

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. K. Becker

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

unter der Leitung von

Prof. Dr. Johannes Hebebrand

Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der
Universität Duisburg-Essen

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Mutationssuche in den Exons 2 und 3 des Galanin-Rezeptor-1-Gens bei extrem
adipösen Kindern und Jugendlichen, normalgewichtigen Kontrollen und Patientinnen
mit Anorexia nervosa oder Bulimia nervosa und die Durchführung von
Assoziationsuntersuchungen**

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

Hans-Christian Müller

aus Nordhausen

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 22.01.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: **Prof. Dr. Matthias Rothmund**
Dekan des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Referent: **Prof. Dr. Johannes Hebebrand**
Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und
Jugendalters der Universität Duisburg-Essen

1. Korreferent: **Prof. Dr. Alexander Brehm**
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VI
VERZEICHNIS DER TABELLEN	VII
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VIII
FIRMENVERZEICHNIS	XI
ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)	1
Deutsch:	1
English:	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Adipositas	6
1.1.1 Definition	6
1.1.2 Methoden für die Einteilung des Gewichts	6
1.2 Genetik der Adipositas	8
1.2.1 Formalgenetische Modelle und Befunde	8
1.2.2 Tierexperimentelle Befunde	10
1.2.2.1 Monogene Formen der Adipositas	10
1.2.2.2 Transgene Tiermodelle	12
1.2.2.3 Polygene Tiermodelle (Der <i>QTL</i> -Ansatz)	12
1.2.3 Molekulargenetische Befunde beim Menschen	13
1.2.3.1 Monogene Formen der Adipositas	13
1.2.3.2 Syndromale Formen der Adipositas	17
1.3 Anorexia nervosa	17
1.4 Bulimia nervosa	19
1.5 Molekulargenetische Analysemöglichkeiten beim Menschen	21
1.5.1 Kopplung und Genom-Scan	21
1.5.2 Kandidatengenansatz	22

1.5.2.1	Assoziationsuntersuchungen	23
1.5.2.2	Transmissions-Disäquilibrium-Test (<i>TDT</i>)	23
1.5.3	Kandidatengene für das Körpergewicht	23
1.6	Galanin (<i>GAL</i>)	25
1.6.1	Galanin (<i>GAL</i>) - Nahrungsaufnahme und Gewichtsregulation	26
1.6.1.1	Tierstudien	26
1.6.1.2	Untersuchungen am humanen Galanin (<i>GAL</i>)	29
1.7	Die Galaninrezeptoren	31
1.7.1	Der Galaninrezeptor 1 (<i>GALR1</i>)	31
1.7.1.1	<i>GALR1</i> - Essverhalten und Gewichtsregulation	33
1.7.2	<i>GALR2</i> und <i>GALR3</i>	34
1.8	Ziel der Arbeit	36
2	MATERIALIEN	37
2.1	Puffer	37
2.2	Oligonukleotide (Primer)	39
2.3	Gelprotokolle	40
2.4	Untersuchungsgut	41
2.4.1	Rekrutierung der Probanden	41
3	METHODEN	43
3.1	Extrahieren der Desoxyribonukeinsäure (<i>DNA</i>)	43
3.1.1	Isolierung der genomischen <i>DNA</i> aus dem Blut	43
3.1.2	Konzentrationsbestimmung der <i>DNA</i>	43
3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>PCR</i>)	44
3.2.1	Einleitung	44
3.2.2	Grundlagen	44
3.2.2.1	Reaktionsablauf	45
3.2.2.2	Primer-Design	46
3.2.2.3	Optimierungsphase	47
3.3	Allelspezifische Amplifikation (<i>ARMS-PCR</i>)	48

3.4	Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)	49
3.5	Sequenzierung	52
3.5.1	Datenerhebung mit dem <i>DNA Analysis System 4200-2</i>	54
3.5.2	Auswertung mittels der Software <i>ONE-Dscan</i>	55
3.6	Nomenklatur zu den Varianten (Mutationen)	56
3.7	Statistische Verfahren	57
3.7.1	Assoziationsstudien	57
3.8	Teststatistik	59
3.8.1	Pearson χ^2 -Test	59
3.8.2	Exakter Test nach Fisher	60
3.8.3	Cochran-Armitage Trend Test	60
3.8.4	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	60
3.9	Protokolle	61
3.9.1	Intron 1	61
3.9.1.1	<i>PCR</i>	61
3.9.1.2	Sequenzierung	62
3.9.2	Exon 2	64
3.9.2.1	<i>PCR</i>	64
3.9.2.2	<i>SSCP</i>	64
3.9.3	Exon 3	65
3.9.3.1	<i>PCR</i>	65
3.9.3.2	Restriktion	65
3.9.3.3	<i>SSCP</i>	66
3.9.3.4	Silberfärbung	66
3.9.3.5	Sequenzierung	67
3.9.3.6	<i>ARMS-PCR</i>	67
4	ERGEBNISSE	68
4.1	Exon 2	68
4.1.1	<i>PCR</i> des Intron 1	68
4.1.2	Sequenzierung	69
4.1.3	<i>PCR</i> des Exon 2	70
4.1.4	<i>SSCP</i>	70

4.2	Exon 3	70
4.2.1	PCR	70
4.2.2	SSCP	71
4.2.3	Sequenzierung	71
4.2.4	ARMS-PCR	72
4.2.5	Identifizierte Allelvariante (793A→T)	73
4.2.6	Durchgeführte Assoziationsuntersuchungen	74
4.3	Exon1	74
5	DISKUSSION	75
5.1	Nachteile der Assoziationsuntersuchung	75
5.2	Auswahl der Studienkollektive	76
5.3	Methoden zur Mutationsdetektion	77
5.3.1	PCR	77
5.3.1.1	Taq-Polymerase	77
5.3.1.2	Fragmentgröße	78
5.3.1.3	Fremdkontamination	78
5.3.2	SSCP	79
5.3.3	ARMS-PCR	79
5.3.4	Sequenzierung	80
5.4	Eigene Ergebnisse	81
5.4.1	Exon 1 des <i>GALR1</i>	81
5.4.2	Exon 2 des <i>GALR1</i>	81
5.4.3	Identifizierter Polymorphismus im Exon 3 des <i>GALR1</i>	82
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	84
6	LITERATURVERZEICHNIS	86
7	ANHANG	102
	Genomische Struktur der Exons 2 und 3 des <i>GALR1</i>	102
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	104

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1-1 BMI-Altersperzentile der weiblichen deutschen Bevölkerung aus den Daten der Nationalen Verzehrstudie

Abb. 1-2 Vergleich der Aminosäuresequenz des rat-*GALR1* und des humanen *GALR1*

Abb. 3-1 Prinzip der *PCR*

Abb. 3-2 Prinzip der *ARMS-PCR*

Abb. 3-3 Prinzip der *SSCP*-Analyse

Abb. 3-4 Prinzip der Sequenzierung

Abb. 3-6 Prinzip der Sequenzierung mit dem *DNA Analysis System 4200-2*

Abb. 4-1 Darstellung der *PCR*-Amplifikate des Intron 1

Abb. 4-2 Ausschnitt eines Gels der *SSCP*-Analyse des Exon 3

VERZEICHNIS DER TABELLEN

- Tab. 1-1** Einteilung des Gewichts nach WHO [2004]
- Tab. 1-2** Monogene Formen der Adipositas im Tiermodell [nach Hinney *et al.*, 1997a]
- Tab. 1-3** Peptide des *POMC* [nach Hinney *et al.*, 1998a]
- Tab. 1-4** Diagnosekriterien für Anorexia nervosa nach dem *DSM-IV*
- Tab. 1-5** Diagnosekriterien für Bulimia nervosa nach dem *DSM-IV*
- Tab. 1-6** Die drei humanen Galaninrezeptoren
- Tab. 2-1** Puffer für die Isolierung genomischer *DNA*
- Tab. 2-2** Puffer für die *PCR*-Optimierung, Master-Mix
- Tab. 2-3** Mastermix
- Tab. 2-4** Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese
- Tab. 2-5** Auftragspuffer
- Tab. 2-6** Puffer für die *SSCP*-Analyse
- Tab. 2-7** Probenpuffer
- Tab. 2-8** Puffer für die Silberfärbung
- Tab. 2-9** Verwendete Oligonukleotide
- Tab. 2-10** *SSCP*-Gel-Protokoll
- Tab. 2-11** Sequenziergel-Protokoll
- Tab. 3-1** Modell einer Kontingenztafel
- Tab. 4-1** Verlauf der Optimierungsphase der *PCR* des Exon 2
- Tab. 4-2** Verlauf der Optimierungsphase der *PCR* des Exon 3
- Tab. 4-3** Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Polymorphismus 793A→T
- Tab. 4-4** p-Werte der durchgeführten Assoziationstests

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

µl/µM/µmol: Mikroliter/-molar/-mol
5-HT_{2C}: 5-Hydroxytryptaminrezeptor 2C
A: Adenin
Abb.: Abbildung
ACTH: adrenocorticotropes Hormon
AgRP: Agouti-related protein
AN: Anorexia nervosa
anx/anx: Anorexia nervosa-Maus
aqua bidest.: steriles bidestilliertes Wasser
ARMS: amplification refractory mutation system, Allelspezifische Amplifikation
AS: Aminosäure
BIA: bioelektrische Impedanzanalyse
Bis: N,N'-Methylenbisacrylamid
BMI: body mass index
BN: Bulimia nervosa
Borat: Borsäure
bp: Basenpaare
C: Cytosin
cAMP: cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
c-DNA: komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CID: Composite International Diagnostic Interviews
CPE: Carboxypeptidase E
db: diabetes
ddNTP: Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO: Dimethylsulfoxid
DNA: Desoxyribonucleinsäure
dNTP: Desoxynukleotidtriphosphat
DRD2: Dopamin D2-Gen
DSM-IV: Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure
ERβ: Östrogen β-Rezeptor-Gen
et al.: et alii
G: Guanin
GAL: Galanin
GALR: Galaninrezeptor

- GCKR: Glukokinase regulatorisches Protein
GH: growth hormone, Wachstumshormon
GHSR: Ghrelinrezeptor
h: Stunde
HTR1D: Serotonin-1-D-Gen
HWG: Hardy-Weinberg-Äquilibrium
IRD: Infrared Dye
Kap.: Kapitel
Kb: Kilobase
LOD: logarithm of the odds
MAP-Kinase: mitogen-aktivierte Protein Kinase
MC4: Melanokortin-4
MgCl₂: Magnesiumchlorid
min: Minute
ml/mM: Milliliter/-molar
mRNA: messenger RNA
MSH: Melanozyten-stimulierendes Hormon
Mu: Mutationsspezifisch (ARMS-Primer)
N.: Nucleus
NaCl: Natriumchlorid
NaCO₃: Natriumcarbonat
ng/nmol: Nanogramm/Nanomol
NIDDM: non insulin dependent diabetes mellitus
nm: Nanometer
No: normal (Wildtyp-Primer bei der ARMS-PCR)
NPY: Neuropeptid Y
ob: obese
OPRD1: Opioid delta 1-Gen
p: Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
pmol: Picomol (Stoffmenge)
POMC: Proopiomelanokortin
q: Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
QTL: quantitative trait loci
RNA: ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
s: Sekunde
SSCP: single-strand conformation polymorphism, Einzelstrang-Konformationsanalyse

SNS: short normal stature
STH: Somatotropes Hormon, Wachstumshormon
T: Thymidin
Tab: Tabelle
TAE: Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq: *Thermus aquaticus*
TBE: Tris/Borat/EDTA-Puffer
TDT: Transmissionsdisäquilibrium-Test
Tm: Schmelztemperatur
Tris: Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tub: tubby
U/min: Umdrehungen pro Minute
U: Unit
UV: ultraviolettes Licht
V: Volt
w/v: weight per volume
W: Watt
WT: Wildtypsequenz
ZNS: Zentralnervensystem

