftrennung der PCR-Produkte im LiCor-Infrarot-Sequencer erreicht, was sich in scharfen, gut abgrenzbaren Banden bemerkbar machte.

3.4.3 Datenerfassung mittels Infrarot-Gel-Scanner

Der LiCor 4200-2 ist ein hochempfindliches Analysegerät. Zwei Infrarot-Laser regen die markierten Oligonukleotide (Primer) mit zwei wählbaren Frequenzen (680 nm und 780 nm) zur Fluoreszenz an. Die am 5'-Ende IRD 700 oder IRD 800 markierten Primer (MWG-Biotech) wurden zuvor bei der PCR an das zu detektierende Amplimer (den Mikrosatelliten) angesetzt. Über eine Optik wird die von der Laserdiode emittierte Strahlung kollimiert, gefiltert und in Gelmitte auf eine etwa 30 x 50 µm Ellipse fokussiert. Die elliptische Strahlung wird zeilenweise über das Gel geführt, wo es den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Eine Photodiode wandelt die gefilterte detektierte Fluoreszenz in ein elektrisches Signal, welches nach Digitalisierung in Form einer Standard-Grafik-Datei auf

dem PC gespeichert wird (Tagged Image File Format, TIFF, 16 bit Graustufen). Durch geeignete Wahl von Fragmentgröße und Infrarotfarbstoffen lassen sich mehrere Analysen in einem Geldurchlauf kombinieren. Vor der Datenerfassung wurden Parametereinstellungen vorgenommen, von denen die Qualität des erfassten Bildes abhängt: zunächst wurde die Empfindlichkeit der Kamera an die Eigenfluoreszenz des Geles angepasst. Hierzu wurde vor dem Start der Analyse ein „Autogain“ durchgeführt. Die im folgenden ausgeführte „Auto Focus“ Routine legt den Fokus des Mikroskopes in die Mitte des Geles. Anschließend wurde für die nun eingestellte Gelmitte noch einmal die Empfindlichkeit angepasst (erneut Autogain). Führten diesen Einstellungen nicht zu einem befriedigenden Ergebnis wurden Empfindlichkeit und Focus manuell korrigiert. Um das Gel zu reinigen und aufzuwärmen, wurde vor dem Lauf ein einstündiger Vorlauf durchgeführt. Spannung, Strom, ans Gel abgegebene Leistung, Geltemperatur und Zeilenabtastfrequenz des Infrarot-Gel-Scanners bilden ein Parameterset, das die Qualität der gewonnenen Bilder entscheidend beeinflusst. Eine höhere Spannung führt zu einer schnelleren Passage der DNA-Fragmente durch das Gel, wodurch in Kombination mit der Abtastfrequenz der Laser-Photodiodeeinheit eine unterschiedliche Auftrennung der Fragmente nach Fragmentgröße erzielt werden kann. Verwendet wurden Spannungen zwischen 1050 V und 1500 V bei bis zu 3.825 Bildzeilen (15 Frames, 255 Bildzeilen / Frame). Die ans Gel abgegebene Leistung lag stets unter 50 W, was Geltemperaturen zwischen 40 und 50 °C zur Folge hatte.

3.4.4 Datenanalyse

Die bearbeiteten TIFF-Bilddateien werden in einem zweiten Schritt mit einer Software zur eindimensionalen Gelanalyse ausgewertet (OneDScan Version 1.3, Scanalytics Inc.). Hierzu erfolgt für jeden Marker die Kalibrierung des Systems mit der DNA-Probe der CEPH-Probandin 1347-02, so dass nach Etablierung eines eigenen Standards mit einer internen DNA-Probe die exakte Auswertung erfolgen kann. Die TIFF-Dateien mit den Banden der Mikrosatelliten werden von OneDScan mit den Standards verglichen und ihre Größe bestimmt, wozu wiederum für jede Einzelanalyse eine Kalibrierung des Systems nötig ist. Der Ablauf der Auswertung ist:

- Markierung der Spuren, in denen die Banden sichtbar sind (Mark Lanes Location)
- Beschriftung der Spuren mit den Patienten-Codes (Samples Description)
- Kalibrierung (Calibration)
- Erkennung der Banden durch OneDScan und Auswertung (Samples Detection)

Zur Kalibrierung stehen prinzipiell zwei unterschiedliche Methoden zur Auswahl. Erstens die „Desmile“-Methode und zweitens „Reference Lane“ oder auch Rf-Methode. Die Rf-Methode eignet sich für homogen diffundierende Proben. Bei wie im vorliegenden Fall inhomogen diffundierenden Proben mit höherer Diffusionsgeschwindigkeit in Gelmitte ist Desmile die ideale Methode. Hierzu sind Standardspuren am Rand und in der Mitte des Geles notwendig. Ein „lächelndes“ Gel, weil Proben durch ein unregelmäßiges elektrisches Feld ungleich schnell gewandert sind, kann durch die Standardspuren ausgeglichen und das Gel „entlächelt“ (engl.: desmile ☺ → ☹) werden (siehe Abbildung 5).

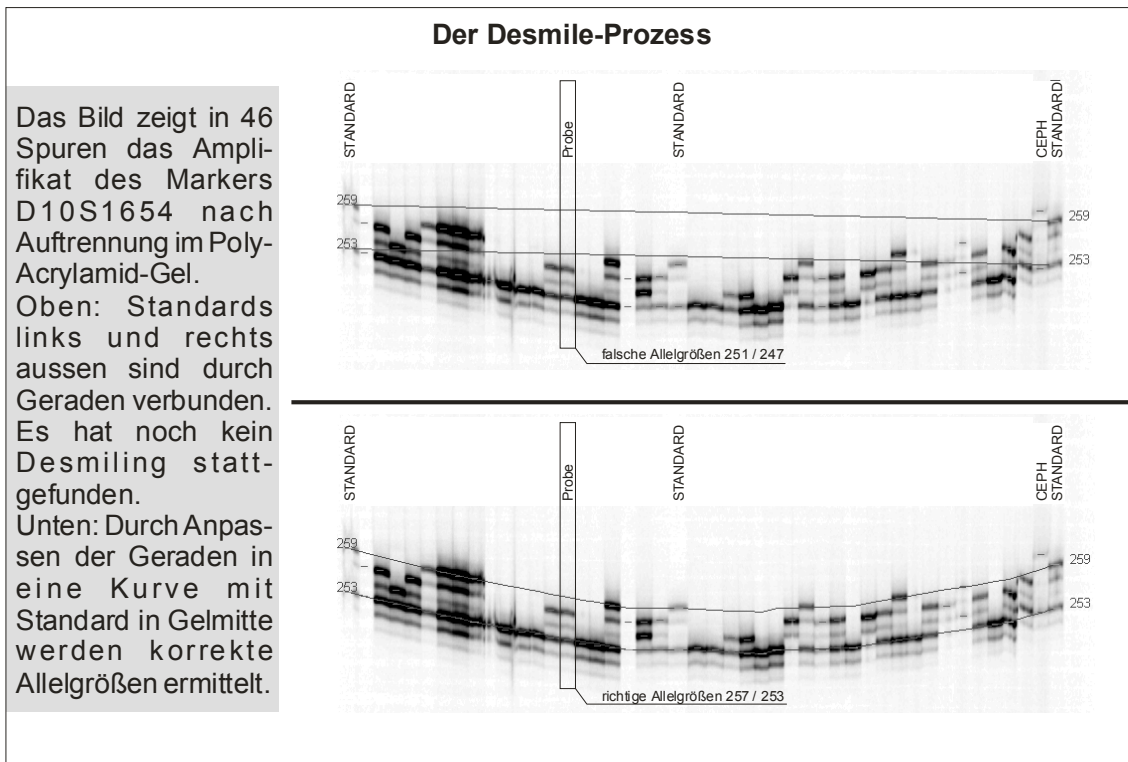


Abbildung 5

Anschließend wird der Erkennungsprozess der Banden gestartet, wozu initial innerhalb der Software folgende Erkennungsparameter (Band Detection Parameters) gewählt wurden:

Softwareparameter zum Erkennen der Banden

Parameter	Wert	Bemerkung
Baseline	At minimum	minimaler Wert einer Spur ist Referenz
Trace Width	74%	Prozent der Spurbreite, die ausgewertet wird
Band Height Treshold	60%	keine Detektion kleiner als 60% max. Intensität
Trace Smoothing Factor	zwischen 5 und 150	Korrekturfaktor zur Bandenbreite /-scharfe
Max. bands to detect	leer oder 2	Anzahl der Banden, die detektiert werden

Tabelle 6

Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Prüfern vorgenommen. Es wurde nach einem verbindlichen Schema vorgegangen: Das Öffnen der Dateien, die Markierung der Spuren und Eingabe der Patienten-Codes erfolgte gemäß den Angaben des Scanalytics „Owner’s Manual“ . Nach der Berechnung der Bande durch OneDScan wurde eine Bearbeitung und Überprüfung vorgenommen. Von zwei Banden in einer Spur (Heterozygotie) wurde ausgegangen, wenn die Banden entweder weit genug voneinander entfernt waren oder die erste Bande *niedriger* war als die zweite. Bei den üblichen Stotterbanden ist die erste Bande gewöhnlich *höher* als die zweite, was durch die geringere Konzentration der fehlerhaften Amplifikate bedingt ist. Eine mögliche Ursache von Stotterbanden ist *mismatched priming*, welches vor allem bei repetitiven DNA-Sequenzen auftritt (Murray et al. 1993; Hite et al. 1996). Der Bandenerkennung oder auch qualitativen Bandenanalyse folgte die Bandenvermessung oder auch quantitative Bandenanalyse. Hierzu war eine Kalibrierung des Systems mit Hilfe eines dem Gelddurchlauf zugefügten Standards nötig. Der Standard lieferte zwei Banden bekannter Größe, die eine Größenermittlung aller anderen Banden möglich machte. Das Hinzufügen von Desmole-Linien machte auch eine sichere Analyse von „lächelnden“, ungleichmäßig gelaufenen Gelen möglich (vergleiche Abbildung 5). Der zuletzt ausgedruckte und im Textformat (ASCII-TXT-Datei) gespeicherte Bericht enthält die Patienten-Codes und die Banden- bzw. Allelgröße in Anzahl Basenpaare.

Um Fehlerquellen und Zeitaufwand zu minimieren, wurde ein Vergleichsalgorithmus entwickelt. Die durch unabhängige Auswertung entstandenen ASCII-TXT-Dateien wurden mittels eines Freeware-Programmes verglichen (Textpad32, Helios). Identische Auswertungen führten zu einer Übernahme der Allelgrößen in die Datenbank, Unstimmigkeiten wurden von den Auswertern gemeinsam unter Sichtung des Gelbildes geklärt. War keine Klärung möglich, erfolgte der erneute Gelddurchlauf eines neuen PCR-Produktes derselben Probe. Führte auch diese Maßnahme nicht zum Erfolg, wurde die gesamte Analyse mit einer neuen PCR so oft wiederholt bis ein eindeutiges Ergebnis vorlag.

3.5 Verwaltung der Daten

Angesichts der großen Datenmenge (7 Marker x 509 Indexprobanden, Geschwister und Eltern = 3563 Genotypisierungen) wurden Regeln zur Datensicherung und -verwaltung erstellt, die für jeden Marker konsequent befolgt wurden.

3.5.1 Datensicherung

Wurde am Infrarot-Gel-Scanner eine neue Analyse gestartet, wurde ein Verzeichnis erstellt, in dem sämtliche während der Analyse gesammelten Daten gespeichert wurden. In diesem Verzeichnis wurden für jeden Primer (bzw. für jeden Marker) neue Ordner erstellt und innerhalb dieser Ordner die LiCor-Daten gespeichert. Die Datensicherung auf CD-ROM erfolgte täglich.

3.5.2 Zentrale Datenverwaltung mit MS Access

Das Datenmaterial wurde in eine neue oder bestehende Access-Tabelle importiert. Beim Import entstehende Fehler wurden automatisch in einer Tabelle namens „Import Errors“ gespeichert. Diese Fehler waren zumeist hervorgerufen durch doppelte Typisierungen, was zu doppelten Datensätzen führte, die im folgenden gelöscht wurden.

3.6 Statistische Methoden

Es wurden die Marker D10S1639, D10S1732, D10S1426, D10S183, D10S208, D10S1654 und D10S1768 verwendet, um eine Feinkartierung der von Hager et al. aufgezeigten Kandidatenregion auf Chromosom 10p vorzunehmen (Hager et al. 1998). D10S1639 ist am weitesten distal, D10S1768 am weitesten proximal gelegen. Die Marker überspannen eine Region von etwa 5 cM mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 0,86 cM. Diese Region liegt innerhalb der von Hinney et al. bestätigten Kandidatenregion, den Peak um TCF8 flankierend (Hinney et al. 2000). Tabelle 7 fasst die Charakteristika der verwendeten Marker zusammen, deren Lage auf Chromosom 10 in Abbildung 6 dargestellt ist (GDB).

Position der Marker auf Chromosom 10 nach Location Database (LDB)

Marker	Locus	Δ Cen-Marker LDB (cM)	Δ Marker-Marker, LDB (cM)
D10S1639	p12.33	-7,89	2,49
D10S1732	p12.32	-5,40	0,38
D10S1426	p12.32	-5,02	1,05
D10S183	p12.31	-3,97	0,35
D10S208	p12.2	-3,62	0,68
D10S1654	p11.22	-2,94	0,30
D10S1768	p11.21	-2,64	

Tabelle 7

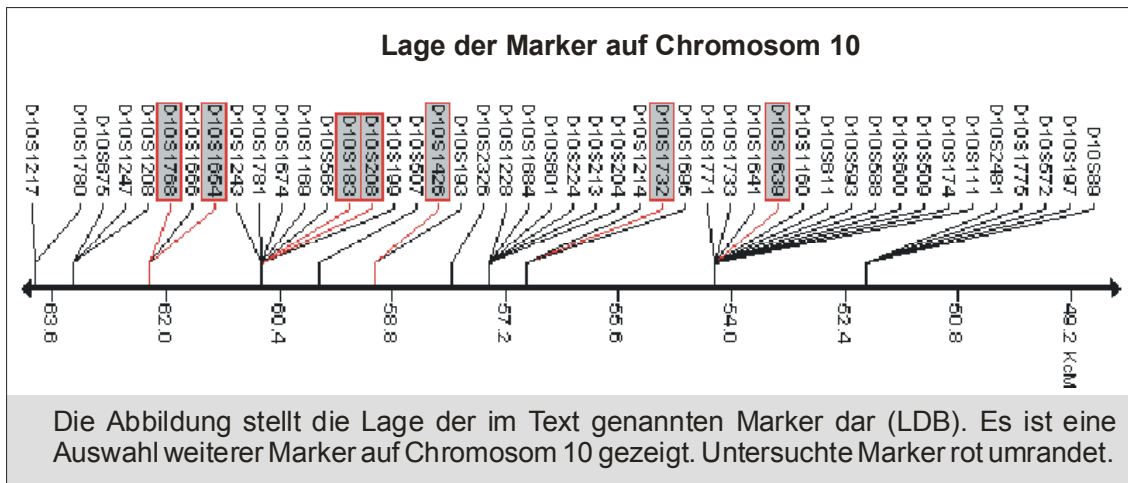


Abbildung 6

Um herauszufinden, ob zwischen zwei Markern (also Mikrosatelliten-Marker und Krankheitsmarker) Kopplung besteht, sind zunächst folgende zwei Fragen zu klären:

- Wie kann man die Rekombinationsfraktion zwischen den fraglichen Loci bestimmen?
- Welche statistischen Berechnungen sind nötig, um zu zeigen, dass die Rekombinationsfraktion signifikant von dem Wert 0,5 abweicht, der bei Abwesenheit von Kopplung zu erwarten wäre.