FIRMENVERZEICHNIS

- AGS (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH); Rischerstr. 12,
69123 Heidelberg, Deutschland; (große Elektrophoresekammer)
- Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH; Munzinger Str.9, 79111 Freiburg,
Deutschland (Power Supply-EPS 301)
- Applied Biosystems/Perkin Elmer; Brunnenweg 13, 64331 Weiterstadt, Deutschland
(Perkin Elmer 9600)
- Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics GmbH; Sandhofer Str.116,
68305 Mannheim, Deutschland
- Braun B. Melsungen AG; Carl-Braun-Str.1, 34212 Melsungen, Deutschland
(Aqua dest.)
- Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230,
USA Eurogentec; Cäcilienstrasse 46, 50667 Köln, Deutschland
- FMC Bioproducts/BioWhittaker Molecular Applications, 191 Thomaston Street,
Rockland, ME 04841 USA
- Gibco/Brl (Life Technologies GmbH), Technologiepark Karlsruhe,
Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland
- GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH);Schulze-Delitzsch-Str.4, 30938 Burgwedel,
Deutschland, (GFL 1083 Wasserbad für Restriktion)
- Heidolph Instruments; Walpersdorfer Str.12, 91126 Schwabach, Deutschland
(Duomax 1030 T Schwenker für SSCP-Gel-Färbung)
- Kendro Laboratory Products GmbH; Heraeusstr.12-14, 63450 Hanau,
Deutschland (Megafuge 2.0R, Biofuge 13)
- Hofer Scientific Instruments; 654 Minnesota Street, San Francisco CA 94107,
USA (UV-Schirm (Hofer Mighty Bright)
- LI-COR, Inc.; 4308 Progressive Ave; Lincoln, NE 68504-1325, USA
- Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 DARMstadt, Deutschland
- MWG Biotech; Anzinger Str. 7a, 85560 Ebersberg; Deutschland,
- Polaroid, Sprendlinger Landstr. 109, 63069 Offenbach, Deutschland
- Qiagen; Max-Volmer-Str.4, 40724 Hilden, Deutschland
- Roth C. GmbH & Co. KG; Schoemperlenstr.1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland;

Postfach 10 01 21, 76231 Karlsruhe

Scanalytics, Inc.; 8550 Lee Highway; Suite 400; Fairfax, VA 22031; USA; (OneDScan)

Sigma-Aldrich Chemicals; Eschenstr.5, 82024 Taufkirchen, Deutschland

Systemec GmbH; Sandusweg 11, 35435 Wettenberg (Tuttnauer 3850 EC Autoklav)

Zusammenfassung (summary)

Deutsch:

Galanin ist ein zentral und peripher exprimiertes Peptid, welches dafür bekannt ist, an verschiedenen Prozessen wie Nahrungsaufnahme, Gewichtskontrolle, Sexualverhalten, Lernen und Gedächtnis, Emotion, Epilepsie, Schmerz, Alkoholabhängigkeit, Motilität des Gastrointestinaltrakts, Herzfrequenz und Blutdruck beteiligt zu sein. Bislang konnten drei G-Protein gekoppelte Galaninrezeptoren (*GALR1*, *GALR2* und *GALR3*) bei Ratte und Mensch identifiziert werden. Zahlreiche Tierstudien belegen eine positive Korrelation des Galanins mit der Höhe der nahrungsbedingten Fettaufnahme, welche über den *GALR1* vermittelt wird und damit das *GALR1*-Gen zu einem plausiblen Kandidatengen für Untersuchungen zur Gewichtsregulation beim Menschen machen [Übersicht in Crawley, 1999; Leibowitz *et al.*, 1998a; Leibowitz *et al.*, 1998b]. Es gibt bislang keine Studien am humanen *GALR1*, die einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und die Gewichtsregulation untersuchten (s. Kap. 1.6). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Mutationen im *GALR1*-Gen und die Aufdeckung einer möglichen Assoziation zu den Phänotypen Adipositas, Anorexia nervosa und Bulimia nervosa.

Mittels Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) wurden die Exons 2 und 3 [Exon 1 in Schäuble *et al.*, 2005] des Galaninrezeptor1 (*GALR1*)-Gens auf Allel-Varianten untersucht und Assoziationsuntersuchungen bei 187 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen (BMI 35.1 ± 6.2 kg/m², Alter 14.4 ± 3.3 Jahre, 50.8 % weiblich), 99 PatientInnen mit Anorexia nervosa (BMI 15.7 ± 3.3 , Alter 18.9 ± 5.2 Jahre, 92.1 % weiblich), 27 PatientInnen mit Bulimia nervosa (BMI 21.7 ± 5.8 , Alter 23.8 ± 4.9 , 100 % weiblich) sowie einer Kontrollgruppe aus 106 gesunden untergewichtigen Studenten (BMI 18.4 ± 1.2 kg/m², Alter 25.5 ± 3.8 Jahre, 37.7 % weiblich) durchgeführt.

In der Einzelstrang-Konformations (SSCP)-Analyse des Exon 2 des *GALR1*-Gens konnten keine von der Wildtyp-Variante abweichenden Bandenmuster in den untersuchten Gruppen gefunden werden. Im Exon 3 des *GALR1*-Gens wurde mittels SSCP-Analyse und Sequenzierung ein bisher unbekannter Polymorphismus an Position **793A→T** identifiziert. Dieser führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz (Missense-Mutation) von Isoleucin zu Phenylalanin **Ile265Phe**. In der abschließenden allelspezifischen amplification-refractory mutation system (*ARMS*)-PCR wurde ein homozygoter Träger in der untergewichtigen Kontrollgruppe detektiert. Der Anteil der heterozygoten Träger für den Polymorphismus betrug in der

Gruppe mit extremer Adipositas 10,70 %, in den Gruppen mit Anorexia nervosa und Bulimia nervosa 7,07 % bzw. 7,41 % und in der untergewichtigen Kontrollgruppe 7,55 %. Die durchgeführten Assoziationstests ergaben keinen signifikanten Werte ($p > 0.05$) für die Genotyp- und Allelhäufigkeiten in den untersuchten Gruppen. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint ein Zusammenhang des identifizierten Polymorphismus **793A→T** im Exon 3 des *GALR1*-Gens an der Gewichtsregulation, besonders bei der Adipositas im Kindes- und Jugendalter unwahrscheinlich. Um eine umfassendere Aussage zur Rolle des *GALR1* bei der Gewichtsregulation treffen zu können, müssten weitere Studiengruppen, wie adipöse Erwachsene, Zugehörige anderer ethnischer Gruppen usw. untersucht werden.

Durch die fast ubiquitäre Lokalisation von Galanin und den Galaninrezeptoren ist deren Mitwirkung an zahlreichen physiologischen Prozessen wie Lernen, Emotion, Epilepsie oder Nozizeption vorstellbar (s. Kap. 1.5 - 1.6). Die genaue Kenntnis der Wirkungsmechanismen des Galanins und der drei Galaninrezeptoren könnte ein Ansatz für die Entwicklung neuer diagnostischer Möglichkeiten oder neuen Therapieformen bei zahlreichen Krankheiten, wie z. B. metabolischen Störungen, M. Alzheimer, affektiven Störungen, Angst, Alkoholkonsum, Schmerz oder Tumoren darstellen. Aus diesem Grund sollten Polymorphismen im *GALR1*-Gen, wie der von uns identifizierte **793A→T**, im Fokus der zukünftigen Forschungsarbeiten bleiben.

English:

Galanin is a centrally and peripherally expressed peptide, that is known to be involved in different processes like food intake, weight regulation, sexual behaviour, learning and memory, emotion, seizure, pain transmission, alcohol addiction, gastrointestinal motility, heart rate and blood pressure. So far, three G-protein-linked galanin receptors (*GALR1*, *GALR2* and *GALR3*) have been cloned from both rat and human. Several studies support a positive correlation of the galaninergic system to the amount of fat consumption and weight control which are mediated through *GALR1*. These results suggest that *GALR1*-gene is a candidate-gene for further investigations in human weight regulation [Crawley, 1999; Leibowitz *et al.*, 1998a; Leibowitz *et al.*, 1998b]. To date there are no studies on human *GALR1* and its influence on feeding behaviour and weight regulation. Aim of the present work was to screen the coding region of *GALR1*-gene for mutations and find a possible association in probands with obesity, anorexia nervosa or bulimia nervosa.

We screened the coding region of the exons 2 and 3 of *GALR1* for mutations [exon 1 Schäuble *et al.*, 2005] using single-strand conformation polymorphism (*SSCP*) analysis and tested for association in 187 obese children and adolescents (BMI 35.1 ± 6.2 kg/m², age 14.4 ± 3.3 , 50.8 % female), 99 patients with anorexia nervosa (BMI 15.7 ± 3.3 , age 18.9 ± 5.2 , 92.1 % female), 27 patients with bulimia nervosa (BMI 21.7 ± 5.8 , age 23.8 ± 4.9 , 100 % female) and a group of 106 healthy underweight students (BMI 18.4 ± 1.2 kg/m², age 25.5 ± 3.8 , 37.7 % female).

In exon 2 we found no sequences different to the wildtype allele in the investigated individuals by using *SSCP* analysis. In exon 3 of *GALR1* we identified a novel single nucleotide polymorphism (*SNP*) **793A→T**, that leads to a change in the amino acid sequence (missense mutation) from isoleucin to phenylalanine **Ile265Phe**. By using amplification refractory mutation system (*ARMS*)-*PCR* we identified one homozygous carrier in the group of the healthy underweight students. The percentage of heterozygous carriers for the polymorphism was 10,7 % in obese children and adolescents, 7,07 % in patients with anorexia nervosa, 7,41 % in patients with bulimia nervosa and 7,55 % in the group of underweight students. Association tests showed no significant differences ($p > 0,05$) for genotype and allele frequencies in the investigated groups. This finding suggests that the identified *SNP* does not play a major role in weight regulation in the investigated study groups.

Further investigations are necessary to clarify participation of human *GAL* and its receptors in weight regulation and feeding behaviour. There have to be more investigational studies, for example in obesity of adulthood, other ethnical groups etc. to get more comprehensive information about the role of *GALR1* in weight regulation.

Due to the nearly ubiquitous appearance of galanin and the galanin receptors a contribution in different physiological processes like learning, emotion, seizure or nociception is conceivable. The exact knowledge of mechanism of action of galanin and his three galanin receptors could be a new approach for developing new diagnostic possibilities and treatments of various diseases including metabolic diseases, Alzheimer's disease, mood disorders, anxiety, alcohol intake, pain and solid tumors. For this reason *SNPs* in *GALR1*-gene, as the identified **793A→T**, should be the focus of further investigations.

1 Einleitung

Die Aufklärung der Mechanismen der Gewichtsregulation ist in den letzten Jahren zu einem wichtigen Thema in der Molekulargenetik geworden. Die Genese der Essstörungen ist in den meisten Fällen multifaktorieller Natur. Sowohl psychosozial-kulturelle Einflüsse als auch genetische Faktoren tragen zu den verschiedenen Störungen bei. Der Einfluss genetischer Faktoren könnte aus evolutionsbiologischer Sicht damit erklärt werden, dass Mechanismen, die in Zeiten von Hungersnöten einen selektiven Vorteil darstellten, sich bei dem jetzigen Überangebot an Nahrung sowie der zunehmenden Reduktion des Energieverbrauchs nachteilig auf das Gewicht auswirken. Der Grad der Ausprägung einer Adipositas ist demnach bei prädisponierten Individuen stark abhängig von den Umweltbedingungen [Hebebrand *et al.*, 1995a]. Hebebrand und Mitarbeiter legten in ihrer Studie die Vermutung nahe, dass der genetische Einfluss auf das Gewicht in den letzten Jahren auch dadurch stärker geworden ist, dass stark übergewichtige Menschen sich zunehmend häufiger einen ebenfalls übergewichtigen Partner suchen, was zum Teil auf die vermehrte soziale Stigmatisierung adipöser Menschen in unserer Gesellschaft zurückzuführen ist [Hebebrand *et al.*, 2000].

Die Regulation von Essverhalten und Gewicht findet hauptsächlich im zentralen Nervensystem (ZNS) statt. Der Hypothalamus gilt in diesem Regelkreis als die wichtigste Region. Über eine Vielzahl von Neurotransmittern und deren Rezeptoren erfolgt ein ständiger Informationsfluss zwischen ZNS und Peripherie. Die daran beteiligten Faktoren sind das Produkt von mehreren hundert Genen. Verändern sich diese Genanlagen, z. B. durch Spontanmutationen, können auch Produkte mit veränderter Funktion entstehen. Ein Versuch, solch veränderte Gene zu identifizieren, erfolgt mit dem Kandidatengenansatz. Kandidatengene stellen aufgrund ihrer Funktion, des Expressionsmusters oder ihrer Lokalisation im Genom einen potenziellen Locus für ein bestimmtes Krankheitsgen dar. Den Beweis liefert allerdings erst der Nachweis einer funktionsrelevanten Veränderung des Gens bei den untersuchten Phänotypen. Dieser Nachweis gelang z. B. für das Leptin-Gen [Montague *et al.*, 1997] und das Leptinrezeptor-Gen [Clément *et al.*, 1998], das MC4-Rezeptor-Gen [Hinney *et al.*, 1999] oder auch das POMC-Rezeptor-Gen [Hinney *et al.*, 1998a]. Bei all diesen Genen konnte ein Einfluss auf den Phänotyp Adipositas dargestellt werden (s. Kap. 1.3.2).