Im Rahmen eines Genomscreens oder einer Feinkartierung ist die exakte Angabe der Rekombinationsfraktion nicht möglich, da ein fraglicher Locus erst gesucht wird. Auch wenn die Lage genau bekannt wäre, ist es aufgrund zu geringer Informationen über Stammbaum und Krankheit nicht möglich, die Rekombinanten zweifelsfrei zu identifizieren und zu zählen. Jedoch ist es möglich, bei gegebenem Stammbaum die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zu berechnen.

3.6.1 Kopplungsanalyse

Durch eine Kombination von Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse (MLB) und Assoziationstest als Test auf Kopplung mit den gewonnenen Daten wird versucht, die Kandidatenregion weiter einzugrenzen. Zur Durchführung des Transmissions-Disequilibriums-Test (TDT) wurden Trios aus extrem adipösen

Kindern (geschlechts- und altersspezifische BMI-Perzentile ≥ 90) und ihren beiden Eltern gebildet. Dies führte zu einer Gesamtzahl von 263 Trios aus 123 unabhängigen Familien.

Es wurden Two-Point- und Multi-Point-Analysen mit den Statistiken der maximalen binomialen Wahrscheinlichkeit (Maximum Likelihood Binomial, MLB) durchgeführt, wie sie in MLBGH implementiert sind. MLBGH (Maximum Likelihood Binomial GENEHUNTER) ist eine Erweiterung des GENEHUNTER-Programmes, dem es vom Aufbau gleicht, zur ASP-Analyse mittels MLB. Die MLB-Methode basiert auf der binomialen Verteilung der elterlichen Allele auf die extrem konkordanten Nachkommen. Demzufolge zieht es auch mehrere Nachkommen in Betracht. Die untersuchten Marker überspannen laut Location Database (LDB) eine Region von 5,25 cM. Der mathematische Zusammenhang zwischen der genetischen Karte und der Rekombinationsfraktion wird durch die Kartierungsfunktion angegeben. Die Umwandlungen der Kartendistanz (cM) in Rekombinationsfraktionen (θ) und umgekehrt sowie die Multipoint-Analyse wurden unter Verwendung der Haldane-Kartierungsfunktion (2) (Strachan et al. 1999) durchgeführt.

$$w = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2\theta), \text{ mit } w: \text{Kartendistanz, } \theta: \text{Rekombinationsfraktion} \quad (2)$$

Die Kartendistanzen entstammen der Location Database (LDB) (Collins et al. 1996). Markerentfernungen werden in Bezug auf das Centromer angegeben, wobei ein negativer Wert eine Lage auf dem p-terminalen Ende des Chromosoms entspricht. Wie von Kruglyak (Kruglyak et al. 1996) vorgeschlagen, wurde die aus den vorhandenen genotypischen Daten extrahierte Information dazu benutzt, die Menge der Erbschaftsinformationen quantitativ zu bestimmen. Das folgende Testverfahren wurde angewendet: Zunächst wurde auf Kopplung zwischen dem BMI und der Kandidatenregion auf Chromosom 10 mit geschlechtsgemittelten Markerdistancen unter Verwendung von MLB-LOD-Scores getestet. Dabei erfolgte die Zwei-Punkt-LOD-Score-Analyse für alle sieben Marker. Zur Untersuchung eines geschlechtsabhängigen Transmissionsungleichgewichtes (Paterson et al. 1999) wurden Söhne und Töchter getrennt untersucht. Konnte signifikant Kopplung gezeigt werden, wurde als nächster

Schritt ein Transmissions-Disequilibrium-Test für das häufigste Allel durchgeführt. Es folgt eine Darstellung der einzelnen Verfahren.

3.6.2 Mean-Test

Einer der Standardtests ist der sogenannte Mean-Test, der mit dem T-Test vergleichbar ist. Er prüft die Lage von Verteilungen anhand ihrer Mittelwerte, deren Differenz im Zähler durch den Standardfehler als Prüfmaß dividiert wird. Für das Ergebnis des Tests gilt: Je größer das Ergebnis, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese H_0 wahr ist. Allgemein läßt sich der Test darstellen als (Harten et al. 1993):

$T_m = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma / \sqrt{n}} \quad (3)$	\bar{x} : Mittelwert μ : Erwartungswert unter H_0 σ / \sqrt{n} : Standardfehler
---	--

Unter der Nullhypothese "Keine Kopplung" wird erwartet, dass die Nachkommen null (n_0), eins (n_1) oder zwei (n_2) Allele IBD mit exakt einer Wahrscheinlichkeit von $\frac{1}{4}$ (n_0), $\frac{1}{2}$ (n_1) und $\frac{1}{4}$ (n_2) aufweisen. Damit berechnet sich der durchschnittliche Anteil Allele IBD unter H_0 (μ) wie folgt:

$\mu = \sum_{i=0,1,2} p_i \frac{n_i}{2}$ $\mu = \frac{1}{4} \cdot \frac{0}{2} + \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} + \frac{1}{4} \cdot \frac{2}{2} = \frac{1}{2}$	p_i : Anteil n_i Allele IBD n_i : Anzahl Allele IBD
--	--

Für die vorliegende Fragestellung ist also der Test (Gleichung (3)) nach Olson et al. (Olson et al. 1999) gegeben durch:

$T_m = \frac{\left[\frac{n_0}{n} \cdot \frac{0}{2} + \frac{n_1}{n} \cdot \frac{1}{2} + \frac{n_2}{n} \cdot \frac{2}{2} \right] - \mu}{\sigma / \sqrt{n}} = \frac{\left[\frac{n_1}{2} + n_2 \right] / n - \frac{1}{2}}{\sqrt{\frac{1}{8}} / \sqrt{n}}$	mit $\sigma = \sqrt{\frac{1}{8}}$
---	-----------------------------------

In der Praxis wird diese Teststatistik in etwas modifizierter Form eingesetzt, da sich der IBD Wert nicht immer eindeutig bestimmen lässt (Olson et al. 1999). Der Vorteil des Mean-Tests ist seine Optimalität in vielen Situationen. So ist er z.B. für rezessive genetische Modelle der beste Test. Außerdem haben Knapp et

al. (Knapp et al. 1994) gezeigt, dass es keinen Test gibt, der in dieser Testsituation besser ist als der Mean-Test.

3.6.3 Maximum-Likelihood-Score

Alternativ wird häufig der Maximum Likelihood Score (MLS) Test verwendet.

Er ist nach Olson et al. (Olson et al. 1999) gegeben durch:

$MLS = \sum_{i=0,1,2} \log \frac{z_i^{n_i}}{\alpha_i^{n_i}} \quad (4)$	<p>z_i : beobachteter Anteil für i Allele IBD</p> <p>α_i : erwarteter Anteil für i Allele IBD bei H_0</p> <p>n_i : Anzahl Allele i IBD</p>
--	--

Nach der Maximum-Likelihood-Methode resultiert für die beobachteten Werte eine maximale Auftretenswahrscheinlichkeit, wenn μ durch \bar{x} geschätzt wird (Bortz 1993). Hier nun handelt sich um einen sogenannten Likelihood-Quotienten-Test, bei dem der LOD-Score über die z_i maximiert wird. Im Zähler von Gleichung (4) steht die Wahrscheinlichkeit (Likelihood) für die beobachtete IBD-Verteilung (H_1). Im Nenner steht die Wahrscheinlichkeit für die beobachtete IBD-Verteilung, wenn H_0 zugrunde gelegt wird. Mit "Likelihood" wird jene bedingte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Beobachtung bezeichnet, die unter Zugrundelegung einer Hypothese berechnet werden kann (Ott 1999). Es folgt ein einfaches Rechenbeispiel. An einer Untersuchungsgruppe seien 60 Allele untersucht worden. Es ergab sich die unten dargestellte IBD-Verteilung:

$\begin{aligned} n_0 &= 10 \\ n_1 &= 10, \text{ hieraus folgt: } z_0 = \frac{10}{60} = \frac{1}{6}, z_1 = \frac{10}{60} = \frac{1}{6}, z_2 = \frac{40}{60} = \frac{2}{3} \\ n_2 &= 40 \end{aligned}$
--

Diese Werte werden nun im Zähler plaziert, wohingegen im Nenner die Wahrscheinlichkeit für die beobachtete Verteilung von n_0 , n_1 und n_2 unter der Annahme berechnet wird, dass sie eigentlich im Verhältnis 1:2:1 auftauchen (H_0):

$MLS = \log \frac{\frac{1}{6} \cdot \frac{1}{6} \cdot \frac{2}{3}}{\frac{1}{4} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{4}} = 10,51$	Der MLS von 10,51 liegt über Null, was für die Richtigkeit von H_1 spricht.
--	---

Auch dieser Test ist ein Likelihood-Quotienten-Test, und ist der beste Test für die betrachtete Testsituation. Im Gegensatz zum Mean-Test, der auf IBD-Mittelwerte testet, prüft der MLS-Test IBD-Wahrscheinlichkeiten. Die oben diskutierten Tests funktionieren problemlos für unabhängige Geschwisterpaare.

Maximum-Likelihood-Binomial

In dieser Arbeit liegt allerdings die Situation vor, dass manche Familien *mehr als zwei* adipöse Kinder haben. Aus diesem Grund wurde der Maximum-Likelihood-Binomial (MLB) verwendet, der als natürliche Verallgemeinerung des Mean-Tests verstanden werden kann. Nur wird hier nicht mehr unter Verwendung der Binomialverteilung überprüft, wie groß die Anzahl der Allele IBD ist. Stattdessen wird getestet, wie häufig ein Allel von einem Elternteil auf seine Kinder übertragen wird. Hat eine Familie nur 2 Kinder, dann reduziert sich der MLB auf den Mean-Test.

LOD-Scores

Das Ergebnis der Berechnungen wird dargestellt als das Verhältnis zweier Wahrscheinlichkeiten. Im Zähler steht die Wahrscheinlichkeit, dass die Loci gekoppelt sind (Rekombinationsfraktion = θ), im Nenner die Wahrscheinlichkeit, dass keine Kopplung vorliegt (Rekombinationsfraktion = 0,5). Der Logarithmus dieses Wahrscheinlichkeitsverhältnisses ist der LOD-Score (LOD: logarithm of the odds) (Morton 1955). Eine Darstellung der LOD-Scores in Form von p-Werten ist äquivalent. Dazu liefert Gleichung (5) die Umwandlung des LOD-Scores in eine χ^2 -Prüfgröße zu der beispielsweise in Tabellenwerken entsprechende einseitige p-Werte ermittelbar sind (Lander et al. 1995).

$\chi^2 \approx 2 \cdot \ln 10 \cdot MLS \quad (5)$	χ^2 : Prüfgröße MLS : LOD-Score
---	---

Die Berechnung des Signifikanzniveaus der einzelnen LOD-Scores erfolgt gemäß den Empfehlungen von Lander und Kruglyak (Lander et al. 1995). Für einen Fehler 1. Ordnung von $\alpha=0,05$ gilt:

$p \approx \frac{0,05}{C + 4 \cdot \rho \cdot G \cdot \ln(10) \cdot X} \quad (6)$	<p>ρ: Crossover-Rate</p> <p>G: Länge in Morgan</p> <p>C: Chromosomenzahl</p> <p>X: LOD-Schwellenwert</p>
---	---

Demzufolge wird ein $p < 0,029$ ($\text{LOD} > 1,0$) entsprechend Gleichung (6) als signifikanter Hinweis auf Kopplung betrachtet.

3.6.4 TDT - Transmissions Disequilibrium Test

Der TDT wurde von Spielman et al. (Spielman et al. 1993) 1993 als *Test auf Kopplung* zwischen einem komplexen Phänotyp und einem genetischen Marker eingeführt. Die Idee hierzu lieferte die Beobachtung, dass in Fall-Kontroll-Studien z. B. HLA Marker mit bestimmten Krankheiten assoziiert waren. Die Vermutung, dieser Effekt könnte durch Schichtungsphänomene verursacht sein, führte zur Untersuchung der Weitergabe eines Markers innerhalb einer Familie in Form des TDT. Der TDT kann dazu verwendet werden, jeden Marker zu prüfen, für den Daten von Kernfamilien, also den Eltern und einem oder mehr betroffenen Kindern, vorhanden sind (Spielman et al. 1996). Die Anzahl aller von den heterozygoten Eltern an die Kinder weitergegebenen Allele (transmittierte Allele) wird dabei mit der Anzahl der nicht weitergegebenen Allele verglichen (siehe Abbildung 7).