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition

Von Adipositas spricht man bei einer übermäßigen Einlagerung von Fett in verschiedene Organe des Körpers, infolge einer dauerhaft den Kalorienbedarf übersteigenden Kalorienzufuhr. Nach Bray [1987] wird als Adipositas definiert, wenn der Fettanteil bei Frauen > 30 % und bei Männern > 25 % beträgt. Studien wie die Nurses-Health-Study [Manson *et al.*, 1995] zeigten, dass die Mortalität bei Übergewicht ab einem BMI > 30 kg/m² deutlich ansteigt. Trotzdem ist es noch nicht allgemein üblich, der Adipositas den Stellenwert einer eigenständigen Krankheit zuzuerkennen. Oftmals werden nur die immer häufiger auftretenden Folgekrankheiten, wie Diabetes mellitus, Gicht, Hypertonie oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen behandelt.

1.1.2 Methoden für die Einteilung des Gewichts

Es gibt eine Reihe von Methoden zur Bestimmung des Gewichts und des Körperfettanteils. Die am häufigsten verwendete Methode zur Einordnung des Gewichts legt den BMI (body mass index, Körper-Masse-Index) zugrunde, auch Quetelets-Index genannt [Hebebrand *et al.*, 1994]. Beim BMI ist der Bezug zur Körperhöhe gering, zum Gewicht aber hoch. Somit gilt er als ausreichend zuverlässig für die Einteilung des Gewichts¹. Die derzeit gebräuchlichste Einteilung nach WHO ist in Tab. 1-1 dargestellt. Der BMI wird wie folgt berechnet:

$$BMI = \frac{\text{Gewicht [kg]}}{\text{Körperlänge [m]}^2}$$

Tab. 1-1 Internationale Klassifikation des Gewichts nach WHO [2004]

Gewichtsklasse	BMI in kg/m ²
- Untergewicht	< 18,50
- Schwergradiges Untergewicht	< 16,00
- Normalgewicht	18,50 – 24,99
- Übergewicht	≥ 25,00
- Adipositas	≥ 30,00
- Adipositas Klasse I	30,00 – 34,99
- Adipositas Klasse II	35,00 – 39,99
- Adipositas Klasse III	≥ 40,00

¹ Nach Ausschluss von Ödemen oder erheblichen Muskelmassen, da hierdurch eine zu hohe Fettmasse vorgetäuscht wird.

Ein Nachteil hierbei ist die Vernachlässigung von Alter und Geschlecht. Dies sind aber wesentliche Faktoren, da das Gewicht mit dem Alter kontinuierlich ansteigt und auch geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist [Hebebrand *et al.*, 1994]. Zur Lösung dieses Problems werden sogenannte Alters-Perzentile-Kurven verwendet [Hebebrand *et al.*, 1995a; Hebebrand *et al.*, 1994; Hebebrand *et al.*, 1995c]. Diese Altersperzentile wurden geschlechtsabhängig für verschiedene Populationen ermittelt (s. Abb. 1.1).

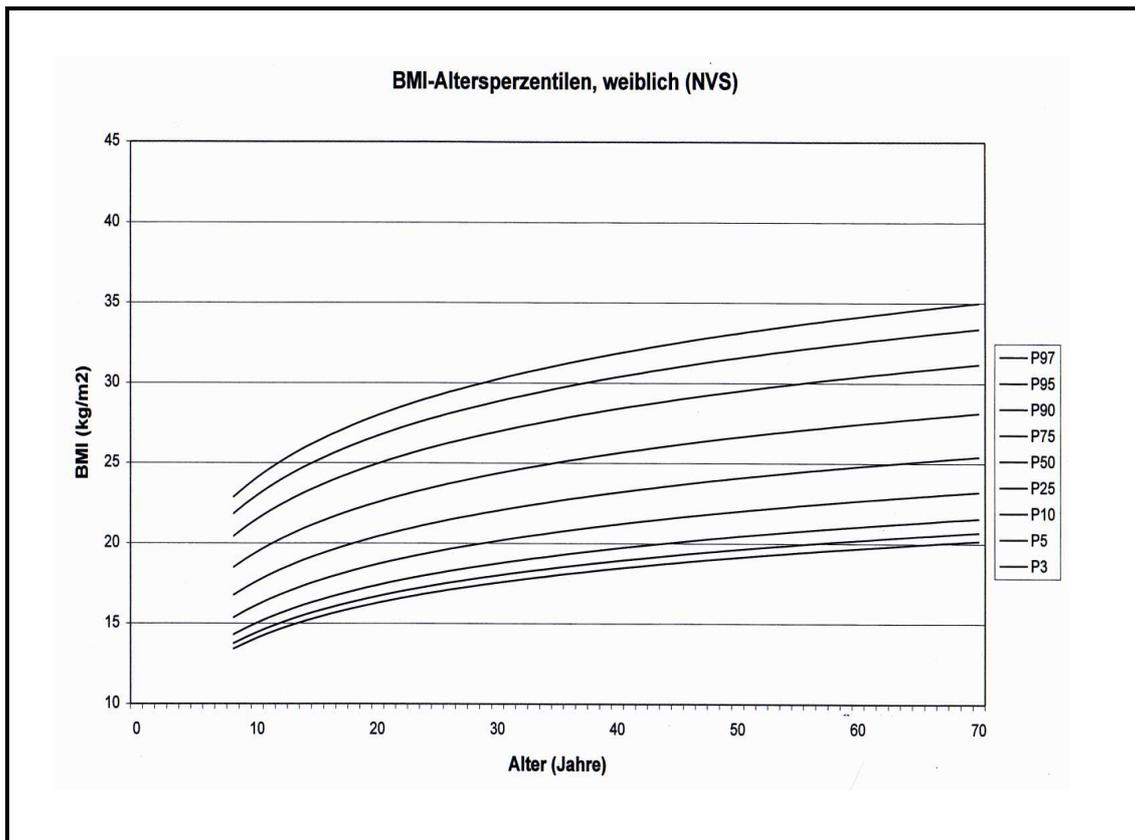


Abb. 1-1: BMI-Altersperzentile der weiblichen deutschen Bevölkerung aus den Daten der Nationalen Verzehrstudie. Übergewicht: BMI \geq 90. Perzentil, Adipositas \geq 97. Perzentil [nach Hebebrand *et al.*, 1994]

1.2 Genetik der Adipositas

1.2.1 Formalgenetische Modelle und Befunde

Es gibt verschiedene Methoden, mit deren Hilfe die Erbllichkeit eines Phänotyps untersucht wird: die Familienstudie, die Zwillingsstudie und die Adoptionsstudie. Ein großer Nachteil aller formalgenetischen Untersuchungen ist die Tatsache, dass nur schwer zwischen Vererbung und Umwelteinflüssen (z. B. Essgewohnheiten, sozialer Status, körperliche Aktivität) unterschieden werden kann [Hebebrand *et al.*, 1995b].

1. Bei der *Familienstudie* werden Kinder, leibliche Eltern und die Verwandtschaft untersucht. Studien zeigten, dass die Eltern-Kind-Korrelationen² für den BMI bei ca. $r = 0,1 - 0,3$ liegen [Hebebrand *et al.*, 1995b; Bouchard *et al.*, 1993]. Zum Teil waren die Mutter-Kind-Korrelationen höher als die Vater-Kind-Korrelationen und die Geschwister-Korrelationen geringfügig über den Eltern-Kind-Korrelationen [Hebebrand *et al.*, 1998b]. Moll *et al.* [1991] kamen in ihrer Studie zu dem Resultat, dass über 75 % der Varianz des BMI³ genetisch bedingt sind.
2. Die *Adoptionsstudien* betrachten Adoptivlinge, Adoptiveltern und leibliche Eltern. Studien unter Verwendung des dänischen Adoptionsregisters und des dänischen Volksregisters [Stunkard *et al.*, 1986; Sorensen *et al.*, 1989; Sorensen *et al.*, 1992] zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem BMI der Adoptivlinge und ihrer Adoptiveltern. Der durchschnittliche BMI der leiblichen Eltern stieg jedoch mit dem der Adoptivlinge an. Diese BMI-Beziehung zwischen leiblichen Müttern und Adoptivlingen war hochsignifikant ($p < 0,0001$), weniger stark ausgeprägt auch zwischen leiblichen Vätern und Adoptivlingen ($p < 0,02$). Im Vergleich zu den Zwillingsstudien liegen die Heritabilitätsschätzungen bei den Adoptions- und Familienstudien deutlich niedriger [Hebebrand *et al.*, 1995b]. Die wesentlichen Probleme bei der Interpretation der Adoptions- und Familienstudien scheinen dabei folgende zu sein [Hebebrand *et al.*, 1995b]:
 - (1) Das Überwiegen der nicht-additiven gegenüber den additiven Geneffekten, wodurch der Nachweis genetischer Faktoren schwieriger wird. Als additive Komponente wird die Summe der durchschnittlichen Einflüsse aller das spezifische Merkmal beeinflussenden Gene bezeichnet. Nichtadditive Einflüsse resultieren aus den Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Allelen an einem Locus oder zwischen Allelen an verschiedenen Loci.

² Korrelation = Kennzahl für die Enge der Beziehung zwischen statistischen Variablen

³ nach Anpassung für Alter, Geschlecht und Verwandtschaftsverhältnis

- (2) Die Beeinflussung des BMI durch altersabhängig unterschiedliche Geneffekte [Fabsitz *et al.*, 1992]. Daher sind Alterskorrekturen, die im Rahmen der Adoptionsstudien durchgeführt wurden, kritisch zu bewerten.
- (3) Das Verwenden unterschiedlicher Modelle bei den Berechnungen, wobei nicht klar ist, welches Modell der Realität am nächsten kommt.
3. *Zwillingsstudien*: Die Untersuchung von gemeinsam und getrennt aufgewachsenen monozygoten und dizygoten Zwillingen ermöglicht eine bessere Trennung zwischen Geneffekten und gemeinsamen Umweltfaktoren. Eine wichtige Studie hierzu kam von Stunkard *et al.* [1990]. Er untersuchte getrennt und gemeinsam aufgewachsene Zwillinge aus Schweden. Die dabei gefundene Heritabilitätsschätzung für den BMI von monozygoten Zwillingspaaren betrug für Frauen 0,66 und für Männer 0,7. Das gemeinsame Aufwachsen schien keinen Einfluss auf den BMI zu haben. Bouchard *et al.* [1990] führten eine Studie zur Erfassung von Genotyp-Umwelt-Interaktionen durch. Dabei wurden zwölf monozygote Zwillinge einhundert Tage lang für fünf Tage in der Woche mit je 1000 kcal zusätzlich zu ihrer durchschnittlichen Kalorienzufuhr ernährt. Die Gewichtszunahme betrug im Durchschnitt 8,1 kg (4,3 - 13,3 kg). Nach der Auswertung fanden sich signifikante Intrapaarrelationen bezüglich der Gewichtszunahme und der Fettverteilung, während sich zwischen den Paaren große Schwankungen zeigten. Dies belegt demnach eine Abhängigkeit des Genotyps von der Menge der aufgenommenen Nahrung. Die großen Schwankungen zwischen den Paaren legen nahe, dass bestimmte Menschen eine erhöhte Kalorienzufuhr besser verwerten können als andere [Hebebrand *et al.*, 1995b].

1.2.2 Tierexperimentelle Befunde

1.2.2.1 Monogene Formen der Adipositas

Die Identifikation von Genen, in denen Mutationen zu einem veränderten Phänotyp führen, ist für die Adipositasforschung in vielerlei Hinsicht interessant. Sie ermöglichen ein besseres Verständnis der Mechanismen der Gewichtsregulation und liefern einen Beleg für die Beteiligung genetischer Faktoren am Phänotyp. Weiterhin bieten sie Hinweise für eventuelle therapeutische Ansätze, an denen auch die Pharmaindustrie großes Interesse zeigt [Hinney *et al.*, 1997a].

Seit 1992 konnten bei der Maus fünf verschiedene *monogene* Formen der Adipositas identifiziert werden (s. Tab. 1-2).