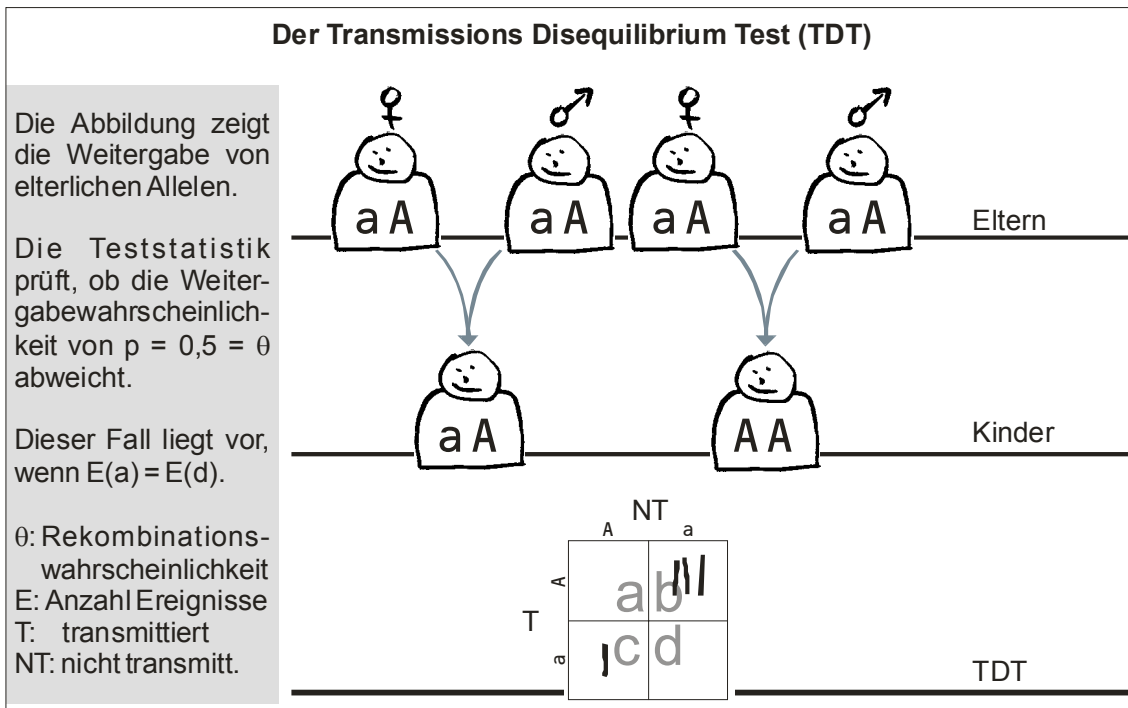


Abbildung 7

Folgende Hypothesen werden überprüft:

- H_0 : Allel A wird ebenso häufig transmittiert wie nicht transmittiert.
- H_1 : Die Rate der Transmission und die Rate der Nicht-Transmission für das Allel A sind unterschiedlich. Es liegt ein Transmissionsungleichgewicht vor.

Als Teststatistik kommt ein χ^2 -Test zum Einsatz, der folgende Form annimmt:

$\chi^2 = \frac{(b - c)^2}{(b + c)} \quad (7)$	χ^2 : Prüfgröße b, c : Anzahl Ereignisse
--	--

Da die dem TDT zugrundeliegenden genetischen Assoziationen über kurze genetische Distanzen wirksam sind (selten mehr als ein Million Basenpaare), und der Test separat für jedes Allel an jedem Locus durchgeführt werden muss, eignet er sich wie im vorliegenden Fall für kurze Distanzen mit begrenzter Markerzahl (Strachan et al. 1999). Für multiples Testen erfolgt eine Korrektur nach Bonferroni (Benjamini et al. 1995). Ein positiver Wert für einen Marker führt zu einer weiteren Eingrenzung der Kandidatenregion. Die statistische Betreuung dieser Arbeit erfolgte durch das Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg (Prof. Dr. Andreas Ziegler).

3.6.5 Tests auf Plausibilität

Die genotypisierten Marker wurden auf Plausibilität bzw. innere Konsistenz geprüft. Unplausible Daten sind beispielsweise das Vorkommen eines kindlichen Alleles, das nicht einem Elternteil zugeordnet werden kann. Hierzu wurde eine modifizierte Version der Software PEDCHECK (Version 1.1) (O'Connell et al. 1998) benutzt. Wurden nicht plausible Daten gefunden, wurden die Fehler entweder eindeutig gelöst oder die Probanden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Nach zehn von PEDCHECK gefundenen Inkonsistenzen führte die Fehleranalyse zum Ausschluss von fünf Familien sowie vollständiger Korrektur der übrigen Werte. Die Übereinstimmung der gewonnenen Daten mit Informationen aus der Location Database (LDB) wurde mit Hilfe des CRI-MAP-Programmes sichergestellt. Durch die Verwendung von GENEHUNTER (Version 2) konnten Doppelrekombinanten identifiziert werden. Sie wurden entweder durch Re-Typisierung aufgeklärt oder die Markerinformation nicht verwendet, da Doppelrekombinanten keine verwertbare Kopplungsinformation enthalten. In neun Fällen erfolgte keine Verwendung der Markerinformation. Die Allelfrequenzen wurden durch das Zählen der Allele der Indexprobanden geschätzt. Der Informationsgehalt der Meiosen wurde mit dem Programm MAPMAKER/SIBS (Version 2) bestimmt.

3.6.6 Haplotypen-Vergleich

Auf einem Chromosom sehr nahe beieinander liegende Loci werden selten durch Rekombinationsereignisse getrennt (Morgan 1911). Demzufolge werden Allele auf einem kleinen Chromosomensegment bevorzugt gemeinsam vererbt. Eine solche Gruppe von Allelen bezeichnet man als Haplotyp. Werden diese Allele nicht durch Rekombination getrennt, können diese Allelgruppen zu Kartierungszwecken wie ein einziges hochpolymorphes Allel behandelt werden (Kruglyak et al. 1996).

Nicht alle Phänotyp-Genotyp-Assoziationen werden durch ein Kopplungs-Ungleichgewicht hervorgerufen. So gibt es noch weitere Gründe, die die Assoziation zwischen dem noch unbekanntem Adipositas auslösenden Gen und den jeweiligen Marker-Allelen verursachen können:

- Direkte Verursachung: Das Marker-Allel verursacht mittel- oder unmittelbar den Phänotyp Adipositas. In diesem Fall könnte jedoch erwartet werden, dass immer das gleiche Marker-Allel in verschiedenen Populationen gefunden wird (es sei denn dass verschiedene Ursachen für den Phänotyp in den Populationen vorliegen).
- Natürliche Auslese: Individuen mit dem Phänotyp Adipositas haben durch das Vorhandensein von Marker-Allel A eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit (z.B. im Rahmen einer Hungersnot)
- Schichtung: mehrere genetisch verschiedene Untergruppen existieren parallel in der untersuchten Population. Durch puren Zufall kann nun das auffällige Marker-Allel in einem bestimmten Teil der Bevölkerung höherfrequent auftreten und Kopplung vortäuschen. Lander und Schork beschreiben als Beispiel das gemeinsame Vorkommen von HLA-A1 und Fähigkeit, mit Stäbchen zu essen (Lander et al. 1994). HLA-A1 ist in einer asiatischen Population häufiger als in einer kaukasischen vertreten.
- statistisches Artefakt: Assoziations- und Kopplungsstudien testen oft einen ganzen Bereich von Loci mit mehreren Allelen. Damit müssen die ermittelten p-Werte für multiples Testen korrigiert werden.
- Kopplungsungleichgewicht: durch Kopplung hervorgerufene Assoziation bestimmter Marker-Allele in der Population; dies setzt voraus, dass die meisten adipositas-auslösende Gene auf Chromosom 10 von nur einem oder einigen wenigen Ur-Chromosomen abstammen. In der Nähe des Marker-Alleles befindet sich dann ein Mutationen enthaltendes Gen, das für die Ausprägung des untersuchten Phänotyps verantwortlich gemacht werden kann. Dabei muss in verschiedenen Populationen nicht notwendigerweise immer das gleiche Marker-Allel aufgefunden werden.

3.7 Materialien

Im folgenden Abschnitt ist eine vollständige Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien sowie deren Bezugsquellen enthalten.

3.7.1 Puffer / Chemikalien

Alle verwendeten Lösungen wurden mit Aqua Bidestillata angesetzt. pH-Angaben gelten, wenn nicht anders erwähnt, für Raumtemperatur.

3.7.2 DNA-Extraktion

- Pronase E, Fa. Sigma USA

Red Cell Lysis Buffer (RCLB), pH 7,6	Substanz	Konzentration
	Tris-Aminomethan	10 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NaCl	10 mM

Tabelle 8

Pronase E-Mix	Substanz	Konzentration
	SE-Puffer	5 ml / Probe
	Pronase E (10 mg/ml)	25 µl / Probe
	SDS (10 %)	500 µl / Probe

Tabelle 9

Natrium-EDTA-Puffer (SE-Puffer), pH 8,0	Substanz	Konzentration
	NaCl	75 mM
	Na ₂ EDTA	25 mM

Tabelle 10

Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 8,0	Substanz	Konzentration
	Tris-Aminomethan	10 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM

Tabelle 11

3.7.3 PCR

PCR-Puffer 10x-Puffer, pH 8,3	Substanz	Konzentration
	KCl	500 mM
	Tris-HCl	100 mM
	Triton X-100	1 %

Tabelle 12

- Taq-Polymerase, Fa. MWG Biotech GmbH, Deutschland
- MgCl₂, Fa. MWG Biotech GmbH, Deutschland
- DNA Polymerization Mix (dNTP Mix), Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA

3.7.4 Sequenz-Analyse

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer), pH 8,3 - 8,7	Substanz	10x Konzentration
	Tris-Aminomethan	0,89 M (108 g/l)
	Borat	0,89 M (55 g/l)
	Na ₂ EDTA	0,02 M (7,4 g/l)

Tabelle 13

LiCor 25 cm Gel (25 ml Lösung)	Substanz	Menge
	Harnstoff	10,5 g
	Long-Ranger-Lösung	4,0 ml
	10x TBE-Puffer	2,5 ml
	H ₂ O (Aqua bidest.)	ad 25,0 ml
	TEMED	25,0 µl
	APS 10%	175,0 µl

Tabelle 14

- Long Ranger Gel Solution, FMC, #50611
- Formamide Loading Dye, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, USA
- LiCor STR-Marker (700 nm, 800 nm), Fa. LI-COR, Inc., USA

3.7.5 Mikrosatellitenmarker und Oligonukleotide

Durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotide oder auch Primer wird durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Amplifikation hochrepetitiver Bereiche der menschlichen DNA , sogenannter Mikrosatellitenmarker, ermöglicht.

Oligonukleotide

Die hier eingesetzten Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech GmbH, Ebersberg hergestellt. Die Primer waren am 5'-Ende entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD700 oder IRD800 markiert. Die Zahl verweist dabei auf die unterschiedlichen Laserfrequenzen in Nanometern, die die Fluoreszenz auslösen. Die Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe ermöglichte die gleichzeitige Analyse verschiedener Amplifikate. Die durchgeführten Experimente wurden hierdurch jedoch nicht negativ im Sinne einer Alteration der PCR oder der Auswertung beeinflusst.

Mikrosatellitenmarker

Mikrosatelliten sind Bereiche hochrepetitiver DNA, die in einer Population eine hohe Heterozygotität aufweisen. Durch das Auftreten vieler Allele an einem Markerlokus kann eine vom Zufall abweichende Segregation des Marker auf eine Kopplung an ein nahegelegenen Adipositas-QTL hinweisen. Tabelle 15 bis Tabelle 21 fassen die Daten der verwendeten Oligonukleotide und der nach PCR entstehenden Amplimere zusammen. Aus der Gen-Datenbank entnommene Sequenzen der Primer sind dargestellt. Zusätzlich werden die für die kaukasische Population in der Genome Database (GDB) zu findende Heterozygotität (Het), die Allelgrößen und -frequenzen sowie Allelgrößen der CEPH-Referenz 1347-02 angegeben (Murray et al. 1994; Fondation Jean Dausset CEPH 2001). Die Angabe der Allelgrößen erfolgt in Basenpaaren (bp). Bei der CEPH-

Referenz handelt es sich um eine aus der Genotypendatenbank des Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) stammende DNA-Probe (Familie 1347, weiblicher Proband 02) für die die Allelgrößen der verschiedenen Marker zentral ermittelt wurden, und die durch Vergleich mit der eigenen Genotypisierung eine interne Kontrolle ermöglichen. Der mittels Location Database (LDB) ermittelte Abstand vom Centromer und somit die p-terminale Position auf Chromosom 10 ist in Centimorgan (cM) angegeben.

Marker	Δ Cen (cM)	Het (GDB)	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S1639	-8,39	0,84	257/267	251-271	251	0,170
Primer					257	0,190
Fwd	5'-GGAGAATCATTGAACTCAGG				259	0,040
	T _m 51,0 °C		5' IRD 700		263	0,070
Rev	5'-ATATTGGAGCGAATCTGTAGG				265	0,130
	T _m 52,0 °C				267	0,240
					269	0,070
					271	0,090

Tabelle 15

Marker	Δ Cen (cM)	Het (GDB)	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S1732	-6.28	0.78	161/161	151-171	151	0.018
Primer					153	0.036
Fwd	5'-GGAACCTAAGGCATGTTGAT				159	0.018
	T_m 55,3 °C		5' IRD 800		161	0.357
Rev	5'-CCAAGACCCTGTCTGAAAAA				163	0.214
	T_m 55,3 °C				165	0.089
					167	0.161
					169	0.089
					171	0.018

Tabelle 16

Marker	Δ Cen (cM)	Het	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S1426	-5.34	0.74	152/156	152-180	152	0.019
Primer					156	0.130
Fwd	5'-TGGTGGTGTGCATCCTCTTT				160	0.222
	T_m 54,0 °C		5' IRD 700		164	0.407
Rev	5'-CTCTTAACTGATTGGCCGA				168	0.185
	T_m 52,0 °C				172	0.019
					180	0.019

Tabelle 17

Marker	Δ Cen (cM)	Het	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S208	-3.69	0.79	182/184	170-186	170	0.036
Primer					172	0.018
Fwd 5'-AGGTGACTGTTTTGGGGGAG					174	0.071
T _m 59,4 °C 5' IRD 700					176	0.018
Rev 5'-GAGTGTGGGGATGTTTTCAA					178	0.071
T _m 55,3 °C					180	0.268
					182	0.232
					184	0.268
					186	0.018

Tabelle 18

Marker	Δ Cen (cM)	Het	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S183	-4.85	0.83	-	124-158	124	0.060
Primer					136	0.020
Fwd 5'-GGGAATGTGACATTTATGTTTTTC					140	0.020
T _m 55,9 °C 5' IRD 700					144	0.040
Rev 5'-AGCATAAACATTCAGACATCC					146	0.100
T _m 54,0 °C					148	0.160
					150	0.320
					152	0.160
					154	0.080
					158	0.040

Tabelle 19

Marker	Δ Cen (cM)	Het	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S1654	-2.95	0.67	255/263	255-263	255	0.518
Primer					257	0.143
Fwd 5'-GTGCCTGGCCTAAAGTGAA					259	0.161
T _m 56,7 °C 5' IRD 700					261	0.125
Rev 5'-AGCATAAACATTCAGACATCC					263	0.054
T _m 54,0 °C						

Tabelle 20

Marker	Δ Cen (cM)	Het	CEPH 1347-02	Range (bp)	Größe (GDB)	Frequenz (GDB)
D10S1768	-2.64	0.63	177/177	163-181	163	0.070
Primer					171	0.160
Fwd 5'-AGAAGCCGTGTCTGCC					173	0.020
T _m 52,0 °C 5' IRD 800					175	0.020
Rev 5'-CCCAGGGACTTAGGGTG					177	0.570
T _m 56,0 °C					179	0.120
					181	0.040

Tabelle 21

3.8 Geräte und Firmen

3.8.1 Geräte und Herstellerangaben

Es folgt eine Auflistung der verwendeten Geräte. Ausführliche Angaben zu den Herstellern finden sich in der weiter unten angegebenen Firmenliste.

- Aqua-bidest Aufbereiter, Millipore MilliRO 10, Milli-Q+; Millipore Corp.
- Heraeus-Kühlzentrifuge, Megafuge 2.0R; Heraeus Holding GmbH
- Heraeus-Zentrifuge, Biofuge 13; Heraeus Holding GmbH
- LiCor 4202 Series DNA Analysis Systems; LI-COR, Inc.
- Pharmacia Biotech Photometer, GeneQuant II;
Amersham Pharmacia Biotech, Inc.
- Sarstedt-Monovette, Heparin; Sarstedt AG & Co
- Sarstedt-Filter, Minisart SM16555; Sarstedt AG & Co
- Thermocycler GeneAmp PCR Systems 9600, Perkin Elmer; Perkin Elmer
Applied Biosystems

3.8.2 Firmen

- Amerham Pharmacia Biotech, Inc.; 800 Centennial Avenue, P.O. Box 1327,
Piscataway NJ 08855-1327, USA; www.apbiotech.com
- BioWhittaker Molecular Applications, Inc.; 191 Thomaston Street, Rockland,
Maine 04841, USA; www.bioproducts.com (früher FMC Bioproducts)
- Boehringer Ingelheim Pharma KG; Binger Straße 173, 55216 Ingelheim am
Rhein, Deutschland; zimmerch@ing.boehringer-ingelheim.com;
www.boehringer-ingelheim.de
- Helios Software Solutions; Carr Brook House, Chorley Old Road, Brindle,
CHORLEY PR6 7QZ, England; www.textpad.com

- Heraeus Holding GmbH; Heraeusstr. 12-14, 63450 Hanau, Deutschland;
www.heraeus.de
- Hoefler Scientific Instruments; 654 Minnesota Street, San Francisco CA
94107, USA
- LI-COR, Inc.; 4308 Progressive Ave; Lincoln, NE 68504-1325, USA;
www.licor.com
- Merck KGaA; Frankfurter Str. 250, Darmstadt D-64293, Deutschland;
www.merck.de
- Millipore Millipore Corp; 80 Ashby Road, Bedford MA 01730-2271, USA;
www.millipore.com
- MWG Biotech; Anzinger Str. 7a, D-85560 Ebersberg, Deutschland; in-
fo@www.mwgdna.de; www.mwg-biotech.com
- Perkin Elmer Applied Biosystems; 710 Bridgeport Avenue; Shelton, Con-
necticut, USA; info@perkinelmer.com; www.perkinelmer.com
- Qiagen GmbH, Max-Volmer-Straße 4, D-40724 Hilden; www.qiagen.com
- Roth Carl GmbH & Co KG; Schoemperlenstr. 3, D-76185 Karlsruhe,
Deutschland
- Sarstedt AG & Co; Postfach 12 20, D-51582 Nümbrecht, Deutschland;
www.sarstedt.com
- Scanalytics, Inc.; 8550 Lee Highway; Suite 400; Fairfax, VA 22031; USA;
Email: info@scanalytics.com; www.scanalytics.com
- Sigma Chemical Corporation; 3050 Spruce Street, Saint Louis MO 63103,
USA; www.sigma.sial.com

3.8.3 Software

Der Zugriff auf genanalytische Software und weitere in dieser Dissertation verwendete Programme ist großteils über das Internet mittels folgender Uniform Resource Locator (URL) möglich (Stand September 2001):

- Software-Portal; <http://linkage.rockefeller.edu/soft>
- CRI-MAP; <http://compgen.rutgers.edu/multimap/crimap/index.html>
- PedCheck; http://watson.hgen.pitt.edu/register/soft_doc.html
- GeneHunter; <http://www.fhcrc.org/labs/kruglyak/Downloads>
- MLBGH; <ftp://ftp.biomath.jussieu.fr/pub/mlbgh>
- Mapmaker/Sibs; <ftp://ftp-genome.wi.mit.edu/distribution/software/sibs>
- OneDScan, Version 1.3, Scanalytics Inc.
- TextPad32, Version 2.20, Helios Software Solutions

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben zentromernahe Marker auf Chromosom 10p hinsichtlich Kopplung zum Phänotyp Adipositas an 509 Individuen (Indexprobanden, Geschwister und Eltern) aus 123 Familien mit mindestens zwei adipösen Geschwistern untersucht. Die im Labor durch Genotypisierung gewonnenen Allelgrößen für jeden einzelnen Marker wurden nach den vorher beschriebenen Methoden statistisch analysiert. Auf die Durchführung der LOD-Score-Analyse folgte zur Feinkartierung die Testung auf ein Transmissionsungleichgewicht für jeden einzelnen Marker.

Sämtliche Proben wurden doppelt unabhängig ausgewertet, die Auswertungen verglichen und Unklarheiten geklärt oder die Proben gegebenenfalls retypisiert. Derartige Retypisierungen waren in etwa 1% der Fälle notwendig. Sowohl beim Marker *D10S183* als auch beim Marker *D10S1732* passte jeweils ein Kind nicht zu dem Vater. Bei allen anderen Markern führten diese Familien zu keinen Unstimmigkeiten, die Marker segregierten korrekt. Trotz dreimaliger Wiederholung der gesamten Analyse ließ sich der Widerspruch nicht auflösen. Damit handelt es sich womöglich um Neumutationen der betreffenden Marker. Diese Familien wurden für den betroffenen Marker von der Analyse ausgeschlossen und flossen somit nicht in die Auswertung mit ein. Da die gleichen Familien zuvor schon in zahlreiche Untersuchungen eingegangen waren, erscheint es unwahrscheinlich, dass Nicht-Paternität vorliegt.

4.1 Allelfrequenzen und Basenpaarlängen

Tabelle 22 zeigt zusammenfassend die berechneten Allelfrequenzen und Basenpaarlängen der untersuchten Marker. Für alle Marker wurden die Allelgrößen und -frequenzen mit den von CEPH-Referenzfamilien (Murray et al. 1994) gewonnen Daten verglichen. Dabei wurde auf die CEPH-Datenbank, Version 9.0 (www.cephb.fr) zugegriffen. Die Allelgrößen wurden durch Typisierung der Referenzperson 1347-02 kalibriert.

Für den Marker *D10S183* liegt keine Typisierung der Familie 1347 in der CEPH-Datenbank vor. Somit lagen keine Vergleichsgrößen für die Referenzperson

1347-02 vor. Ein Vergleich der ermittelten und der in der Datenbank veröffentlichten Allelfrequenzen jedoch belegt die Plausibilität der im Rahmen dieser Dissertation ermittelten Daten. Bei sämtlichen Markern konnten zusätzliche Allele ermittelt werden, die noch nicht in der Datenbank verzeichnet sind. Die eigenen Daten werden den Referenzdaten aus der CEPH-Datenbank gegenübergestellt. Es zeigt sich die weitestgehende Übereinstimmung der Allelfrequenzen und des Größenbereiches (Range) aller untersuchter Marker mit den CEPH-Daten.

4.1.1 Quantität und Qualität der PCR-Produkte

Durch die Amplifikation hochrepetitiver DNA kann es zum Auftreten von sogenannten Stotterbanden kommen. Je nach Größe des repetitiven Elementes in einem Mikrosatelliten sind diese Banden durch Versatz typischerweise $n \cdot 2$ Basenpaare kleiner als das untersuchte Allel. Dieser Versatz kann durch Slipping-Mechanismen bei der Amplifikation bedingt sein. (Murray et al. 1993; Schmerer et al. 1997). Die Fehlamplifikate sind jedoch leicht anhand ihrer Länge und ihrer geringeren Konzentration im Amplifikat von den Mikrosatellitenmarkern zu unterscheiden.

PCR-Bedingungen und Primerbindung

Den größten Einfluss auf Quantität und Qualität der PCR-Produkte, die Fehlerate der DNA-Polymerase oder den Anteil unspezifischer Reaktionsprodukte, haben die Reaktionsbedingungen. Die Quantität der erhaltenen Amplifikate wird vor allem durch eine unspezifische Primerbindung herabgesetzt (Rychlik 1995). Es kommt zu einer kompetitiven Hemmung der Polymerase durch die Anwesenheit unvollständiger Reaktionsprodukte. Durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen für jedes Primerpaar wurden in 30 PCR-Zyklen spezifische Amplifikate in ausreichender Menge erhalten. Die hohe Sensitivität des LiCor-4202-Infrarot-Gel-Scanners machte im Gegenteil sogar oft noch eine hohe Verdünnung der Amplifikate notwendig.

Fehlerrate der eingesetzten *Taq*-Polymerase

Infolge der fehlenden 3'→5' Exonuklease-Aktivität der eingesetzten *Taq*-Polymerase beträgt unter den bestmöglichen Reaktionsbedingungen die Fehlerrate der Polymerase 8×10^{-6} (Cline et al. 1996). Unter nicht-experimentellen gewöhnlichen PCR-Bedingungen wird die Fehlerrate dieser Polymerase mit 6×10^{-3} angegeben (Hengen 1995). Dies bedeutet, dass während der Amplifikation eines 350 bp Fragments etwa zwei Nukleotide falsch eingebaut werden. Geschieht dieser Einbau während der ersten Zyklen, so würde in den nachfolgenden Analysen eine Allelvariante detektiert. Die Gefahr einer Amplifikation zu großer oder zu kleiner Allele wird durch den repetitiven Charakter der amplifizierten Sequenzen noch erhöht (Hite et al. 1996; Koreth et al. 1996; Schmerer et al. 1997). Die Wahrscheinlichkeit für eine gleichsinnige Allelveränderung innerhalb eines Familien-Haplotyps bei allen verwendeten Markern ist äußerst gering, so dass ein falsch amplifiziertes oder ausgewertetes Allel durch einen inkongruenten Familienstammbaum auffiel und durch erneute PCR und Retypisierung korrigiert wurde. Somit können Polymerasefehler nahezu ausgeschlossen werden.

Kontamination mit DNA

Die hohe Sensitivität der PCR stellt große Anforderungen an kontaminationsfreies Arbeiten, insbesondere da humane Sequenzen amplifiziert wurden. In Folge dieser hohen Sensitivität der PCR kann es bei Arbeiten zu einer Kontamination mit DNA kommen. Besonders hervorzuheben ist die Kontamination mit PCR-Produkten, da hierdurch falsch-positive Amplifikate erzeugt werden können. Um dies auszuschließen, wurde zu jeder PCR eine Negativkontrolle (*aqua bidest.* anstelle von DNA) durchgeführt. Weiterhin wurde einer Kontamination durch die räumliche Aufteilung des Labors in einen Vor- und Nach-PCR-Bereich entgegengewirkt.

Fehlerrate in der Auswertung

Eine äußerst geringe Fehlerrate in der Auswertung ist besonders für Allele mit einer geringen Frequenz wichtig. Eine geringe Anzahl falsch bestimmter Genotypen führt hier schon zu einer irrtümlichen Annahme oder Ablehnung

der Nullhypothese. Eine Reduktion der Fehlerrate wurde einerseits durch eine zweite, unabhängige Auswertung der Versuchsergebnisse erreicht. Andererseits wurde durch Einsatz einer DNA bekannten Genotyps in jedem Reaktionsansatz (CEPH 1347-02) die korrekte Detektion der Allele überprüft. Durch die Bildung von Haplotypen innerhalb der Familien und den Vergleich der Allelfrequenzen mit Referenzfamilien der CEPH-Datenbank konnte eine korrekte Typisierung mit Sicherheit gewährleistet werden.

Allelfrequenzen und Basenpaarlängen der Marker (CEPH und eigene Daten)

	CEPH-Datenbank (Version 9.0)			Chromosom 10 Feinkartierung, eigene Daten			
Marker	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	CEPH 1347-02
D10S1426	152-180	152	0,019	152-178	152	0,008	✓
		156	0,130		156	0,138	✓
		160	0,222		160	0,250	
		164	0,407		164	0,301	
		168	0,185		168	0,270	
		172	0,019		172	0,024	
		180	0,019		176	0,008	
					178	0,003	

	CEPH-Datenbank (Version 9.0)			Chromosom 10 Feinkartierung, eigene Daten			
Marker	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	CEPH 1347-02
D10S1639	251-271	251	0,167	247-275	247	0,002	
		257	0,185		249	0,002	
		259	0,037		251	0,265	
		263	0,074		253	0,008	
		265	0,111		255	0,002	
		267	0,259		257	0,176	✓
		269	0,074		259	0,041	
		271	0,093		261	0,014	
					263	0,129	
					265	0,116	
					267	0,150	✓
					269	0,050	
					271	0,038	
					273	0,002	
					275	0,002	

	CEPH-Datenbank (Version 9.0)			Chromosom 10 Feinkartierung, eigene Daten			
Marker	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	CEPH 1347-02
D10S1654	255-263	255	0,518	253-263	253	0,009	
		257	0,143		255	0,429	✓
		259	0,161		257	0,097	
		261	0,125		259	0,240	
		263	0,054		261	0,196	
					263	0,028	✓
D10S1732	151-171	151	0,018	151-173	151	0,010	
		153	0,036		153	0,055	
		159	0,018		157	0,008	
		161	0,357		159	0,055	
		163	0,214		161	0,249	✓, ✓
		165	0,089		163	0,203	
		167	0,161		165	0,074	
		169	0,089		167	0,228	
		171	0,018		169	0,104	
					171	0,014	
					173	0,003	

	CEPH-Datenbank (Version 9.0)			Chromosom 10 Feinkartierung, eigene Daten			
Marker	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	CEPH 1347-02
D10S183	124-158	124	0,060	126-160	126	0,063	
		136	0,020		136	0,018	
		140	0,020		140	0,012	
		144	0,040		142	0,034	
		146	0,100		144	0,084	
		148	0,160		146	0,088	
		150	0,320		148	0,137	
		152	0,160		150	0,219	✓
		154	0,080		152	0,141	✓
		158	0,040		154	0,118	
					156	0,046	
					158	0,035	
					160	0,003	

	CEPH-Datenbank (Version 9.0)			Chromosom 10 Feinkartierung, eigene Daten			
Marker	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	CEPH 1347-02
D10S208	170-186	170	0,036	164-188	164	0,011	
		172	0,018		170	0,021	
		174	0,071		172	0,008	
		176	0,018		174	0,057	
		178	0,071		176	0,023	
		180	0,268		178	0,127	
		182	0,232		180	0,196	
		184	0,268		182	0,317	✓
		186	0,018		184	0,195	✓
					186	0,041	
					188	0,005	

	CEPH-Datenbank (Version 9.0)			Chromosom 10 Feinkartierung, eigene Daten			
Marker	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	Range (bp)	Allel (bp)	Frequenz	CEPH 1347-02
D10S1768	163-181	163	0,071	163-181	163	0,089	
		171	0,161		165	0,004	
		173	0,018		171	0,242	
		175	0,018		173	0,043	
		177	0,571		175	0,058	
		179	0,125		177	0,407	
		181	0,036		179	0,134	✓, ✓
					181	0,022	

Tabelle 22

4.2 LOD-Scores

Aus den gewonnenen Daten konnten nach dem oben beschriebenen MLB-Verfahren mit MLBGH die unten angegebenen Two-Point-MLB-LOD-Scores (2p-LOD-Score) berechnet werden. Tabelle 23 gibt die für jeden einzelnen Marker ermittelten MLB-LOD-Scores sowie die korrespondierenden p-Werte an. Die analysierten Marker überspannen eine Region von etwa 5 cM. Die Kopplungsanalyse liefert den maximalen Wert bei dem am weitesten distal gelegenen Marker *D10S1639* mit einem MLB-LOD-Score von 1,26 ($p = 0,0080$). Die Analyse der centromernäheren Marker *D10S1732*, *D10S1426*, *D10S183*, *D10S208*, *D10S1654* und *D10S1768* ergibt in Richtung Centromer abfallende LOD-Scores, wobei mit dem centromernähesten Marker *D10S1768* mit 0,32 der kleinste Wert erreicht wird. Für sechs der sieben Marker werden nominale p-Werte $< 0,05$ erreicht. Eine grafische Darstellung der Werte zeigt Abbildung 8.