- Besondere Aufmerksamkeit erregte 1994 die Klonierung des *obese* Gens (Leptin) durch Zhang und Mitarbeiter [1994]. Das Produkt dieses Gens, Leptin, wird hauptsächlich in den Fettzellen, in geringerer Menge u. a. auch in Magen oder Plazenta [Bado *et al.*, 1998; Masuzaki *et al.*, 1997] synthetisiert. Über die Blutbahn gelangt es in das Gehirn, wo es an Leptinrezeptoren bindet und dadurch an der zentralen Regulation von Energieaufnahme und -verbrauch [Halaas *et al.*, 1995], an der Reproduktion [Chehab *et al.*, 1997; Ahima *et al.*, 1997] und der Immunfunktion [Lord *et al.*, 1998] beteiligt ist [Coleman, 1978]. Zu den in der Tab. 1-2 gezeigten Symptomen kommt es durch zwei Mutationen. In einem Fall wird keine *mRNA* gebildet, im anderen Fall ist die *mRNA* durch eine Nonsense-Mutation, die zum Abbruch des Leserasters führt, um das 20fache erhöht [Zhang *et al.*, 1994]. Durch Applikation des rekombinanten Proteins konnten eine Gewichtsabnahme, sowie ein Rückgang sämtlicher Begleitsymptome der *ob/ob*-Maus erreicht werden [Halaas *et al.*, 1995; Chehab *et al.*, 1996; Campfield *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1995]. Gleichzeitig kam es zu einer Verringerung der Energieaufnahme und einer Erhöhung des Energieverbrauchs [Halaas *et al.*, 1995].
- Die zweite Form ist die *diabetes* Maus. Das mutierte Gen codiert für den Leptinrezeptor. Identifiziert wurde der Rezeptor 1995 von Tartaglia und Mitarbeitern. Das Gen wird sowohl zentral im Hypothalamus und im Plexus choroideus, als auch peripher in Leukozyten, Lunge, Niere, Ovar, Fettgewebe u. a. exprimiert [Tartaglia *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Cioffi *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1996]. Unterschiedliche Mutationen [Lee *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Chua *et al.*, 1996; Takaya *et al.*, 1996] führen dazu,

dass der Rezeptor nicht in der Lage ist, seine Funktion, die Aktivierung der Signaltransduktion zu erfüllen [Hinney *et al.*, 1997a].

- *Fat*-Mäuse sind homozygot für eine Mutation im Gen für Carboxypeptidase E (*CPE*) [Naggert *et al.*, 1995]. Sie sind gekennzeichnet durch eine chronische Hyperproinsulinämie nach dem Ende der Stillzeit und postpubertär durch eine Adipositas ohne Hyperglykämie [Coleman *et al.*, 1990]. Die normale Funktion der *CPE* besteht in der Aktivierung verschiedener Prohormone, wie Proinsulin oder Proopiomelanocortin. Diese wird durch die Mutation verhindert [Naggert *et al.*, 1995]. *CPE* ist sowohl peripher (Pankreas), als auch zentral (Hypophyse, Gehirn) zu finden, was für einen möglichen Einfluss bei der zentralen Gewichtsregulation sprechen könnte [Hebebrand *et al.*, 1998b].
- Eine weitere Form ist bedingt durch mehrere dominante Mutationen im *Agouti* Gen [Übersicht in Siracusa, 1994]. Diese führt zu einer gelben Fellfarbe, nicht-insulinpflichtigem Diabetes mellitus, Adipositas und einer erhöhten Prädisposition für Tumoren. Das Genprodukt wird nur in den Melanozyten, den Testis und während der Embryonalentwicklung synthetisiert [Bultmann *et al.*, 1992]. Es ist ein parakriner Signalfaktor, der die Umwandlung von Eumelanin (schwarz) zu Phaeomelanin (gelb) durch Herabsetzung des intrazellulären *cAMP*-Spiegels induziert [Bultmann *et al.*, 1992]. Die Mutationen bewirken eine Überexpression in der Melanozyte und eine ektopische Expression in allen Organsystemen [Duhl *et al.*, 1994]. Die genauen Mechanismen, die der Adipositas zugrunde liegen, konnten bisher jedoch nicht vollständig geklärt werden [Hinney *et al.*, 1997a]. Es wird allgemein angenommen, dass eine antagonistische Funktion am *MC4*-Rezeptor (Melanokortinrezeptor 4) der Grund ist [Lu *et al.*, 1994].
- Ein wesentliches Merkmal der *tubby* Mäuse [Coleman *et al.*, 1990] ist der stark reduzierte Energieverbrauch. Das Übergewicht zeigt sich ab der 12.-18. Lebenswoche. Dabei liegt keine Hyperphagie vor. Weitere Symptome sind eine retinale Degenerierung und eine neurosensorisch bedingte Taubheit. Das Gen wird im Gehirn vorwiegend im Kortex, Hippocampus und im Hypothalamus exprimiert. Eine Erklärung, warum die Mutation zu Adipositas führt, konnte bislang noch nicht gefunden werden [Hinney *et al.*, 1997a].

Tab. 1-2 Monogene Formen der Adipositas im Tiermodell [nach Hinney *et al.*, 1997a]

Mutation	Manifestation der Adipositas	Genprodukt	Erbgang	Symptome	Besonderheiten
ob	ersten Lebenswoche	Leptin	rezessiv	Hyperphagie, Diabetes, Hypothermie, Infertilität der Weibchen	Verdopplung bis Verdreifachung des Körpergewichts, Hyperkortisolismus
db	ersten Lebenswochen	Leptin-Rezeptor	rezessiv	Diabetes, Hypothermie, Infertilität	Verdopplung bis Verdreifachung des Körpergewichts, Hyperkortisolismus
Agouti	im adulten Tier (Hyperphagie ab 4. Lebenswoche)	parakriner Signalfaktor	dominant	Typ II Diabetes	gelbe Fellfarbe, erhöhte Tumorrare
fat	12.-18. Lebenswoche	Carboxypeptidase E	rezessiv	Diabetes (weniger ausgeprägt als bei den <i>ob</i> und <i>db</i> Mutationen)	Keine Hyperglykämie, kein Hyperkortisolismus
tub	12.-18. Lebenswoche	möglicherweise Phosphodiesterase	rezessiv	retinale Degeneration und neurosensorische Taubheit bei <i>tub/tub</i> Mäusen	Verdopplung des Körpergewichts, keine Hyperphagie

1.2.2.2 Transgene Tiermodelle

Immer mehr an Bedeutung gewinnen auch transgene Tiermodelle. Hierbei werden unter Verwendung von embryotischen Stammzellen gezielt Veränderungen im Genom vorgenommen. Sogenannte Knockout-Mäuse sind Tiere, bei denen man ein ganz bestimmtes Gen gezielt ausschaltet, um dessen Wirkungen zu prüfen. Ziel ist es, zwei Mäusestämme zu erhalten, die sich nur in dem Knockout-Gen unterscheiden. Folglich können dann Unterschiede im Körperbau oder der Physiologie auf dieses Gen zurückgeführt werden [Strachan und Read, 1996].

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass eine Fehlfunktion in der Expression bestimmter Gene zu Adipositas führen kann. So wurde bei Mäusen mit Hilfe von Antisense *RNA* ein partieller Knockout des Typ-II-Glukokortikoidrezeptors hervorgerufen [Pépin *et al.*, 1992]. Dies führte bei den transgenen Tieren zu einer vermehrten Fetteinlagerung und doppelt so hohem Gewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dabei aßen die transgenen Mäuse 15 % weniger als die Kontrolltiere.

1.2.2.3 Polygene Tiermodelle (Der QTL-Ansatz)

Die Adipositas wird sehr selten durch Mutation in nur einem Gen bedingt. Weit häufiger sind Mutationen in mehreren Genen daran beteiligt, weshalb man auch von polygener Vererbung des Phänotyps spricht. Als Quantitative Trait Loci (*QTL*) werden Abschnitte eines Chromosoms bezeichnet, für die in Studien ein Einfluss auf die Ausprägung

eines quantitativen phänotypischen Merkmals nachgewiesen wurde. Für den *QTL*-Ansatz benötigt man zwei durch Inzucht erzeugte Linien, die sich im untersuchten Phänotyp unterscheiden und eine detaillierte genetische Karte des Tiergenoms. Diese erhält man mit Hilfe von genetischen Markern, die über das gesamte Genom verteilt sind. Mäuse und Ratten sind für diese Versuche besonders geeignet, da für die Chromosomenregionen in vielen Fällen die entsprechenden humanen Chromosomenregionen bekannt sind [Bray *et al.*, 1997]. Ziel dabei ist, eine Kopplung zwischen Phänotyp und Genotyp nachzuweisen. Mittels einer solchen chromosomalen Kartierung von *QTL*-Loci können Regionen lokalisiert werden, die einen messbaren, wenn auch geringen Einfluss auf die Merkmalsausprägung haben. Die *BSB*-Maus wurde beispielsweise durch Rückkreuzung aus *Mus Spretus* und *Mus musculus domesticus* C57BL/6J entwickelt [Fisler *et al.*, 1993]. Die *BSB*-Maus ist durch Übergewicht gekennzeichnet. Vier Loci (*Mouse obesity 1 bis 4; Mob 1-4*) auf vier verschiedenen Chromosomen konnten durch *QTL*-Analyse identifiziert werden. Alle zeigten signifikante *LOD*-Scores für das Körperfett oder bestimmte Fettdepots [Warden *et al.*, 1995]. In einer anderen Studie an Mäusen wurden drei Loci (*Body weight 1 bis 3; Bw1-3*) auf dem X-Chromosom identifiziert, die eine signifikante Verbindung zum Körpergewicht aufwiesen [Dragani *et al.*, 1995].

Tiermodelle stellen einen immer mehr an Bedeutung gewinnenden Ansatz für die Identifikation von Genen dar, die an der Gewichtsregulation beteiligt sind. Durch Identifizierung der entsprechenden homologen Regionen im humanen Genom könnten chromosomale Bereiche lokalisiert werden, die Gene enthalten, die beim Menschen für die Ausprägung des Phänotyps Adipositas verantwortlich sind (=Kandidatengenansatz). Durch die kontinuierlich fortschreitende Forschungsarbeit in diesem Bereich wird die Zahl der *QTL*'s in der Zukunft deutlich ansteigen und so zu einem besseren Verständnis der genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation beitragen.

1.2.3 Molekulargenetische Befunde beim Menschen

Die Identifikation von Gensequenzen im humanen Genom, die zu Adipositas führen können, nimmt in ihrer Bedeutung stetig zu. Nachfolgend sollen einige der wichtigsten stellvertretend vorgestellt werden.

1.2.3.1 Monogene Formen der Adipositas

MC4R (Melanocortinrezeptor 4): Die autosomal dominante Vererbung von Mutationen im *MC4R*-Gen wird derzeit als die wichtigste genetische Ursache für extreme

Adipositas betrachtet und betrifft 2 - 4 % der Menschen mit extremer Adipositas [Hinney *et al.*, 2006]. Der *MC4*-Rezeptor gehört zu einer Gruppe von fünf bekannten Melanocortin-Rezeptoren [Cone *et al.*, 1996]. Er kommt hauptsächlich im Hypothalamus vor, in den Regionen, die für den Appetit und die Gewichtsregulation verantwortlich sind [Gantz *et al.*, 1993; Magenis *et al.*, 1994]. Vaisse *et al.* [1998] und Yeo *et al.* [1998] berichteten über die ersten Mutationen. Die heterozygoten Mutationsträger wiesen alle ein starkes Übergewicht auf. Hinney *et al.* [1999] fanden drei Träger von Haploinsuffizienzmutationen im *MC4R*-Gen bei der Untersuchung von 306 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen. In einer weiterführenden Studie [Sina *et al.*, 1999] an 186 adipösen Probanden konnte der Träger einer Haploinsuffizienzmutation detektiert werden. Daraufhin wurden 43 Familienmitglieder dieser vier Probanden genotypisiert. Insgesamt wurden 19 Mutationsträger identifiziert, von denen 18 stark übergewichtig waren (16 Träger > 95. Perzentil). In einer weiteren Studie wurden 808 extrem übergewichtige Kinder und Jugendliche sowie 327 unter- oder normalgewichtige Kontrollen gescreent, wobei insgesamt 16 verschiedene Mutationen (davon fünf bislang unbekannte) bei den adipösen Probanden identifiziert werden konnten. Neun dieser Mutationen führten zu erniedrigter *cAMP*-Response. In der Folge wurden noch 1040 Elternpaare von 520 der oben genannten adipösen Probanden mittels Transmissions-Disäquilibrium-Test (*TDT*) gescreent. Die Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für den Hauptgeneffekt der *MC4R*-Genmutationen auf die Adipositas [Hinney *et al.*, 2003].

Auch Vaisse und Mitarbeiter [2000] fanden acht Rezeptormutationen, von denen fünf zu einer veränderten Affinität von α -*MSH* an den *MC4R*-Rezeptor bzw. einer veränderten Wirksamkeit nach Aktivierung des *MC4*-Rezeptors führten. Hebebrand *et al.* [2002] screeneten 81 weibliche, stationär wegen Bulimia nervosa behandelte Patienten auf Mutationen im *MC4R*-Gen und fanden bei einer Patientin mit extremer Adipositas und Bulimia nervosa eine Haploinsuffizienz-Mutation im Rezeptorgen. In einer Untersuchung zum quantitativen Effekt der *MC4R*-Genmutationen durch Vergleich des BMI's von 181 phänotypisch unselektierten Verwandten von extrem übergewichtigen Mutationsträgern in insgesamt 25 Stammbäumen mittels Quantitativem Transmissions-Disäquilibrium-Test (*QTD*) fand sich ein signifikant höherer BMI bei den Trägern der funktionell bedeutsamen Mutationen im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten. Dieser Effekt war bei den weiblichen Probanden doppelt so stark ausgeprägt wie bei den männlichen [Dempfle *et al.*, 2004]. Hinney und Mitarbeiter [2006] führten ein Mutationsscreening an 4068 Probanden der *KORA-S4*-Studie (Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg, Survey 4) sowie an 1003

erwachsenen Probanden mit Adipositas durch. Sie fanden 16 (davon 6 bislang unbekannt) nonsynonyme Mutationen in 27 heterozygoten Probanden der *KORA-S4*-Studie, wovon vier zu veränderter Rezeptorfunktion führten. Keiner der sechs Träger war übergewichtig. Bei 13 der adipösen Erwachsenen fanden sie insgesamt 6 nonsynonyme und eine Nonsense-Mutation. Geller *et al.* [2004] führten einen *TDT* an 520 Trios mit Adipositas durch und beobachteten eine niedrigere Transmissionsrate und negative Assoziation des I103 Allels bei den adipösen Probanden, was einen protektiven Effekt der Variante bezogen auf Adipositas nahelegt. In einer der bislang größten Studien zum *MC4R*-Gen wurden Daten europaweiter Assoziationsstudien von 16876 Probanden analysiert und durch weitere Assoziationsuntersuchungen an 60352 Erwachsenen, 5988 Kindern sowie 660 Familien ergänzt. Die Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Varianten in der Nähe des *MC4R*-Gens einen Einfluss auf das Körpergewicht bzw. das Risiko, eine Adipositas zu bekommen haben [Loos *et al.*, 2008].

Leptin-Gen: Das Leptin-Gen wurde in zahlreichen Studien mit Mikrosatellitenmarkern auf Assoziation und Kopplung getestet. Reed *et al.* [1996] fanden unter Verwendung von „affected sib-pairs“ bei 78 amerikanischen Familien eine Kopplung mit Markern, die das Leptin-Gen flankieren. Bei dem am häufigsten auftretenden Haplotyp, der von zwei flankierenden Markern gebildet wurde, fand sich auch ein Hinweis auf Assoziation. Bei der Untersuchung von 87 Familien aus Deutschland konnte dieser Befund bestätigt werden [Roth *et al.*, 1997]. Vier Mutationen im codierenden Bereich des Leptin-Gens wurden bisher bei der Untersuchung von weltweit mehr als 400 adipösen Personen gefunden. Alle Untersuchungen zusammengefasst, ist jedoch nur eine Mutation mit funktioneller Relevanz identifiziert worden. 1997 gelang der Nachweis einer monogen bedingten Form der Adipositas beim Menschen. Montague *et al.* [1997] fanden zwei homozygote Träger⁴ mit einer funktionell relevanten Mutation im Leptin-Gen, die zu einer früh einsetzenden massiven Adipositas führt. Diese Form der Adipositas ist auf eine extreme Hyperphagie zurückzuführen. Das Mädchen wog im Alter von 8 Jahren bereits 86 kg (bei einer Körperlänge von 137 cm). Die Eltern waren heterozygot und phänotypisch nicht auffällig. Die Mutation in Form einer Deletion eines von sechs Guaninen bewirkt, dass das gebildete Leptin nicht aus den Adipozyten freigesetzt werden kann. Bei der Untersuchung von 388 deutschen extrem adipösen Kindern und Jugendlichen konnte diese Mutation nicht detektiert werden, was zu der Annahme führt, dass diese Mutation in Deutschland, wenn überhaupt, sehr selten vorkommt [Hinney *et al.*, 1997a; Hebebrand *et al.*, 1998b]. Bisher gibt es auch keinen

⁴ Cousin und Cousine blutsverwandter Eltern einer pakistanischen Familie

erkennbaren Zusammenhang der Mutation zu den gefundenen Hinweisen auf Kopplung oder Assoziation [Clément *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 1997].

Leptinrezeptor-Gen: Auch zum Leptinrezeptor-Gen wurden Kopplungsstudien durchgeführt. Bei einer Studie an 716 Pima-Indianern fand sich kein Hinweis auf Kopplung zu mehreren Adipositas-relevanten Phänotypen [Norman *et al.*, 1996]. Chagnon und Mitarbeiter [1997] fanden Kopplung von mehreren Markern zu Körperfettanteil und Höhe der Insulinspiegel. Allerdings wurden hierbei 7 Mikrosatelliten und 7 verschiedene Merkmale getestet, die p-Werte jedoch nicht für multiples Testen korrigiert [Hebebrand *et al.*, 1998b]. Die Arbeitsgruppe um Thompson [1997] fand bei Pima-Indianern drei Polymorphismen in nicht-codierenden Bereichen, die ausschließlich bei den adipösen Probanden vorkamen. Daraus kann man auf eine Assoziation zwischen diesen Varianten des Leptinrezeptor-Gens und der Adipositas bei den Pima-Indianern schließen. Clément *et al.* [1998] fanden drei Schwestern blutsverwandter Eltern, die homozygot für eine Mutation im Leptinrezeptor-Gen sind. Sie wiesen eine extreme Adipositas und eine primäre Amenorrhoe auf.

POMC-Gen: Das Proopiomelanokortin stellt die Vorstufe für die Peptide α -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon), β -MSH, γ -MSH, ACTH und β -Endorphin dar. Diese Peptide üben vielfältige Funktionen aus (s. Tab. 1-3). Mutationen im humanen Proopiomelanocortin-Gen (*POMC*-Gen), die zu starkem Übergewicht, Nebenniereninsuffizienz und roter Haarfarbe führen, wurden von Krude und Mitarbeitern identifiziert [1998]. Bei einem Probanden fanden sich zwei verschiedene Mutationen im Exon 3 des *POMC*-Gens, welche die ACTH- und α -MSH-Synthese negativ beeinflussen. Ein zweiter Proband war homozygot für eine Mutation im Exon 2, die zum Abbruch der *POMC*-Translation führt. In einem systematischen Mutationsscreening von Hinney *et al.* [1998a] konnten weitere Polymorphismen und Mutationen im *POMC*-Gen bei adipösen Probanden gefunden werden.

Tab. 1-3 Peptide des *POMC* [nach Hinney *et al.*, 1998a]

	α -MSH	γ -MSH	ACTH	β -Endorphin
Funktion	ZNS: Neuromodulator		ZNS: Neuromodulator;	ZNS: Analgesie;
	Peripherie: Melanozyten-stimulation	Peripherie: Stimulation der Zona glomerulosa in den Nebennieren	Peripherie: Stimulation der Nebennierenrinden- hormone und Lipolyse	Peripherie: Immunmodulation

Carboxypeptidase-E-Gen: Eine weitere Form der monogenen Adipositas fand man bei einer Frau mit zwei Mutationen (Compound heterozygot) im Carboxypeptidase-E-Gen, ähnlich der fat-Maus [Jackson *et al.*, 1997].

1.2.3.2 Syndromale Formen der Adipositas

Syndromale Formen der Adipositas beruhen auf Chromosomenaberrationen oder Mutationen einzelner Gene. Diese sind begleitet von Auffälligkeiten wie geistige Behinderung, Fehlbildungen oder Hypogenitalismus. Ein Beispiel hierfür ist das *Prader-Willi-Syndrom*, das neben einer stammbetonten Adipositas mit Intelligenzminderung, Dysmorphiezeichen und Verhaltensauffälligkeiten einhergeht. Die Betroffenen zeigen eine massive Hyperphagie und einen reduzierten Grundumsatz [Hebebrand *et al.*, 1995a]. Eine zweite Form ist das *Bardet-Biedl-Syndrom*, welches neben Adipositas und Intelligenzminderung mit einer retinalen Pigmentierung einhergeht [Hebebrand *et al.*, 1998b]. Derartige Syndrome können durch Identifikation der verantwortlichen Gene dabei helfen, ein besseres Verständnis für die Mechanismen der Adipositasentstehung zu bekommen [Hebebrand *et al.*, 1995b].

1.3 Anorexia nervosa

Die Anorexia nervosa ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung mit ausgeprägter Chronifizierungstendenz und verhältnismäßig hoher Mortalitätsrate [Hebebrand *et al.*, 1995c; Hebebrand *et al.*, 1998a]. Das BMI-Kriterium im Erwachsenenalter ist definiert durch einen BMI $\leq 17,5$ für beide Geschlechter. Der Manifestationsgipfel liegt um das 14. - 16. Lebensjahr [Hebebrand *et al.*, 1998a]. Die Lebenszeitprävalenz, also das Risiko, an Anorexia nervosa zu erkranken beträgt für Frauen 0,5 – 1 %, für Männer nur 0,05 - 0,1 % [Hebebrand *et al.*, 1998a]. Soziokulturelle und biologische Faktoren werden für diese Geschlechtsspezifität diskutiert. Bedenkt man jedoch, dass bereits im Mittelalter junge Frauen mit einer ähnlichen Symptomatik beschrieben wurden, sind die soziokulturellen Faktoren kritisch zu hinterfragen [Hebebrand *et al.*, 1995c; Hebebrand *et al.*, 1998a]. Die Kriterien nach dem diagnostischen und statistischen Manual psychischer Störungen (*DSM-IV*) sind in Tab. 1-4 dargestellt.

Tab. 1-4 Diagnosekriterien für Anorexia nervosa nach dem Diagnostischen und statistischen Manual psychischer Störungen (DSM-IV) [Kriterien der American Psychiatric Association; 1994]

-
- A. Weigerung, das Minimum des für Alter und Körpergröße normalen Körpergewichts zu halten (z. B. der Gewichtsverlust führt dauerhaft zu einem Körpergewicht von weniger als 85 % des zu erwartenden Gewichts; oder das Ausbleiben einer während der Wachstumsperiode zu erwartenden Gewichtszunahme führt zu einem Körpergewicht von weniger als 85 % des zu erwartenden Gewichts).
 - B. Ausgeprägte Ängste vor einer Gewichtszunahme oder davor, dick zu werden, trotz bestehenden Untergewichts.
 - C. Störung in der Wahrnehmung der eigenen Figur und des Körpergewichts, übertriebener Einfluss des Körpergewichts oder der Figur auf die Selbstbewertung, oder Leugnen des Schweregrades des gegenwärtigen geringen Körpergewichts.
 - D. Bei postmenarchalen Frauen das Vorliegen einer Amenorrhoe, d. h. das Ausbleiben von mindestens drei aufeinanderfolgenden Menstruationszyklen (Amenorrhoe wird auch dann angenommen, wenn bei einer Frau die Periode nur nach Verabreichung von Hormonen, z. B. Östrogen, eintritt).
-

Restriktiver Typus: Während der aktuellen Episode der Anorexia nervosa hat die Person keine regelmäßigen „Fressanfälle“ gehabt oder hat kein „Purging“-Verhalten (das heißt selbst induziertes Erbrechen oder Missbrauch von Laxanzien, Diuretika oder Klistieren) gezeigt.

„Binge-Eating/Purging“-Typus: Während der aktuellen Episode der Anorexia nervosa hat die Person regelmäßig Fressanfälle gehabt und/oder hat Purgingverhalten (d. h. selbst induziertes Erbrechen oder Missbrauch von Laxanzien, Diuretika oder Klistieren) gezeigt.