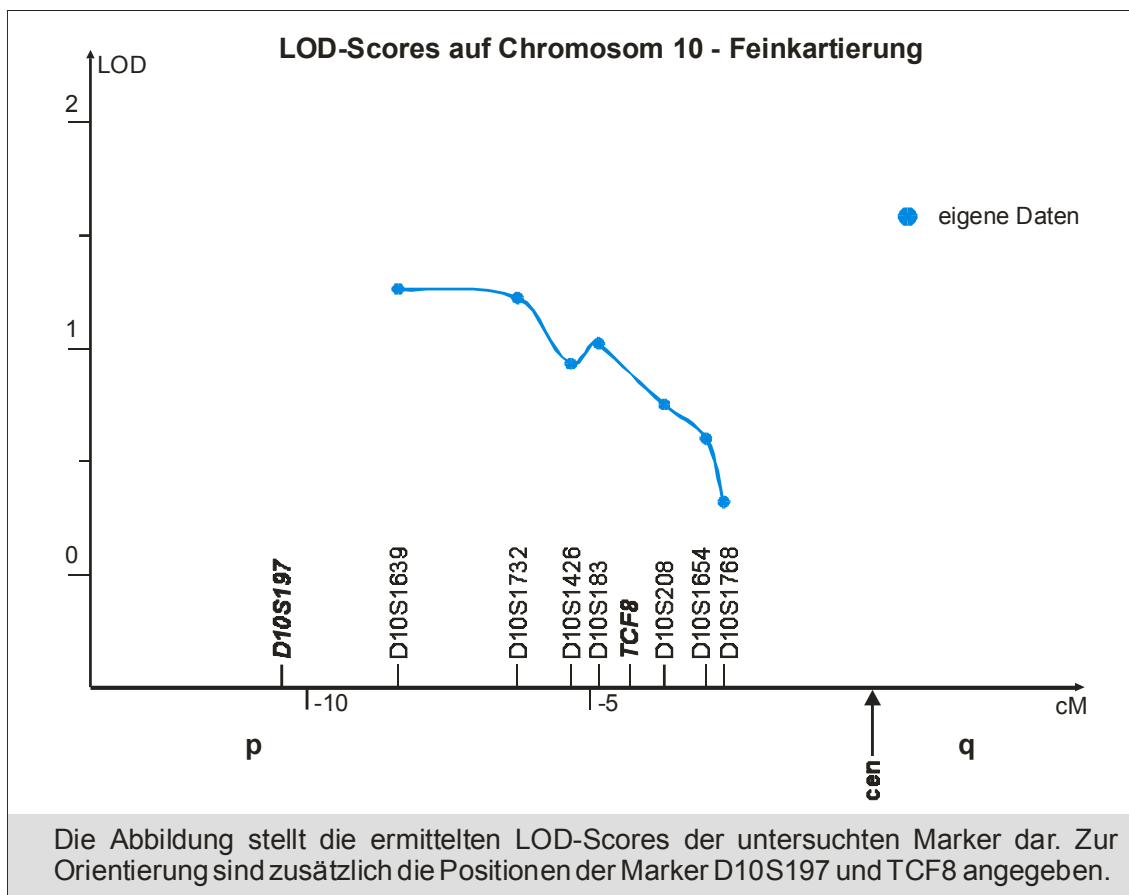


Abbildung 8

Die ermittelten LOD-Scores sind in Abbildung 9 im Verhältnis zu den in der Vorstudie von Hinney et al. ermittelten Daten aufgetragen. Es zeigt sich, dass der initial bei *TCF8* gelegene Peak durch die Feinkartierung nicht reproduziert werden konnte. Vielmehr liegt der den höchsten Peak liefernde Marker *D10S1639* etwa 4,09 cM weiter vom Centromer entfernt als *TCF8* und somit 2,06 cM proximal von *D10S197*.

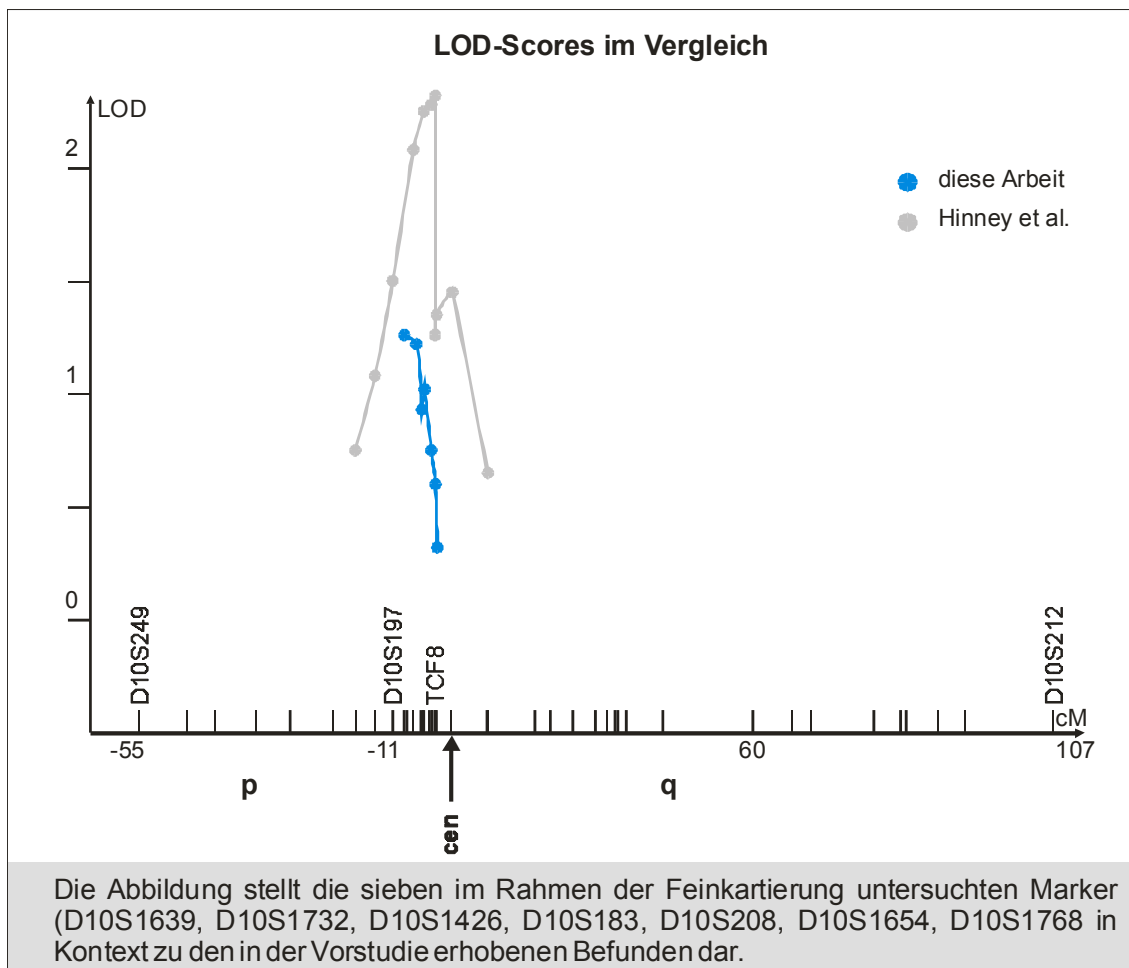


Abbildung 9

Ergebnisse der Maximum-Likelihood-Binomial-Analyse für jeden Marker

Marker-Name	Δ Cen (cM)	MLB-LOD-Score	p-Wert
D10S1639	-8,39	1,26	0,0080
D10S1732	-6,28	1,22	0,0088
D10S1426	-5,34	0,93	0,0195
D10S183	-4,85	1,02	0,0150
D10S208	-3,69	0,75	0,0315
D10S1654	-2,95	0,60	0,0486
D10S1768	-2,64	0,32	0,1111

Tabelle 23

Für alle oben aufgeführten Marker wurde in einem zweiten Schritt der TDT für das Allel mit der höchsten Frequenz durchgeführt (Ziegler 1999).

4.3 TDT-Test - explorative Analysen

Mittels TDT wurde zusätzlich eine überzufällig häufige Transmission spezifischer Allele an adipöse Indexprobanden geprüft. Dies trifft besonders für Loci mit geringem Effekt und kleiner Allelzahl in einer Population zu (Lander et al. 1995). Nach Bildung von Trios zur Durchführung des TDT wurden die Genotypisierungen von Eltern und Kinder aus 93 Familien mit den bereits beschriebenen Methoden analysiert. In Tabelle 24 sind die einzelnen Ergebnisse aufgeführt.

Für jeden Marker wurde bei den Eltern der Indexprobanden ein Allel transmittiert, bzw. nicht transmittiert. Bei homozygoten Eltern ergibt sich daraus für den TDT-Test keine verwertbare Information. Der sich bei heterozygoten Eltern ergebende Transmissions-Unterschied ist für keinen der untersuchten Marker signifikant. Nach Korrektur für multiples Testen mit sieben Markern ist das nominelle Signifikanzniveau mit einem Freiheitsgrad erreicht bei $\chi^2 > 7,24$ (p-Wert $< 0,007$). Diese Kriterien werden von keinem der Marker und Allele erfüllt. Tabelle 24 stellt die Ergebnisse des TDT-Tests für das Allel mit der höchsten Frequenz dar. In Tabelle 25 sind die explorativ für alle Markerallele

berechneten Daten angegeben. Die Analyse des geschlechtsabhängigen Transmissionsungleichgewichtes (Paterson et al. 1999) ergab keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen.

**Ergebnisse des TDT-Tests
für das Allel mit der höchsten Frequenz für jeden Marker**

Marker-Name	Allellänge (bp)	trans	untrans	Frequenz	χ^2	p-Wert
D10S1639	251	116	110	0,265	0,16	0,690
D10S1732	161	112	87	0,249	3,14	0,076
D10S1426	164	119	119	0,301	0,00	1,000
D10S183	150	111	93	0,219	1,59	0,208
D10S208	182	123	129	0,317	0,14	0,705
D10S1654	255	141	133	0,429	0,23	0,629
D10S1768	177	57	59	0,407	0,03	0,853

Tabelle 24

Darstellung aller ermittelten Allelfrequenzen und explorative Analysen

Marker-Name	Allellänge (Bp)	trans	untrans	Frequenz	Chi ²	p-Wert
D10S1639	247	0	2	0,002	2,00	0,157
	249	1	1	0,002	0,00	1,000
	251	116	110	0,265	0,16	0,690
	253	1	6	0,008	3,57	0,059
	255	2	0	0,002	2,00	0,157
	257	79	71	0,176	0,43	0,514
	259	13	22	0,041	2,31	0,128
	261	9	3	0,014	3,00	0,083
	263	52	58	0,129	0,33	0,567
	265	51	48	0,116	0,09	0,763
	267	60	68	0,150	0,50	0,480
	269	21	22	0,050	0,02	0,879
	271	19	13	0,038	1,12	0,289
	273	0	2	0,002	2,00	0,157
	275	2	0	0,002	2,00	0,157

Marker-Name	Allellänge (Bp)	trans	untrans	Frequenz	Chi ²	p-Wert
D10S1639	247	0	2	0,002	2,00	0,157
D10S1732	151	4	4	0,010	0,00	1,000
	153	21	23	0,055	0,09	0,763
	157	0	6	0,008	6,00	0,014
	159	22	22	0,055	0,00	1,000
	161	112	87	0,249	3,14	0,076
	163	72	90	0,203	2,00	0,157
	165	32	27	0,074	0,42	0,515
	167	92	90	0,228	0,02	0,882
	169	38	45	0,104	0,59	0,442
	171	5	6	0,014	0,09	0,763
	173	2	0	0,003	2,00	0,157
D10S1426	152	3	3	0,008	0,00	1,000
	156	49	60	0,138	1,11	0,292
	160	113	85	0,250	3,96	0,047
	164	119	119	0,301	0,00	1,000
	168	99	115	0,270	1,20	0,274
	172	8	11	0,024	0,47	0,491
	176	4	2	0,008	0,67	0,414
	178	1	1	0,003	0,00	1,000
D10S183	126	27	32	0,063	0,42	0,515
	136	12	5	0,018	2,88	0,090
	140	9	2	0,012	4,45	0,035
	142	16	16	0,034	0,00	1,000
	144	29	49	0,084	5,13	0,024
	146	40	42	0,088	0,05	0,825
	148	68	59	0,137	0,64	0,425
	150	111	93	0,219	1,59	0,208
	152	58	73	0,141	1,72	0,190
	154	50	60	0,118	0,91	0,340
	156	25	18	0,046	1,14	0,286
	158	18	15	0,035	0,27	0,602
	160	2	1	0,003	0,33	0,564

Marker-Name	Allellänge (Bp)	trans	untrans	Frequenz	Chi ²	p-Wert
D10S1639	247	0	2	0,002	2,00	0,157
D10S208	164	3	6	0,011	1,00	0,317
	170	11	6	0,021	1,47	0,225
	172	3	3	0,008	0,00	1,000
	174	15	30	0,057	5,00	0,025
	176	10	8	0,023	0,22	0,637
	178	54	47	0,127	0,49	0,486
	180	79	77	0,196	0,03	0,873
	182	123	129	0,317	0,14	0,705
	184	79	76	0,195	0,06	0,810
	186	17	16	0,041	0,03	0,862
	188	4	0	0,005	4,00	0,046
D10S1654	253	2	4	0,009	0,67	0,414
	255	141	133	0,429	0,23	0,629
	257	28	34	0,097	0,58	0,446
	259	79	74	0,240	0,16	0,686
	261	60	65	0,196	0,20	0,655
	263	9	9	0,028	0,00	1,000
D10S1768	163	20	21	0,089	0,02	0,876
	165	1	1	0,004	0,00	1,000
	171	46	66	0,242	3,57	0,059
	173	7	13	0,043	1,80	0,180
	175	11	16	0,058	0,93	0,336
	177	95	93	0,407	0,02	0,884
	179	42	20	0,134	7,81	0,005
	181	9	1	0,022	6,40	0,011

Tabelle 25

5 Diskussion

Die von Hager und Hinney identifizierte Region auf Chromosom 10p wurde im Rahmen dieser Arbeit im Sinne einer Feinkartierung mit hochauflösenden Markern im Abstand von etwa 1 cM über eine Spannweite von 5,25 cM untersucht. Für sechs der sieben untersuchten Marker konnten signifikante LOD-Scores ermittelt werden. Die Ergebnisse der nachfolgend durchgeführten TDTs waren nicht signifikant.