Unter Verwendung von Zwillings- und Familienstudien ergaben sich Hinweise auf eine genetische Mitbeteiligung [Holland und Hall, 1984; Holland und Sicotte, 1988]. Die größte durchgeführte Zwillingsstudie ergab Heritabilitätsschätzungen bis zu 80 % [Holland *et al.*, 1988]. Bei einem Vergleich konkordanter mit diskordanten eineiigen Zwillingen ergab sich, dass die Indexpatientinnen der konkordanten Zwillingspaare ein niedrigeres Gewicht in der Akutphase aufgewiesen hatten [Treasure *et al.*, 1991]. Kaye *et al.* [1991] fanden erhöhte Spiegel an 5-Hydroxyindolessigsäure im Liquor von Patientinnen mit Anorexia nervosa, die zum Zeitpunkt der Studie Normalgewicht und eine konstante Nahrungsaufnahme aufwiesen. Auch molekulargenetische Untersuchungen wurden durchgeführt. So fand man eine positive Assoziation zu einem Allel eines Polymorphismus im Promoter des Serotonin 5HT_{2a}-Rezeptor-Gens [Collier *et al.*, 1997]. In einer weiteren Studie konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden [Hinney *et al.*, 1997c]. Die *Anorexia-Maus (anx/anx)* zeigt eine starke serotoninerge Hyperinnervation. Die Jungen, die homozygot für eine autosomal rezessive Mutation sind, sterben durch Verhungern [Son *et al.*, 1994]. In einer Studie am Östrogen β -Rezeptor-Gen (*ER β*) fanden Rosenkranz und Mitarbeiter [1998a] eine positive Assoziation des 1082-G Allels eines 1082 G/A Polymorphismus zu den Patienten mit Anorexia nervosa. Allerdings scheint dieser Polymorphismus ohne funktionelle Relevanz zu sein. Untersuchungen am Leptin-Gen schlossen eine Beteiligung an der Entstehung der Anorexia nervosa weitgehend aus [Hinney *et al.*, 1998b]. Dardennes und Mitarbeiter [2007] fanden bei der Untersuchung an 114 Probanden mit Anorexia nervosa und ihren Eltern mittels *TDT* eine Assoziation zu einem Polymorphismus im Proghrelin-Gen sowie für einen weiteren

Polymorphismus im Agouti-related protein (*AgRP*)-Gen, dessen Produkt ein appetitanregendes Neuropeptid ist. Einen weiteren Hinweis für die genetische Prädisposition fanden Brown *et al.* [2007] durch positive Assoziation bei der Untersuchung von 226 weiblichen Probanden mit Anorexia nervosa zu drei Polymorphismen im opioid delta 1 (*OPRD1*)-Rezeptorgen sowie zu zwei Polymorphismen im Serotonin-1-D (*HTR1D*)-Rezeptorgen. In einer Studie an 191 Probanden mit Anorexia nervosa, 457 Eltern sowie betroffenen Verwandten mit einer nach *DSM-IV* klassifizierten Essstörung wurde mittels *TDT* eine Assoziation zu einer Insertions-/Deletionsmutation sowie zwei Polymorphismen im Dopamin D2 (*DRD2*)-Rezeptorgen beobachtet [Bergen *et al.*, 2005]. Fasst man die genannten Studien zusammen, wird deutlich, dass die Anorexia nervosa durch zahlreiche Gene beeinflusst ist. Die weitere Eingrenzung und Identifikation relevanter Gene könnte möglicherweise einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige pharmakologische Therapien liefern. Ein sehr hoffnungsvoller Ansatz, bedenkt man die hohe Chronifizierungs- und Mortalitätsrate der Störung.

1.4 Bulimia nervosa

Die Bulimia nervosa ist der Anorexia nervosa in ihrem Erscheinungsbild ähnlich. Die entsprechenden Kriterien nach *DSM-IV* sind in Tab. 1-5 dargestellt. Die wesentlichen Unterschiede sind der fehlende Gewichtsverlust und der spätere Manifestationszeitpunkt [Hoffmann und Hochapfel, 1995; Remschmidt, 2000]. Die Bulimia nervosa ist gekennzeichnet durch eine übersteigerte Angst vor Gewichtszunahme und durch Fressattacken mit anschließendem Erbrechen (s. Tab. 1-5). Wie bei der Anorexia nervosa ist ein Zusammenhang mit bestimmten soziokulturellen Einflüssen gegeben. Dies zeigt sich durch die hohe Prävalenz in den westlichen Kulturkreisen, ein erhöhtes Auftreten bei Einwanderern, die Zunahme in den letzten Jahrzehnten und ein vermehrtes Auftreten in Risikogruppen (z. B. Fotomodelle, bestimmte Sportarten) [Remschmidt, 2000]. Persönlichkeitsstörungen, Selbstwertprobleme und geringe Frustrationstoleranz sind begünstigende Einflüsse. Betroffen sind fast ausschließlich junge Frauen. Die Prävalenzrate für das weibliche Geschlecht liegt bei 2 – 3 % [Remschmidt, 2000]. Die ständige gedankliche Beschäftigung mit dem Essen führt zu Konzentrationsstörungen, Arbeitsstörungen und sozialem Rückzug. Die physischen Konsequenzen des andauernden Erbrechens reichen von einer Zerstörung der Zähne (durch die Salzsäure des Magensaftes) bis zur kardialen Funktionsstörung (durch die Hypokaliämie) [Hoffmann und Hochapfel, 1995]. Im Gegensatz zur Anorexie ist das Bewusstsein vorhanden, an einer schweren Essstörung zu leiden. Es herrscht ein großer Leidensdruck vor, mit der Meinung, die

Krankheit aus eigener Kraft nicht bewältigen zu können [Hoffmann und Hochapfel, 1995]. In einer Studie von Bulik *et al.* [1998] ergaben die Schätzungen zur Erblichkeitsrate der Bulimia nervosa Werte bis zu 83 %. Das relative Risiko, an Bulimie zu erkranken, ist für erstgradige Angehörige von Bulimia nervosa-Patienten etwa um das 4,4-fache erhöht [Strober *et al.*, 2000]. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um funktionell relevante Gene zu identifizieren. Untersuchungen an Kandidatengenen, wie den 5-HT-Rezeptor-Genen (Serotoninrezeptoren) [Ziegler *et al.*, 1999; Nacmias *et al.*, 1999], dem *POMC*-Gen [Hinney *et al.*, 1998a] oder dem *MC4R*-Gen [Hinney *et al.*, 1999] erbrachten allesamt negative Ergebnisse. Ando und Mitarbeiter [2006] fanden eine positive Assoziation bei 108 Probanden mit Bulimia nervosa vom Purging Typus zu zwei Polymorphismen im Proghrelin-Gen. In einer anderen Untersuchung am Ghrelinrezeptor (*GHSR*)-Gen bei 116 Probanden einer japanischen Population mit Bulimia nervosa fand sich eine signifikant höhere Frequenz des Allels im Vergleich zur Kontrollgruppe [Miyasaka *et al.*, 2006]. Auch bei der Bulimia nervosa häufen sich also die Belege für einen genetischen Hintergrund der Störung. Die Aufklärung der genetischen Mechanismen der Essstörungen stellt sicher ein interessantes Feld für mögliche neue Therapieansätze dar.

Tab. 1-5 Diagnosekriterien für Bulimia nervosa nach dem *DSM-IV* [Kriterien der American Psychiatric Association; 1994]

-
- A. Wiederholte Episoden von „Fressattacken“. Eine „Fressattacke“-Episode ist gekennzeichnet durch beide der folgenden Merkmale:
 1. Verzehr einer Nahrungsmenge in einem bestimmten Zeitraum (z. B. innerhalb eines Zeitraumes von 2 Stunden), wobei diese Nahrungsmenge erheblich größer ist, als die Menge, die die meisten Menschen in einem vergleichbaren Zeitraum und unter vergleichbaren Bedingungen essen würden.
 2. Das Gefühl, während der Episode die Kontrolle über das Essverhalten zu verlieren (z. B. das Gefühl, weder mit dem Essen aufhören zu können, noch Kontrolle über Art und Menge der Nahrung zu haben).
 - B. Wiederholte Anwendung von unangemessenen, einer Gewichtszunahme gegensteuernden Maßnahmen, wie z. B. selbst induziertes Erbrechen, Missbrauch von Laxanzien, Diuretika, Klistieren oder anderen Arzneimitteln, Fasten oder übermäßige körperliche Betätigung.
 - C. Die „Fressattacken“ und das unangemessene Kompensationsverhalten kommen drei Monate lang im Durchschnitt mindestens zweimal pro Woche vor.
 - D. Figur und Körpergewicht haben einen übermäßigen Einfluss auf die Selbstbewertung.
 - E. Die Störung tritt nicht ausschließlich im Verlauf von Episoden einer Anorexia nervosa auf.
-

„*Purging*“-Typus: Die Person induziert während der aktuellen Episode der Bulimia nervosa regelmäßig Erbrechen oder missbraucht Laxanzien, Diuretika oder Klistiere.

„*Nicht-Purging*“-Typus: Die Person hat während der aktuellen Episode der Bulimia nervosa andere unangemessene, einer Gewichtszunahme gegensteuernde Maßnahmen gezeigt wie beispielsweise Fasten oder übermäßige körperliche Betätigung, hat aber nicht regelmäßig Erbrechen induziert oder Laxanzien, Diuretika oder Klistiere missbraucht.

1.5 Molekulargenetische Analysemöglichkeiten beim Menschen

Für die Identifikation von veränderten Sequenzen im humanen Genom, die zu Veränderungen eines Phänotyps führen, werden verschiedene Ansätze benutzt. Im folgenden Abschnitt sollen die am häufigsten verwendeten vorgestellt werden.

1.5.1 Kopplung und Genom-Scan

Unter Kopplung versteht man, dass manche durch Gene codierte Merkmale im Laufe mehrerer Generationen gemeinsam vererbt werden. Dabei handelt es sich um eine spezifische Beziehung zwischen Genloci, nicht von Allelen oder Phänotypen. Kopplung führt zwar innerhalb von Familien zur Assoziation, nicht jedoch bei nicht verwandten Personen. Kopplung liegt vor, wenn zwei oder mehrere Gene, die auf benachbarten Genloci liegen, gemeinsam vererbt werden [Strachan und Read, 1996].

Bei Kopplungsuntersuchungen werden spezifische Allele innerhalb einer Familie betrachtet, die gehäuft mit einem bestimmten Phänotyp auftreten. Hierfür kommen vorwiegend Geschwister-Paar (Sib-pair)-Methoden zur Anwendung. Dabei werden neben dem Indexprobanden mindestens ein Geschwister sowie die Eltern in die Studie einbezogen. Bei der *affected Sib-pair-Methode* werden Familien rekrutiert, in denen mindestens zwei Geschwister eine spezifische Krankheit haben. Bei dem *konkordanten Sib-pair-Ansatz* werden für quantitative Merkmale Familien rekrutiert, in denen zwei Geschwister beispielsweise in der obersten Dezile liegen. Beim *diskordanten Sib-pair-Ansatz* sollten sich die Geschwister möglichst stark im Hinblick auf den quantitativen Phänotyp unterscheiden. Hierbei muss darauf geachtet werden, ob die Geschwister auch wirklich leiblich sind und ob sie sich zu einem anderen Zeitpunkt im Phänotyp ähnlich waren (z. B. könnte das dünne Geschwister des adipösen Indexprobanden früher ebenfalls adipös gewesen sein) [Hebebrand *et al.*, 1998b].

Mit Kopplungsuntersuchungen in Form von Genom-Scans kann man systematisch nach relevanten Regionen im gesamten Genom suchen. Dafür werden 300 bis 500 Marker verwendet, die im Abstand von 5 bis 10 cM (Zentimorgan) über alle Chromosomen verteilt sind [Hebebrand *et al.*, 1998b]. Als Marker eignen sich z. B. Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind kurze repetitive Sequenzen (Palindrome) von ein bis vier Nukleotiden Länge, die mehrfach wiederholt werden. Am häufigsten sind C/A oder T/G Repeats [Strachan and Read, 1996]. Man verwendet dafür Familien mit

mindestens zwei Kindern, die speziell zu dem untersuchten Merkmal rekrutiert wurden (Sib-pair Methode).

Auf diese Weise fanden Comuzzie *et al.* [1997] eine positive Kopplung zwischen Leptinwerten im Serum und einem Marker auf dem Chromosom 2 (2p21). Als mögliche Kandidatengene liegen das Gen für das Glukokinase regulatorische Protein (*GCKR*) und das Gen für *POMC* am nächsten. Hager *et al.* [1998] entdeckten bei ihrer Studie an 514 adipösen Probanden (158 Familien) eine mögliche Kopplung zum Chromosomabschnitt 10p12 mit einem maximalen logarithmic odds ratio (*LOD*)-Score von 4.85. Der *LOD*-Score dient zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, ob zwei Gen-Loci auf demselben Chromosom ausreichend nahe beieinander liegen und somit gekoppelt vererbt werden. Ein *LOD*-Score > 3 wird als Zeichen für eine Kopplung gesehen (Strachan und Read, 1996). In einer weiterführenden Studie an 386 deutschen adipösen Kindern und Jugendlichen (93 Familien) fand man ebenfalls Hinweise auf Kopplung in diesem Bereich [Hinney *et al.*, 2000b]. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein Gen in dieser Region an der Ausprägung des Phänotyps Adipositas beteiligt ist. Saar und Mitarbeiter gingen in ihrer Untersuchung der Frage nach, inwieweit Gene, die das Körpergewicht beim Erwachsenen beeinflussen, auch in der Kindheit und Jugend eine Rolle spielen. Sie screeneten dafür 369 Probanden auf 437 Marker sowie 76 Familien auf Marker, die in Zwillingstudien *LOD*-Scores $> 0,7$ gezeigt hatten und beobachteten positive Signale für die Chromosomen 10p11.23 und 11q13. Sie schlossen daraus, dass sich die genetischen Grundlagen für Adipositas im Kindes- und Erwachsenenalter vielleicht doch nicht so sehr unterscheiden wie ursprünglich angenommen [Saar *et al.*, 2003].

1.5.2 Kandidatengenansatz

Ein Kandidatengen ist ein Gen, das aufgrund einer bekannten Eigenschaft (Funktion, Expressionsmuster, Lokalisation im Genom, Strukturmotiv) als potenzieller Locus für ein bestimmtes Krankheitsgen betrachtet werden kann. Neben den monogenen und transgenen Formen als Ursache für die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps sind dies auch Gene, die durch pharmakologische, biochemische, genetische und physiologische Überlegungen als Kandidatengene angesehen werden [Hebebrand *et al.*, 1998b]. Kandidatengene für das Körpergewicht können Energieaufnahme, -verbrauch oder beides beeinflussen. Kandidatengene für Adipositas beim Menschen sind beispielsweise die Gene, die in mutierter Form diesen Phänotyp bei der Maus bedingen [Hebebrand *et al.*, 1998b].

1.5.2.1 Assoziationsuntersuchungen

In Assoziationsuntersuchungen vergleicht man die Häufigkeit eines relevanten Allels zwischen nicht verwandten Merkmalsträgern und einem nicht verwandten Kontrollkollektiv innerhalb einer Population [Hebebrand *et al.*, 1998]. Von positiver Assoziation spricht man, wenn das merkmalsverursachende Allel signifikant häufiger in der Gruppe der Merkmalsträger auftritt. Dies kann eintreten, wenn das Allel die direkte Ursache für die Krankheit ist, eine sehr enge Kopplung auf der Populationsebene vorliegt (linkage disequilibrium) oder auch als falsch positive Assoziation, wenn die untersuchte Population nicht ausreichend homogen (population stratification, admixture, Stratifikation) war (s. auch Kap. 3.7.1).

1.5.2.2 Transmissions-Disäquilibrium-Test (TDT)

Um Effekte wie die der Stratifikation zu vermeiden, wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Eines davon ist der Transmissions-Disäquilibrium-Test (TDT), der zur Überprüfung positiver Assoziation eingesetzt wird. Mit diesem wird verglichen, ob das relevante Allel genauso häufig an den adipösen Indexprobanden transmittiert wurde, wie es nicht transmittiert wurde. Dieser Test berücksichtigt jedoch ausschließlich Eltern, die heterozygot für das relevante Allel sind. Daher deckt dieser Test nur dann Assoziation auf, wenn gleichzeitig eine Kopplung vorliegt [Hebebrand *et al.*, 1998b].

1.5.3 Kandidatengene für das Körpergewicht

Die Regulation des Gewichts erfolgt durch eine Vielzahl miteinander verbundener Prozesse, die sowohl zentral als auch peripher gesteuert werden. So sind beispielsweise das im Fettgewebe zu findende Leptin oder auch das Insulin seit längerem für eine Beteiligung an der Gewichtsregulation bekannt (s. Kap. 1.3.2 und 1.3.3). In den letzten Jahren konnten zahlreiche relevante Kandidatengene identifiziert werden, von denen drei stellvertretend vorgestellt werden sollen.

Neuropeptid Y (NPY)

Das Neuropeptid Y (NPY) wird sowohl zentral, als auch peripher exprimiert. Es gilt als starker Stimulator für die Nahrungsaufnahme [Stanley *et al.*, 1984]. Erhöhte Spiegel fand man im Liquor von Patienten mit Anorexia nervosa und Bulimia nervosa [Kaye *et al.*, 1990]. Knockout-Mäuse für NPY hingegen zeigten ein gegenüber den Kontrolltieren unverändertes Essverhalten und Körpergewicht [Erickson *et al.*, 1996]. Tiesjema und Mitarbeiter [2007] injizierten virale Partikel mit NPY in die Region des N. paraventricularis bei Ratten, was zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts mit erhöhter Fettmasse führte. Weiterhin konnte ein Anstieg der

peripheren Leptin- und Insulinspiegel bereits vor der Nahrungsaufnahme beobachtet werden. In einer weiteren Studie wurde berichtet, dass Stressfaktoren wie Kälte oder Aggressionen zu einer erhöhten Freisetzung von zentralem *NPY* führten, was wiederum in einer vermehrten Expression von *NPY* und dem *NPY2*-Rezeptor im abdominalen Fett resultierte und damit zu einem Fettwachstum führte [Kuo *et al.*, 2007].

β3-adrenerger Rezeptor

Das adrenerge System spielt eine große Rolle bei der peripheren Regulierung der Energiebalance. So sind die Rezeptoren an der Katecholamin-induzierten Regulation der Lipolyse und Thermogenese beteiligt. In Ratten vermittelt der vor allem im Fettgewebe vorkommende β 3-adrenerge Rezeptor die lipolytische Aktivität der Adipozyten. Lönnqvist und Mitarbeiter [1995] fanden bei 25 adipösen Probanden eine 50-fach erhöhte Sensitivität des β 3-adrenergen Rezeptors, korreliert mit der Adrenalin induzierten Lipolyse und dem Fettzellvolumen. Ein in verschiedenen Studien identifizierter Polymorphismus *Trp64Arg* wurde von Clement *et al.* [1995] bei einem französischen Kollektiv mit schwerer Adipositas auf Assoziation getestet. Die Verteilung des Allels unterschied sich nicht signifikant zur Kontrollgruppe. Jedoch waren die heterozygoten Träger innerhalb der Adipositasgruppe mit im Durchschnitt 140 kg Körpergewicht schwerer als die ohne die Mutation, was für eine erhöhte Anfälligkeit zur Gewichtszunahme sprechen könnte. In einer weiteren Studie zu diesem Polymorphismus konnte kein maßgeblicher Einfluss bei Heterozygotie auf den Phänotyp Adipositas entdeckt werden [Hinney *et al.*, 1997b].

Ghrelin

Das Peptid Ghrelin wird vorwiegend im Magen produziert, gilt als starker Appetitanreger und steigert die Sekretion des Wachstumshormons (*STH*, *GH*). Es ist beteiligt an der langfristigen Regulation des Gewichts und der postprandialen Sättigung [Übersicht in Dostalova und Haluzik, 2008]. Exogene Verabreichung von Ghrelin stimuliert bei Tieren und Menschen die Nahrungsaufnahme [Übersicht in Heiman und Witcher, 2006]. In einer Studie von Foster und Mitarbeitern [2007] an adipösen jungen Frauen, die für 48 h keine Nahrung zu sich nahmen, stellte man fest, dass die Höhe der Ghrelin-Spiegel mit dem BMI assoziiert war, jedoch nicht mit dem aktuellen Zustand der Nahrungsaufnahme. Feigerlova und Mitarbeiter [2008] fanden bei Kindern mit Prader-Willi-Syndrom deutlich erhöhte Plasma-Ghrelinspiegel, sowohl bei denen mit Wachstumshormonbehandlung als auch bei denen ohne. Wang und Mitarbeiter [2004] untersuchten das Ghrelinrezeptor-Gen (*GHSR*) auf Mutationen und mögliche

Assoziation bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, normal- und untergewichtigen gesunden Studenten sowie Kindern mit geringer Körpergröße und Normalgewicht (short normal stature, SNS) und fanden mehrere Polymorphismen, davon eine Missense-Variante, die nur bei einem adipösen und einem Kind mit SNS vorkam.

Die hier beispielhaft vorgestellten Kandidatengene bzw. deren Produkte verdeutlichen den zunehmenden Stellenwert der Genetik auf dem Gebiet der Essstörungen. Gleichzeitig wird deutlich, auf wie vielen verschiedenen Ebenen das Essverhalten und die Gewichtskontrolle beeinflusst werden. Ein weiteres Neurotransmittersystem, welches hierbei in den Fokus der Humangenetik rückte, ist das galaninerge System, welches im folgenden Abschnitt genauer vorgestellt werden soll, da es Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.6 Galanin (GAL)

Galanin (GAL) wurde erstmals 1983 von der Forschergruppe um Viktor Mutt aus dem Schweinedarm isoliert [Tatemoto *et al.*, 1983; Crawley, 1999]. Der Name setzt sich zusammen aus *G* für Glycin am N-Terminus und *alanin* für Alanin am C-Terminus [Rattan *et al.*, 1999]. Das Gen für das humane GAL konnte auf dem Chromosomenabschnitt 11q13.3-q13.5 lokalisiert werden [Evans *et al.*, 1993]. Das humane reife Peptid besteht aus 30, das bei allen bisher untersuchten Tierspezies aus 29 Aminosäuren [Tatemoto *et al.*, 1983]. Im Gegensatz zur tierischen Form besitzt GAL beim Menschen kein carboxyterminales Amid [Bersani *et al.*, 1991]. Bisher scheint die Sequenz einzigartig zu sein. Es wurden keine Übereinstimmungen mit anderen Peptiden gefunden [Crawley, 1999; Wang *et al.*, 1998b]. Die Sequenz der 15 N-terminalen Aminosäuren ist bei den meisten untersuchten Spezies, wie z. B. Mensch, Ratte oder Schwein nahezu identisch [Crawley, 1995; Bartfai *et al.*, 1992; Hökfelt *et al.*, 1987]. Hohe Konzentrationen des Peptids, der *mRNA* und entsprechender Rezeptorbindungsstellen wurden im Gehirn gefunden, vor allem im Hypothalamus [Melander *et al.*, 1986; Bartfai *et al.*, 1993; Merchenthaler *et al.*, 1993] und in Cortex und Amygdala, geringere Konzentrationen in Thalamus, Pons und Cerebellum [Johard *et al.*, 1992].

Die Funktionen des GAL im Gehirn sind noch nicht endgültig geklärt. Die bisherigen Studienergebnisse weisen auf einen endokrinen Charakter hin, basierend auf der Tatsache, dass Injektionen von GAL in das zentrale Nervensystem (ZNS) die Konzentrationen von Wachstumshormon (STH, GH) und Prolaktin im Blut erhöhen und

die von Insulin, Somatostatin, Neurotensin, Enteroglucagon, Adrenokortikotropin, Kortikosteron, Acetylcholin, Serotonin und Noradrenalin senken [Koenig *et al.*, 1991; Tempel *et al.*, 1990]. Durch seine Beeinflussung verschiedener Neurotransmittersysteme wird vermutet, dass GAL auch am Sexualverhalten, dem Lernen und der Gedächtnisbildung, dem Schmerz, der Motilität des Gastrointestinaltrakts [Bauer *et al.*, 1989], der Herzfrequenz und dem Blutdruck beteiligt ist [Carey *et al.*, 1993; Crawley, 1995]. Ebenfalls scheint es mitogene Effekte bei bestimmten Krebsarten zu besitzen [Suefferlein *et al.*, 1996; Ormandy *et al.*, 1998; Invitti *et al.*, 1999], wodurch GAL und seine Rezeptoren zunehmend Bedeutung als Tumormarker erhalten [Mitsukawa *et al.*, 2008]. Eine Überexpression im basalen Vorderhirn wurde bei Patienten mit Morbus Alzheimer gefunden [Kask *et al.*, 1997]. Transgene Mäuse, bei denen GAL zentral überexprimiert wurde, zeigten Defizite in Lern- und Gedächtnis-Tests [Crawley, 2008]. In anderen Studien wurde festgestellt, dass GAL die Glutamatausschüttung im Hippocampus inhibiert und auf diese Weise antikonvulsiv wirksam ist [Zini *et al.*, 1993; Lerner *et al.*, 2008]. Zudem gibt es zahlreiche Belege für eine Beteiligung des galaninergen Systems an der Entstehung von Depression und Angst [Lu *et al.*, 2005; Swanson *et al.*, 2005; Kuteeva *et al.*, 2008] sowie eine Beteiligung an der Entstehung der Alkoholabhängigkeit [Belfer *et al.*, 2007].