Mit den vorliegenden und bereits früher erhobenen Befunden deutscher, französischer und amerikanischer Arbeitsgruppen (Hager et al. 1998; Lee et al. 1999; Hinney et al. 2000; Price et al. 2001) ist offensichtlich, dass der Phänotyp extreme Adipositas, sei er nun definiert durch absolute BMI-Grenzen oder BMI-Perzentilen, zur Analyse mittels Mikrosatellitenmarker geeignet ist.

Im vorliegenden Falle von intron-basierten multi-allelischen Mikrosatellitenmarkern ist es extrem unwahrscheinlich, dass das Marker-Allel Adipositas direkt verursacht, was genauso für die natürliche Auslese zutrifft. Denn eine hochpolymorphe nicht-codierende Genregion liefert nach bisherigen Vorstellungen keinen Selektionsvorteil. Statistische Artefakte konnten durch sorgfältige Planung der Studie weitgehend vermieden bzw. kalkuliert werden.

5.1 Genetik komplexer Phänotypen

Da viele monogene Erkrankungen mittlerweile definierten Genregionen zugeordnet und mehrere Gene kloniert werden konnten, ist die nächste Herausforderung die genetische Entschlüsselung der polygenen Erkrankungen.

Eine Standard-LOD-Score-Analyse ist meist ungenügend, da sie eine genaue Kenntnis über den Erbgang, die Genfrequenzen und die Penetranz des Genotyps erfordert. Somit stellt eine nicht-parametrische Analyse, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, einen vielversprechenden Ansatz dar. Früher und heute stellte die Definition des polygenen Phänotyps ein entscheidendes Problem dar, da sie die gesamte Analyse unmittelbar beeinflusst und die Reproduzierbarkeit erschweren kann. Dieses Problem wurde bereits

von Seltzer et al. (Seltzer et al. 1966) und vor ihm bereits im Ansatz von Bateson (Bateson 1902) erkannt.

So unterscheiden sich die in der Einleitung (siehe Seite 25) vorgestellten Studien in ihren Ergebnissen nicht zuletzt durch die untersuchten Phänotypen. Damit stellt es einen nicht zu unterschätzenden Erfolg dar, dass die Ergebnisse von Hager et al. (Hager et al. 1998), Hinney et al. (Hinney et al. 2000) und später auch Price et al. (Price et al. 2001) bestätigt werden konnten, obwohl verschiedene Populationen mit ähnlichen, wenn auch nicht gleichen Phänotyp-Definitionen verwendet wurden (absoluter BMI und BMI-Perzentilen). Dies spricht für das Vorliegen mindestens eines adipositas-relevanten Genes im untersuchten Bereich.

5.2 Auswahl des Patientengutes

Die Qualität einer Studie zur genetischen Entschlüsselung einer polygenen Erkrankung hängt in hohem Maße von der Definition der untersuchten Erkrankung ab. Nur die richtige und reproduzierbare Auswahl des Phänotyps läßt erfolgversprechende Untersuchungen zu. Der Phänotyp Adipositas wurde in verschiedenen Studien unterschiedlich interpretiert. So sind Rekrutierungen von Patienten unter anderem über das Körpergewicht, die Hautfaltendicke, den Körperfettgehalt oder den Body-Mass-Index (BMI) und weitere denkbare Kriterien möglich. Bereits in einer frühen Studie zu den genetischen Ursachen der Adipositas kommentiert Seltzer die Auswahl des Patientengutes: "The problem is indeed complex, and the complexity is further compounded by (...) the nature of the criteria of obesity used..." (Seltzer et al. 1966). Das ideale Kriterium zur Auswahl des Patientengutes sollte einfach zu bestimmen sein, eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen und streng mit Adipositas korreliert sein. Keines der oben genannten Kriterien erfüllt diese Bedingungen vollkommen. Als ein hervorragend reproduzierbares und gut zur Adipositas korreliertes Maß hat sich der BMI etabliert. Die Verwendung der BMI-Perzentilen aus der Nationalen Verzehrstudie (Hebebrand et al. 1994; Hesecker et al. 1995) verbessert zusätzlich die Auswahl der Probanden als das Gewichtsextrem aus der umgebenden Population.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß in einem Drittel der Elternpaare extrem adipöser Kinder und Jugendlichen beide Elternteile adipös sind (BMI > 90. Perzentile), liegt die Hypothese nahe, dass aufgrund der sozialen Stigmatisierung von Individuen mit Adipositas zunehmend häufiger Partner zusammenfinden, die beide adipös sind. Dies könnte über genetische und Umweltfaktoren zum Anstieg der Prävalenz der Adipositas im Kindes- und Jugendalter beitragen (Hebebrand et al. 2000).

Durch die verwandte Rekrutierungsstrategie waren stets die elterlichen Genotypen in nukleären Familien verfügbar, wodurch die Berechnung aller Allelfrequenzen erfolgen konnte. Da der Phänotyp kindliche Adipositas untersucht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das in der Kandidatenregion auf 10p vermutete Gen mitverursachend für früh einsetzende Adipositas ist. In den Studien zur Kandidatenregion auf 10p wurden ebenfalls Gewichtsextrema untersucht. Das Patientenkollektiv ist gegenüber der Studie von Hinney et al. (Hinney et al. 2000) um 30 Familien bzw. 123 Individuen nach oben genannter Rekrutierungsstrategie erweitert worden. Der direkte BMI-Wert-Vergleich zwischen Kindern- und Jugendlichen einerseits und Erwachsenen andererseits ist nicht sinnvoll. Jedoch kann die hohe durchschnittliche Perzentile ($\bar{x} = 98,4$) der Indexprobanden und Geschwister mit der extremen Adipositas der Erwachsenen in der deutschen Bevölkerung verglichen werden. Etwa 1,2 % der weiblichen und 0,2 % der männlichen Bevölkerung haben einen BMI > 40 kg/m² (Hebebrand et al. 1995).

5.3 MLB-LOD-Scores

Sechs der elf von Hinney et al. (Hinney et al. 2000) eingesetzten Marker zeigten in der Zwei-Punkt-LOD-Score-Analyse einen p-Wert < 0,05. Damit wird eine Kandidatenregion von etwa 20 cM Größe umschrieben. Von den sieben in dieser Arbeit im Bereich von 5 cM um den initialen Peak platzierten Markern zeigen sechs signifikante Kopplung zu dem untersuchten Phänotyp. Der außerhalb des Peaks liegende Marker *D10S1768* zeigt keine Kopplung. Somit gelingt die Darstellung der bereits an anderer Stelle (Hager et al. 1998; Hinney et al. 2000; Price et al. 2001) erhobenen Kopplungsbefunde auch im hier unter-

suchten erweiterten Patientenkollektiv. Die Region eignet sich aufgrund ihrer Größe nicht zur Klonierung.

5.4 TDT-Tests

In der Hoffnung die Region weiter einzugrenzen, erfolgte die Testung auf ein Transmissionsungleichgewicht für jeden Marker. Es wird davon ausgegangen, dass ein Locus mit einem möglicherweise adipositasverursachenden mutierten Allel und ein flankierendes Markerallel gemeinsam bei den untersuchten Nachfahren vorkommen, weil die gekoppelten Loci gemeinsam vererbt werden. Dies hat nun zur Folge, dass ein bestimmtes Markerallel oder ein Allelhaplotyp nicht-zufällig mit dem vermuteten Adipositas-Allel segregieren und ein Transmissionsungleichgewicht vorliegt. Der TDT -Test ist ein probates Mittel, um einen Schichtungseffekt zu vermeiden (Schaid 1998), da die von den Eltern *nicht* an die Kinder weitergegebenen Allele als interne Kontrolle dienen. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Eltern den Phänotyp der Kinder zeigen. Da Eltern verfügbar sein müssen, wird die Anwendung bei Erkrankungen bzw. Phänotypen erleichtert, die bereits im Kindes- und Jugendalter ausgeprägt sind. Die in dieser Dissertation angewandte Rekrutierungsstrategie von Kindern mit ihren Eltern ist im Sinne des TDT ideal. Das Signifikanzniveau ist für keinen der Marker erreicht. Damit gibt es im Sinne des TDT kein Hinweis auf den Markerallelen benachbarte Allele oder Haplotypen, die überzufällig häufig segregieren, womit eine Eingrenzung der Region nicht weiter gelingt. Die assoziierten Allele könnten unwahrscheinlich für sich selbst genommen Adipositasauslösend sein oder aber wahrscheinlich im Kopplungsungleichgewicht mit einem Adipositas-Gen sein. Dabei ist zu beachten, dass der TDT im Gegensatz zur LOD-Score-Analyse Kopplung nicht aufdecken kann, wenn kein Kopplungsungleichgewicht vorliegt (Spielman et al. 1996).

5.5 Abschließende Beurteilung

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, aufgrund von Vorbefunden (Hager et al. 1998; Hinney et al. 2000) eine Region auf Chromosom 10p feinzukartieren. Dabei wurde ein Bereich von etwa 5 cM distal des Centromers auf dem kurzen Arm des Chromosoms mittels sieben Mikrosatelliten-Markern auf Kopplung zum Phänotyp frühmanifeste Adipositas (BMI > 90. Perzentile) untersucht. Dazu wurde dieser Bereich bei 263 Individuen hinsichtlich einer Kopplung zum oben genannten Phänotyp feinkartiert. Sechs von sieben Markern lieferten signifikante Kopplungsbefunde. Somit konnte mit den untersuchten Markern ein Vorbefund bestätigt werden, doch kann die Region im Rahmen der Studie nicht weiter auf einen Bereich von etwa 5 cM eingegrenzt werden. Für alle sieben untersuchten Allele war der TDT nicht signifikant. Die in dieser Arbeit vorstellten Ergebnisse sind jedoch ein weiterer Baustein auf dem Weg zur Klonierung eines adipositasverursachenden Genes auf 10p.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der Suche nach genetischen Ursachen des komplexen Phänotyps Adipositas wurde von einer französischen Arbeitsgruppe eine Kopplungsregion für extreme Adipositas auf Chromosom 10p12 identifiziert (Hager et al. 1998). Dieser Befund konnte kurz darauf bestätigt werden (Hinney et al. 2000). Ziel dieser Arbeit war die initiale Feinkartierung der Region. Dazu wurden sieben Mikrosatelliten-Marker verwendet, die einen Bereich von etwa 5 cM überspannen (LDB (Collins et al. 1996)). Die Genotypisierungen wurden an einem gegenüber den Voruntersuchungen (Hinney et al. 2000) erweiterten Patientenkollektiv vorgenommen. Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf die frühmanifeste Adipositas. An der Studie nahmen 123 Familien bestehend aus mindestens zwei adipösen Geschwistern und ihren Eltern (insgesamt 509 Personen) teil. Alle extrem konkordanten Geschwister (n=263) hatten einen BMI über der 90. Perzentile. Der BMI von 128 Kindern und Jugendlichen (48.67%) lag über dem 99. BMI-Perzentil (Coners et al. 1996; Hebebrand et al. 1996). In allen Familien wurden beide Elternteile genotypisiert. Es wurden die Marker *D10S1639*, *D10S1732*, *D10S1426*, *D10S208*, *D10S183*, *D10S1654* und *D10S1768* verwendet, um eine Feinkartierung mittels Identical By Descent-Kopplungsanalysen sowie Prüfung auf Transmissionsungleichgewicht vorzunehmen (Spielman et al. 1993). Two-Point- und Multi-Point-Analysen mittels maximaler binomialer Wahrscheinlichkeit (Maximum Likelihood Binomial, MLB) wurden durchgeführt (Ziegler 1999). Zur Durchführung des Transmissions-Disequilibriums-Test wurden aus den Quartetten 263 Trios aus 123 unabhängigen Familien bestehend aus adipösen Kindern (geschlechts- und altersspezifische BMI-Perzentile ≥ 90) und ihren beiden Eltern gebildet.

Der Kopplungsbefund von Hager (Hager et al. 1998) und Hinney (Hinney et al. 2000) konnte bestätigt werden, die Genregion im Rahmen der Feinkartierung mit den vorliegenden Daten jedoch nicht weiter eingegrenzt werden. Der maximale MLB von 1,26 wurde bei dem am weitesten distal gelegenen Marker *D10S1639* erreicht. TDT-Tests für alle untersuchten Markern waren sowohl für Allele als auch Haplotypen nach Korrektur für multiples Testen negativ.

Literaturverzeichnis

- Allison, D. B., Kaprio, J., Korkeila, M., Koskenvuo, M. et al. (1996). "The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart." *Int J Obes Relat Metab Disord* **20**: 501-6.
- Arnheim, N. and Erlich, H. (1992). "Polymerase chain reaction strategy." *Annu Rev Biochem* **61**: 131-56.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarty, M. (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types." *J. Exp. Med.* **79**: 137-158.
- Bagdade, J. D., Bierman, E. L. and Porte, D. (1967). "The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects." *J Clin Invest* **46**: 1549-57.
- Barsh, G. S., Farooqi, I. S. and O'Rahilly, S. (2000). "Genetics of body-weight regulation." *Nature* **404**: 644-51.
- Barth, N., Ziegler, A., Himmelmann, G. W., Coners, H. et al. (1997). "Significant weight gains in a clinical sample of obese children and adolescents between 1985 and 1995." *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**(2): 122-6.
- Bateson, W. (1902). *Mendel's Principles of Heredity. A Defence.* London, Cambridge University Press.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing." *Journal of the Royal Statistical Society / B* **57**: 289- 300.
- Blake, R. D. and Delcourt, S. G. (1996). "Thermodynamic effects of formamide on DNA stability." *Nucleic Acids Res* **24**: 2095-103.
- Bortz, J. (1993). *Statistik für Sozialwissenschaftler.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

- Bouchard, C. and Perusse, L. (1993). "Genetic aspects of obesity." *Ann N Y Acad Sci* **699**: 26-35.
- Bouchard, C. and Perusse, L. (1993). "Genetics of obesity." *Annu Rev Nutr* **13**: 337-54.
- Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J. P., Nadeau, A. et al. (1990). "The response to long-term overfeeding in identical twins." *N Engl J Med* **322**: 1477-82.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. et al. (1998). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15043-8.
- Carlsson, B., Lindell, K., Gabrielsson, B., Karlsson, C. et al. (1997). "Obese (ob) gene defects are rare in human obesity." *Obes Res* **5**: 30-5.
- Chagnon, Y. C., Borecki, I. B., Perusse, L., Roy, S. et al. (2000). "Genome-wide search for genes related to the fat-free body mass in the Quebec family study." *Metabolism* **49**: 203-7.
- Chagnon, Y. C., Perusse, L., Weisnagel, S. J., Rankinen, T. et al. (2000). "The human obesity gene map: the 1999 update." *Obes Res* **8**: 89-117.
- Chagnon, Y. C., Rice, T., Perusse, L., Borecki, I. B. et al. (2001). "Genomic scan for genes affecting body composition before and after training in Caucasians from HERITAGE." *J Appl Physiol* **90**: 1777-87.
- Chen, D. and Garg, A. (1999). "Monogenic disorders of obesity and body fat distribution." *J Lipid Res* **40**: 1735-46.
- Clement, K., Garner, C., Hager, J., Philippi, A. et al. (1996). "Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity." *Diabetes* **45**: 687-90.

- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S. et al. (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." *Nature* **392**: 398-401.
- Cline, J., Braman, J. C. and Hogrefe, H. H. (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* **24**: 3546-51.
- Collins, A., Frezal, J., Teague, J. and Morton, N. E. (1996). "A metric map of humans: 23,500 loci in 850 bands." *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14771-5.
- Comuzzie, A. G., Hixson, J. E., Almasy, L., Mitchell, B. D. et al. (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, R. D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D. I. et al. (1996). "The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation." *Recent Prog Horm Res* **51**: 287-317.
- Coners, H., Himmelmann, G. W., Hebebrand, J., Hesecker, H. et al. (1996). "Perzentilenkurven für den Body-Mass-Index zur Gewichtsbeurteilung bei Kindern und Jugendlichen ab einem Alter von zehn Jahren." *Kinderarzt* **27**: 1002-7.
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A. et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med* **334**: 292-5.
- Drenick, E. J. and Johnson, D. (1978). "Weight reduction by fasting and semistarvation in morbid obesity: long-term follow-up." *Int J Obes* **2**: 123-32.
- Dubern, B., Clement, K., Pelloux, V., Froguel, P. et al. (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.

- Echwald, S. M. (1999). "Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes." *J Intern Med* **245**: 653-66.
- Edholm, O. G. (1977). "Energy balance in man studies carried out by the Division of Human Physiology, National Institute for Medical Research." *J Hum Nutr* **31**: 413-31.
- Elmqvist, J. K., Elias, C. F. and Saper, C. B. (1999). "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight." *Neuron* **22**: 221-32.
- Elmqvist, J. K., Maratos-Flier, E., Saper, C. B. and Flier, J. S. (1998). "Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin." *Nat Neurosci* **1**: 445-50.
- Erickson, J. C., Hollopeter, G. and Palmiter, R. D. (1996). "Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y." *Science* **274**: 1704-7.
- Esposito-Del Puente, A., Scalfi, L., De Filippo, E., Peri, M. R. et al. (1994). "Familial and environmental influences on body composition and body fat distribution in childhood in southern Italy." *Int J Obes Relat Metab Disord* **18**: 596-601.
- Farooqi, I. S., Yeo, G. S., Keogh, J. M., Aminian, S. et al. (2000). "Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency." *J Clin Invest* **106**: 271-9.
- Fisher, R. A. (1918). "The correlation between relatives under the supposition of mendelian inheritance." *Trans. R. Soc. Edin.* **52**: 399-433.
- Fishman, P. M., Suarez, B., Hodge, S. E. and Reich, T. (1978). "A robust method for the detection of linkage in familial disease." *Am J Hum Genet* **30**: 308-21.
- Fondation Jean Dausset CEPH, r. J. D., 75010 Paris (2001). "CEPH Database." .

- Friedlander, Y., Kark, J. D., Kaufmann, N. A., Berry, E. M. et al. (1988). "Familial aggregation of body mass index in ethnically diverse families in Jerusalem. The Jerusalem Lipid Research Clinic." *Int J Obes* **12**: 237-47.
- Garn, S. M., Bailey, S. M. and Cole, P. E. (1976). "Similarities between parents and their adopted children." *Am J Phys Anthropol* **45**: 539-43.
- Garrow, J. S. (1981). *Treat obesity seriously - a clinical manual*. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Garrow, J. S. and Webster, J. (1985). "Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness." *Int J Obes* **9**: 147-53.
- GDB(TM) Human Genome Database (database online), The Hospital for Sick Children, Baltimore (Maryland, USA): Johns Hopkins University, 1990-.
- Gibbs, J., Young, R. C. and Smith, G. P. (1973). "Cholecystokinin decreases food intake in rats." *J Comp Physiol Psychol* **84**: 488-95.
- Gray, D. S. and Fujioka, K. (1991). "Use of relative weight and Body Mass Index for the determination of adiposity." *J Clin Epidemiol* **44**: 545-50.
- Gu, C. and Rao, D. C. (1997). "A linkage strategy for detection of human quantitative-trait loci. II. Optimization of study designs based on extreme sib pairs and generalized relative risk ratios." *Am J Hum Genet* **61**: 211-22.
- Gu, W., Tu, Z., Kleyn, P. W., Kissebah, A. et al. (1999). "Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants." *Diabetes* **48**: 635-9.
- Hager, J., Dina, C., Francke, S., Dubois, S. et al. (1998). "A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10." *Nat Genet* **20**: 304-8.
- Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G. and Schwartz, M. W. (1998). "Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons." *Nat Neurosci* **1**: 271-2.

- Haldane, J. B. S. (1919). "The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors." *J Genet* **8**: 299-309.
- Hanson, R. L., Ehm, M. G., Pettitt, D. J., Prochazka, M. et al. (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.
- Harten, H.-U., Nägerl, H. and Schulte, H.-D. (1993). *Statistik für Mediziner*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Hasstedt, S. J., Ramirez, M. E., Kuida, H. and Williams, R. R. (1989). "Recessive inheritance of a relative fat pattern." *Am J Hum Genet* **45**: 917-25.
- Hayes, B. (1998). "The Invention of the Genetic Code." *Am. Sci.* **86**: 8-14.
- Hebebrand, J., Hesecker, H., Himmelmann, W., Schäfer, H. et al. (1994). "Altersperzentilen für den Body-Mass-Index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflußfaktoren." *Akt. Ernähr.-Med.* **19**: 259-265.
- Hebebrand, J., Himmelmann, G. W., Hesecker, H., Schafer, H. et al. (1996). "Use of percentiles for the body mass index in anorexia nervosa: diagnostic, epidemiological, and therapeutic considerations." *Int J Eat Disord* **19**: 359-69.
- Hebebrand, J. and Remschmidt, H. (1995). "Anorexia nervosa viewed as an extreme weight condition: genetic implications." *Hum Genet* **95**: 1-11.
- Hebebrand, J. and Remschmidt, H. (1995). "Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten." *Med Klin* **90**: 403-10.
- Hebebrand, J. and Remschmidt, H. (1995). "Genetische Aspekte der Adipositas." *Adipositas* **9**: 20-24.
- Hebebrand, J., Wulfstange, H., Goerg, T., Ziegler, A. et al. (2000). "Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating?" *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**: 345-53.

- Hengen, P. N. (1995). "Fidelity of DNA polymerases for PCR." *Trends Biochem Sci* **20**: 324-5.
- Heseker, H., Hartmann, S., Kubler, W. and Schneider, R. (1995). "An epidemiologic study of food consumption habits in Germany." *Metabolism* **44**: 10-3.
- Hinney, A., Rosenkranz, K., Roth, H. and Hebebrand, J. (1997). "Gene, in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen." *Adipositas* **6**: 7.
- Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heibult, O. et al. (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., Ziegler, A., Oeffner, F., Wedewardt, C. et al. (2000). "Independent confirmation of a major locus for obesity on chromosome 10." *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2962-5.
- Hite, J. M., Eckert, K. A. and Cheng, K. C. (1996). "Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_n.d(G-T)_n microsatellite repeats." *Nucleic Acids Res* **24**: 2429-34.
- Holder, J. L., Jr., Butte, N. F. and Zinn, A. R. (2000). "Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene." *Hum Mol Genet* **9**: 101-8.
- Hsueh, W. C., Mitchell, B. D., Schneider, J. L., St Jean, P. L. et al. (2001). "Genome-wide scan of obesity in the Old Order Amish." *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1199-205.
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H. et al. (1997). "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice." *Cell* **88**: 131-41.

- Jackson, R. S., Creemers, J. W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M. L. et al. (1997). "Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene." *Nat Genet* **16**: 303-6.
- Katzmarzyk, P. T., Malina, R. M., Perusse, L., Rice, T. et al. (2000). "Familial resemblance in fatness and fat distribution." *Am J Human Biol* **12**: 395-404.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." *Proc. R. Soc. Lond. B* **140**: 579-592.
- Knapp, M., Seuchter, S. A. and Baur, M. P. (1994). "Linkage analysis in nuclear families. 1: Optimality criteria for affected sib-pair tests." *Hum Hered* **44**: 37-43.
- Koecke, H.-U., Emschermann, P. and Härle, E. (2000). *Biologie*. Stuttgart, Schattauer.
- Koreth, J., O'Leary, J. J. and J, O. D. M. (1996). "Microsatellites and PCR genomic analysis." *J Pathol* **178**: 239-48.
- Kosambi, D. D. (1944). "The estimation of map distances from recombination values." *Am Eugen* **12**: 172-175.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U. et al. (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." *Nature* **393**: 72-6.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R. et al. (1998). "Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans." *Nat Genet* **19**: 155-7.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R. et al. (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, M. J., Reeve-Daly, M. P. and Lander, E. S. (1996). "Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach." *Am J Hum Genet* **58**: 1347-63.
- Lander, E. and Kruglyak, L. (1995). "Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results." *Nat Genet* **11**: 241-7.
- Lander, E. S. and Schork, N. J. (1994). "Genetic dissection of complex traits" *Science* **265**: 2037-48.
- Lee, J. H., Reed, D. R., Li, W. D., Xu, W. et al. (1999). "Genome scan for human obesity and linkage to markers in 20q13." *Am J Hum Genet* **64**: 196-209.
- Lembertas, A. V., Perusse, L., Chagnon, Y. C., Fisler, J. S. et al. (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.
- Li-Cor (1997). Li-Cor 4200 Series Genetic Analysis Manual, Li-Cor, Inc. Biotechnology Division, 4308 Progressive Avenue, P.O. Box 4000, Lincoln, Nebraska 68504, USA: 59.
- Lim, L. H., Ton, S. H. and Cheong, S. K. (1990). "A comparative study of two methods for the isolation of human leucocytes for DNA extraction." *Malays J Pathol* **12**: 39-41.
- Löffert, D., Schaffrath, N., Berkenkopf, M., Stump, S. et al. (1997). "PCR optimization." *QUIAGENNews* **2**: 2-21.
- Malhi, G. S., Mitchell, P. B. and Caterson, I. (2001). "'Why getting fat, Doc?' Weight gain and psychotropic medications." *Aust NZ J Psychiatry* **35**: 315-21.
- Martins, L. A.-C. P. (1999). "Did Sutton and Boveri proposed the so-called Sutton-Boveri chromosome hypothesis?" *Gen Mol Biol* **22**: 261-271.

- McKusick, V. A. (2000). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM), McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine
- Mendel, G. (1866). "Versuche über Pflanzen-Hybriden." *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* **4**: 3-47.
- Mergen, M., Mergen, H., Ozata, M., Oner, R. et al. (2001). "A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity." *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3448.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.
- Moll, P. P., Burns, T. L. and Lauer, R. M. (1991). "The genetic and environmental sources of body mass index variability: the Muscatine Ponderosity Family Study." *Am J Hum Genet* **49**: 1243-55.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A. et al. (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." *Nature* **387**: 903-8.
- Morgan, T. (1928). *The Theory of Genes*. New Haven, Yale University Press.
- Morgan, T. H. (1911). "Random segregation versus coupling in mendelian inheritance." *Science* **34**: 384.
- Morton, N. E. (1955). "Sequential tests for the detection of linkage." *Am J Hum Genet* **7**: 277-318.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-73.
- Murray, J. C., Buetow, K. H., Weber, J. L., Ludwigsen, S. et al. (1994). "A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC)." *Science* **265**: 2049-54.

- Murray, V., Monchawin, C. and England, P. R. (1993). "The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR." *Nucleic Acids Res* **21**: 2395-8.
- Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H. (1961). "The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides." *Proc. Nat. Acad. Sci.* **52**: 420-427.
- Norman, R. A., Tataranni, P. A., Pratley, R., Thompson, D. B. et al. (1998). "Autosomal genomic scan for loci linked to obesity and energy metabolism in Pima Indians." *Am J Hum Genet* **62**: 659-68.
- Norman, R. A., Thompson, D. B., Foroud, T., Garvey, W. T. et al. (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.
- O'Connell, J. R. and Weeks, D. E. (1998). "PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis." *Am J Hum Genet* **63**: 259-66.
- Ohman, M., Oksanen, L., Kaprio, J., Koskenvuo, M. et al. (2000). "Genome-wide scan of obesity in Finnish sibpairs reveals linkage to chromosome Xq24." *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3183-90.
- Olson, J. M., Witte, J. S. and Elston, R. C. (1999). "Genetic mapping of complex traits." *Stat Med* **18**: 2961-81.
- Ott, J. (1999). *Analysis of human genetic linkage*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press.
- Ozata, M., Ozdemir, I. C. and 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.

- Paterson, A. D. and Petronis, A. (1999). "Transmission ratio distortion in females on chromosome 10p11-p15." *Am J Med Genet* **88**: 657-61.
- Penrose, L. S. (1935). "Detection of autosomal linkage in data which consists of pairs of brothers and sisters of unspecified parentage." *Ann Eugen* **6**: 133-138.
- Perusse, L. (2000). "[Genetics of human obesity: results from genetic epidemiology studies]." *Ann Endocrinol (Paris)* **61**: 24-30.
- Perusse, L., Rice, T., Chagnon, Y. C., Despres, J. P. et al. (2001). "A genome-wide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec Family Study." *Diabetes* **50**: 614-21.
- Poehlman, E. T., Tremblay, A., Despres, J. P., Fontaine, E. et al. (1986). "Genotype-controlled changes in body composition and fat morphology following overfeeding in twins." *Am J Clin Nutr* **43**: 723-31.
- Price, R. A., Cadoret, R. J., Stunkard, A. J. and Troughton, E. (1987). "Genetic contributions to human fatness: an adoption study." *Am J Psychiatry* **144**: 1003-8.
- Price, R. A. and Gottesman, II (1991). "Body fat in identical twins reared apart: roles for genes and environment." *Behav Genet* **21**: 1-7.
- Price, R. A., Li, W. D., Bernstein, A., Crystal, A. et al. (2001). "A locus affecting obesity in human chromosome region 10p12." *Diabetologia* **44**: 363-6.
- Pschyrembel, W. (1998). *Klinisches Wörterbuch*. Berlin, New York, Walter de Gruyter.
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M. et al. (1996). "A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour." *Nature* **380**: 243-7.
- Rankinen, T., Perusse, L., Weisnagel, S. J., Snyder, E. E. et al. (2002). "The human obesity gene map: the 2001 update." *Obes Res* **10**: 196-243.

- Ravussin, E. and Bogardus, C. (2000). "Energy balance and weight regulation: genetics versus environment." *Br J Nutr* **83**: S17-20.
- Ravussin, E., Lillioja, S., Knowler, W. C., Christin, L. et al. (1988). "Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain." *N Engl J Med* **318**: 467-72.
- Reed, D. R., Ding, Y., Xu, W., Cather, C. et al. (1996). "Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene." *Diabetes* **45**: 691-4.
- Reed, D. R., Ding, Y., Xu, W., Cather, C. et al. (1995). "Human obesity does not segregate with the chromosomal regions of Prader-Willi, Bardet-Biedl, Cohen, Borjeson or Wilson-Turner syndromes." *Int J Obes Relat Metab Disord* **19**: 599-603.
- Rice, T., Perusse, L., Bouchard, C. and Rao, D. C. (1999). "Familial aggregation of body mass index and subcutaneous fat measures in the longitudinal Quebec family study." *Genet Epidemiol* **16**: 316-34.
- Ristow, M., Muller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W. et al. (1998). "Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation." *N Engl J Med* **339**: 953-9.
- Roberts, S. B., Savage, J., Coward, W. A., Chew, B. et al. (1988). "Energy expenditure and intake in infants born to lean and overweight mothers." *N Engl J Med* **318**: 461-6.
- Rose, E. A. (1991). "Applications of the polymerase chain reaction to genome analysis." *Faseb J* **5**: 46-54.
- Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Hirsch, J. (1997). "Obesity." *N Engl J Med* **337**: 396-407.
- Rychlik, W. (1995). "Selection of primers for polymerase chain reaction." *Mol Biotechnol* **3**: 129-34.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J. et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-91.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M. et al. (1997). "The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats." *Neurosci Lett* **224**: 149-52.
- Schaid, D. J. (1998). "Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations." *Am J Hum Genet* **63**: 935-41.
- Schey, H. M., Michielutte, R., Corbett, W. T., Diseker, R. A. et al. (1984). "Weight-for-height indices as measures of adiposity in children." *J Chronic Dis* **37**: 397-400.
- Schmerer, W. M., Hummel, S. and Herrmann, B. (1997). "Reproduzierbarkeit von aDNA-Typing." *Anthrop. Anz.* **55**: 199-206.
- Schmidt, R. F. and Tews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- Schneider, R., Eberhardt, W., Heseke, H. and Moch, K. J. (1992). "Die VERA-Stichprobe im Vergleich mit Volkszählung, Mikrozensus und anderen nationalen Untersuchungen." Niederkleen, Wissenschaftlicher Fachverlage Dr. Fleck.
- Schwartz, M. W., Baskin, D. G., Bukowski, T. R., Kuijper, J. L. et al. (1996). "Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice." *Diabetes* **45**: 531-5.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* **404**: 661-71.
- Seltzer, C. C. and Mayer, J. (1966). "A review of genetic and constitutional factors in human obesity." *Ann N Y Acad Sci* **134**: 688-95.

- Shutter, J. R., Graham, M., Kinsey, A. C., Scully, S. et al. (1997). "Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice." *Genes Dev* **11**: 593-602.
- Sina, M., Hinney, A., Ziegler, A., Neupert, T. et al. (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.
- Sørensen, T. I., Holst, C. and Stunkard, A. J. (1998). "Adoption study of environmental modifications of the genetic influences on obesity." *Int J Obes Relat Metab Disord* **22**: 73-81.
- Spielman, R. S. and Ewens, W. J. (1996). "The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association." *Am J Hum Genet* **59**: 983-9.
- Spielman, R. S., McGinnis, R. E. and Ewens, W. J. (1993). "Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)." *Am J Hum Genet* **52**: 506-16.
- Stephens, T. W., Basinski, M., Bristow, P. K., Bue-Valleskey, J. M. et al. (1995). "The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product." *Nature* **377**: 530-2.
- Strachan, T. and Read, A. P. (1999). *Human Molecular Genetics 2*, BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M. et al. (1998). "A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity." *Nat Genet* **18**: 213-5.
- Stunkard, A. J., Foch, T. T. and Hrubec, Z. (1986). "A twin study of human obesity." *Jama* **256**: 51-4.
- Stunkard, A. J., Harris, J. R., Pedersen, N. L. and McClearn, G. E. (1990). "The body-mass index of twins who have been reared apart." *N Engl J Med* **322**: 1483-7.

- Stunkard, A. J., Sorensen, T. and Schulsinger, F. (1983). "Use of the Danish Adoption Register for the study of obesity and thinness." *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **60**: 115-20.
- Stunkard, A. J., Sorensen, T. I., Hanis, C., Teasdale, T. W. et al. (1986). "An adoption study of human obesity." *N Engl J Med* **314**: 193-8.
- Sturtevant, A. H. (1913). "The Linear Arrangement of Six Sex-linked Factors in *Drosophila*, As Shown By Their Mode of Association." *J Exp Zool* **14**: 43-59.
- Vaisse, C., Clement, K., Durand, E., Hercberg, S. et al. (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. and Froguel, P. (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity [letter]." *Nat Genet* **20**: 113-4.
- van der Kallen, C. J., Cantor, R. M., van Greevenbroek, M. M., Geurts, J. M. et al. (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.
- Watanabe, R. M., Ghosh, S., Langefeld, C. D., Valle, T. T. et al. (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, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). "A structure for DNA." *Nature* **171**: 737.
- WHO (2002). WHO MONICA Project. **2002**.
- Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D. and Porte, D. (1979). "Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons." *Nature* **282**: 503-5.

- Woods, S. C., Schwartz, M. W., Baskin, D. G. and Seeley, R. J. (2000). "Food intake and the regulation of body weight." *Annu Rev Psychol* **51**: 255-77.
- Yeo, G. S., Farooqi, I. S., Aminian, S., Halsall, D. J. et al. (1998). "A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity." *Nat Genet* **20**: 111-2.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M. et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**: 425-32.
- Ziegler, A. (1999). "Genetische Kartierung quantitativer Phänotypen: Eine Übersicht über modellfreie kopplungsanalytische Verfahren." München, Urban & Vogel, Medien- und Medizinverlag.
- Ziegler, A. and Hebebrand, J. (1998). "Sample size calculations for linkage analysis using extreme sib pairs based on segregation analysis with the quantitative phenotype body weight as an example." *Genet Epidemiol* **15**: 577-93.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Sukzessive Annäherung an die Gauss-Verteilung.....	10
Abbildung 2, Einfluss von Neuropeptiden auf die Energie-Homöostase	15
Abbildung 3, LOD-Scores auf Chromosom 10.....	28
Abbildung 4, Prinzip der PCR.....	43
Abbildung 5, Der Desmole-Prozess	50
Abbildung 6, Lage der Marker auf Chromosom 10	54
Abbildung 7, Der Transmissions Disequilibriums Test.....	60
Abbildung 8, LOD-Scores auf Chromosom 10 - Feinkartierung.....	84
Abbildung 9, LOD-Scores im Vergleich.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, Adipositas -Definitionen der WHO und Hebebrand et al.....	12
Tabelle 2, Monogene Formen der Adipositas beim Menschen.....	23
Tabelle 3, Monogene Formen der Adipositas bei der Maus	23
Tabelle 4, Übersicht chromosomaler Regionen zum Phänotyp Adipositas.....	31
Tabelle 5, Daten des untersuchten Patientenkollektivs	39
Tabelle 6, Softwareparameter zum Erkennen der Banden.....	50
Tabelle 7, Position der Marker auf Chromosom 10	53
Tabelle 8-11, Lösungen DNA-Extraktion.....	63
Tabelle 12, PCR-Puffer	64
Tabelle 13-14, Lösungen Sequenz-Analyse.....	65
Tabelle 15-21 Markerdaten.....	67
Tabelle 22, Allelfrequenzen und Basenpaarlängen der Marker	83
Tabelle 23, Ergebnisse der Maximum-Likelihood-Binomial-Analyse	86
Tabelle 24, Ergebnisse des TDT-Tests.....	87
Tabelle 25, Darstellung aller ermittelten Allelfrequenzen.....	89

Anhang

Abkürzungen

in Klammern OMIM-Nummern

5HTR2C	5-Hydroxytryptamine Receptor 2c (Serotonin Rezeptor, *312861)
ADA	Adenosine Deaminase (*102700)
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ASIP	Agouti Signaling Protein (*600201)
BMI	Body-Mass-Index (1 kg/m ²)
CEBPB	CCAAT / Enhancer Binding Protein Beta (DNA bindendes Protein, *189965)
EE	Energy Expenditure
FCH	Familial combined hyperlipidemia (#144250)
GNAS1	Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha-Stimulating Activity Polypeptide 1 (*139320)
GCKR	Glucokinase regulatory protein (*600842)
LEPR	Leptin receptor (*601007)
MC3R	Melanocortin 3 Receptor (*155540)
MC4R	Melanocortin 4 Receptor (*155541)
MLBGH	Maximum-Likelihood-Binomial Analysis Of Affected Sib-Pair And Sibship Data Extended From The Genehunter Program
NHLH2	Nescient Basic Helix-Loop-Helix 2 (*162361)
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus (#125853)
PCSK1	Proprotein Convertase, Subtilisin/Kexin-Type, 1 (*162150)
PLCG1	Phospholipase C, Gamma-1 (*172420)
POMC	Pro-Opio-Melanocortin (*176830)
PPARG	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma; (*161487)
RQ	Respiratory Quotient

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren:

in Marburg: Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Beato, Bolm, Daut, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hasilik, Hebebrand, Hielscher, Joseph, Kälble, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Krieg, Lang, Lemke, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mennel, Moosdorf, Mueller, Oertel, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Schüffel, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Steiniger, Sturm, Vohland, Voigt, Weihe, v. Wichert

in Köln: Ahlers, Janson, Karitzky, Lagrèze, Lampe, Malchow, Molter, Niederle, Ringe, Tauchert, Terpe, Vestweber, Zumbé

in Norwalk: Andrews, Berman, Charney, Cleary, Kelly, Papowitz

Lebenslauf

Markus Vogel

geboren am 26. Dezember 1971 in Berlin

- 1977 - 1983 Grundschule in Berlin-Zehlendorf
- 1983 - 1991 Gymnasium in Berlin-Zehlendorf, Abitur
- 1991 - 1994 Studium Maschinenbau/Medizintechnik (Vordiplom), TU Berlin
- 1994 - 2000 Studium Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
- 2000 - 2001 Praktisches Jahr (Staatsexamen), Universität zu Köln
- 1998 - 2002 Anfertigung der Dissertation im Rahmen der Forschung zur
Adipositas der Klinischen Forschergruppe unter Leitung von
Prof. Dr. Hebebrand

Danksagungen

Der erste Dank soll meinem Vater Prof. Dr. Martin Vogel gelten. Er hat mich in Gedanken und Taten stets unterstützt, mehr als ihm vielleicht selbst bewußt ist.

Mein besonderer Dank jedoch gilt vor allen Prof. Dr. Johannes Hebebrand, Leiter der Klinischen Forschergruppe an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters und Frau Dr. Anke Hinney. Zu danken habe ich nicht nur für das interessante Thema, sondern auch für die stete und geduldige Hilfe und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt im Werden dieser Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt, Geschäftsführender Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg.

Am Anfang einer solchen Arbeit steht das Labor und das zu erlernende Handwerk, wo ich Fr. Gerber und Fr. Reiter zu großem Dank verpflichtet bin, die niemals müde wurden, ihre große Erfahrung an Unerfahrene weiterzugeben und ihnen damit auf ihrem Weg zu helfen.

Am Ende eines solchen Vorhabens steht die statistische Aufbereitung der im Labor gewonnen Daten, wo ich dem Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg und im besonderen Prof. Dr. Andreas Ziegler für die Hilfe danke.

Zwischen Anfang und Ende wurde aus meiner Freundin Julia Fuchs meine Verlobte und Ehefrau Julia Vogel. Von der ersten Minute und den Fahrten ins Labor bis zur abendlichen Arbeit am Computer konnte ich ihrer immerwährenden Unterstützung, Motivation und Kritik sicher sein, wofür ich sehr dankbar bin.

Mein Dank gilt all denen, die es mir ermöglicht haben, meine Dissertation an der Philipps-Universität Marburg erfolgreich anzufertigen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Feinkartierung einer Kopplungsregion auf Chromosom 10p für frühmanifeste Adipositas mittels sieben Mikrosatellitenmarkern an 123 Familien bestehend aus mindestens zwei adipösen Geschwistern und ihren Eltern" im Institut für Kinder- und Jugendpsychiatrie unter Leitung von Prof. Dr. Johannes Hebebrand mit Unterstützung durch Dr. Anke Hinney und Prof. Dr. Andreas Ziegler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 85, Issue 8, pages 2962-5 (Hinney et al. 2000).

Düsseldorf, den 26.11.2002