1.6.1 Galanin (GAL) - Nahrungsaufnahme und Gewichtsregulation

Durch zahlreiche Tierstudien wurde in der Vergangenheit der Nachweis der Beteiligung von GAL am Essverhalten erbracht [Übersicht in Crawley, 1999]. Die wesentlichen Veränderungen in der Konzentration der GAL- und der GAL-mRNA-Spiegel, die sich auf die Nahrungsaufnahme auswirken, finden in den Regionen des Nucleus paraventricularis und der externen Zone der Eminentia mediana statt [Leibowitz *et al.*, 1998a; Leibowitz *et al.*, 1998b, Leibowitz *et al.*, 1992, Wang *et al.*, 1997]. Einige der Ergebnisse sollen nachfolgend vorgestellt werden.

1.6.1.1 Tierstudien

1. Die Injektion von GAL führt zu vermehrter Aufnahme fettreicher Nahrung, Erhöhung der Fettdepots und Senkung des Energieverbrauchs.

Smith *et al.* [1994] injizierten Ratten 3 mal täglich über 7 Tage hinweg GAL in den dritten Ventrikel. Die Ratten wurden während dieser Zeit entweder fettreich oder fettarm ernährt. Die hervorgerufene Steigerung der Nahrungsaufnahme am Tage wurde bei beiden Gruppen kompensiert durch eine verminderte nächtliche Nahrungsaufnahme. Signifikante Gewichtsunterschiede konnten nicht festgestellt werden. Durch Injektion synthetischer Fragmente (bestehend aus verschiedenen

Aminosäureabschnitten des reifen GAL) in den Hypothalamus von Ratten versuchte man herauszufinden, welcher Aminosäurenbereich des reifen Peptids für die Veränderung der Nahrungsaufnahme verantwortlich ist. Eine Steigerung der Nahrungsaufnahme zeigte sich nur bei GAL 1-29 und GAL 1-16 (die ersten 16 Aminosäuren) bei Injektion von 6 nmol in den lateralen Ventrikel bzw. 1 nmol in den Hypothalamus. Keine signifikanten Veränderungen der Nahrungsaufnahme wurden bei intraventrikulärer Injektion der Fragmente 1-9, 10-20, 12-29, 17-29 und 21-29 hervorgerufen [Crawley *et al.*, 1990]. In einer Arbeit von Yun *et al.* [2005] wurden die Veränderungen nach kurzzeitigen bzw. über einen längeren Zeitraum verabreichten Injektionen von GAL in den N. paraventricularis von Ratten überprüft. Nach kurzzeitiger Injektion wurden der Kohlenhydratstoffwechsel im Muskel erhöht, die Glukosespiegel im Blut erniedrigt und die Fettoxidation reduziert. Die längerfristige GAL-Injektion erhöhte beim Anbieten fettreicher Nahrung signifikant die Gesamtenergiezufuhr und führte zu einer starken Erhöhung der Fettdepots im Vergleich zu den Kontrolltieren. In der Studie von Nagase *et al.* [1996] kam es nach Injektion in den dritten Ventrikel von Ratten zu einer Reduktion der sympathischen Aktivierung des braunen Fettgewebes und des Energieverbrauchs.

2. Die Injektion von GAL-Antagonisten in den N. paraventricularis führt zur Reduktion des Fettanteils bei der Nahrungsaufnahme und kurzzeitiger Gewichtsabnahme.

In einer Studie reduzierten die Ratten nach Injektion von M40, einem GAL-Antagonisten, die in Form von Fett angebotene Nahrung erheblich [Leibowitz *et al.*, 1992]. Aussagen über eine Gewichtsveränderung während des Beobachtungszeitraumes wurden in dieser Studie nicht gemacht. In einer anderen Studie führte die Injektion von Antisense-Oligodeoxynukleotiden zu einem erheblichen Abfall der GAL-Level im N. paraventricularis verknüpft mit einer starken Abnahme des in Form von Fett (Wahl zwischen Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettmahlzeit) angebotenen Anteils bei der Nahrungsaufnahme [Akabayashi *et al.*, 1994]. Dabei kam es auch zu einer signifikanten Gewichtsabnahme gegenüber den Kontrolltieren ($p < 0,05$) in den drei Wochen der Beobachtung. In der gleichen Studie fand man weiterhin eine positive Korrelation zwischen kurzzeitiger Gewichtszunahme und den GAL-Spiegeln im Serum bzw. der GAL-Genexpression im N. paraventricularis.

3. Fettreiche Nahrung führt zu erhöhter GAL-Konzentration im Hypothalamus.

Bei Ratten, die vermehrt Fett mit der Nahrung zu sich nahmen, waren die GAL-Konzentration und die GAL-mRNA-Konzentration im Hypothalamus, vor allem im N.

paraventricularis gegenüber den Tieren erhöht, die vermehrt Kohlenhydrate und Eiweiß zu sich nahmen [Leibowitz *et al.*, 1998a]. Auch wiesen die Fett bevorzugenden Ratten eine deutlich höhere Gewichtszunahme als die Kontrolltiere auf. In einer weiteren Studie von Leibowitz *et al.* [1998b] war ein ähnliches Ergebnis zu beobachten. Die Tiere, die ständig fettreiche Mahlzeiten zu sich nahmen, hatten ein höheres Gewicht und signifikant höhere GAL-Spiegel in N. paraventricularis und Eminentia mediana als die Tiere, die eine kohlenhydratreiche Nahrung bevorzugten. In einer jüngeren Arbeit von Leibowitz und Mitarbeitern [2005] konnte beobachtet werden, dass die Galaninausschüttung im N. paraventricularis durch fettreiche Mahlzeiten oder Alkoholkonsum stimuliert wird bzw., wenn es zentral injiziert wird, die Nahrungsaufnahme steigert, vor allem den als Fett aufgenommenen Anteil. Erstaunlicherweise führte 48stündiger Nahrungsentzug bei Ratten ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration von GAL und GAL-mRNA im N. paraventricularis. Die nachfolgend angebotene Nahrung wurde vermehrt in Form von Fett aufgenommen [Wang *et al.*, 1998b].

4. GAL-Knockout-Mäuse essen weniger Fett, verändern jedoch nicht das Gewicht.

Wynick und Mitarbeiter führten Untersuchungen mit Knockout-Mäusen für das GAL-Gen durch, bei denen die Veränderung des Gewichts untersucht wurde. Das Gewicht dieser Tiere unterschied sich weder in den ersten 8 Lebenswochen, noch im erwachsenen Tier signifikant von dem der Wildtyp-Kontrollen [Wynick *et al.*, 1998]. Das gleiche wurde bei transgenen Mäusen beobachtet, die GAL überexprimierten [Hohmann *et al.*, 1997]. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass kompensatorische Gene den Phänotyp der Mutation verdecken [Crawley, 1999]. Adams *et al.* [2008] untersuchten Knockout-Mäuse für das GAL-Gen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in Hinblick auf das Gewicht, wenn nur fettreiche Nahrung angeboten wird und stellten eine signifikant höhere Energieaufnahme und stärkere Gewichtszunahme der Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den Knockout-Tieren fest. Ein Effekt, der durch dauerhafte Verabreichung von GAL mittels einer osmotischen Pumpe in den lateralen Ventrikel zum Teil rückgängig gemacht werden konnte.

5. GAL interagiert über Neuropeptid Y (NPY) mit Leptin.

In einer Studie von Bergonzelli *et al.* [2001] konnte eine Wechselwirkung zwischen GAL und Leptin bei der durch den Hypothalamus gesteuerten Nahrungsaufnahme dargestellt werden, die über das Neuropeptid Y (NPY) und das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) gesteuert wird. So bewirkte GAL eine dosisabhängige Stimulation der

Sekretion von *NPY* und *CRH* im Hypothalamus, während Leptin die Sekretion von *NPY* senkte. Leibowitz und Mitarbeiter [2007] untersuchten an männlichen, präpubertären, noch normalgewichtigen, aber genetisch für Adipositas anfälligen Ratten die Möglichkeiten einer Prognose für die Entwicklung des Phänotyps Adipositas. Bereits vor Entwicklung der Adipositas konnten im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhte Leptin-, Insulin-, Triglycerid- und Glucosespiegel im Serum, erhöhte *GAL*-Spiegel im N. paraventricularis sowie erniedrigte *NPY*-Spiegel im N. arcuatus gefunden werden.

Die oben beschriebenen Studien zusammengefasst lässt sich sagen, dass *GAL* die Nahrungsaufnahme steigert, v. a. den als Fett aufgenommenen Anteil an der Nahrung, zu kurzfristiger Gewichtszunahme führen kann und den Energieverbrauch senkt. Widersprüchlich sind die Ergebnisse bezüglich der langfristigen Gewichtszunahme, die offensichtlich durch Interaktions-Mechanismen, wie sie beispielsweise über die Achse Galanin-Neuropeptid Y-Leptin dargelegt wurden, gegenreguliert wird.

1.6.1.2 Untersuchungen am humanen Galanin (*GAL*)

1. *GAL*-Level-Untersuchungen in Plasma, Serum und Liquor bei Adipositas, Anorexia und Bulimia nervosa ergaben widersprüchliche Ergebnisse.

Für das humane Galanin wurden bislang nur wenige Studien durchgeführt, die einem möglichen Einfluss auf die Gewichtsregulation nachgingen. Die nachfolgend vorgestellten Untersuchungen konzentrierten sich auf die Plasma-, Serum- und Liquorkonzentration von Galanin bei Frauen mit Adipositas, Anorexia und Bulimia nervosa.

In einer Studie von Baranowska *et al.* [1997] waren die Plasma-*GAL*-Level bei 48 Patientinnen mit Adipositas (BMI 31 - 40 kg/m², Alter 35.4 ± 0.6 Jahre; BMI > 40 kg/m², Alter 34.3 ± 3.4 Jahre; sowie BMI 31 - 40 kg/m²+ non insulin dependent diabetes mellitus (*NIDDM*), Alter 43.8 ± 2.6 Jahre) gegenüber der normalgewichtigen Kontrollgruppe (19 Frauen mit BMI 22.0 ± 0.3, Alter 28.7 ± 2.6) signifikant erhöht. Bei der ebenfalls im Rahmen dieser Studie untersuchten Gruppe von 15 Frauen mit Anorexia nervosa fanden sich keine Konzentrationsunterschiede zur Kontrollgruppe. Eine positive Korrelation ($p < 0.05$) der Plasma-*GAL*-Level zum Taille-Hüfte-Umfang⁵ in der Gruppe adipöser Frauen (BMI 36 ± 3,7 kg/m², Alter 49.6 ± 5.4 Jahre) fanden

⁵ Verhältnis von Taille zu Hüfte (waist-to-hip ratio) zur Abschätzung der regionalen Fettverteilung. Von abdominaler Adipositas spricht man, wenn das Verhältnis bei Frauen > 0,85 und > 1,0 bei Männern liegt [Wirth, 1997].

Milewicz und Mitarbeiter [2000b] in ihrer Studie. Hingegen waren in einer Untersuchung von Invitti und Mitarbeitern [1995] an 30 übergewichtigen (durchschnittlicher BMI: $44.3 \pm 1.47 \text{ kg/m}^2$, Alter 23 - 49 Jahre), 11 anorektischen (durchschnittlicher BMI $14.8 \pm 0.57 \text{ kg/m}^2$, Alter 16 - 27 Jahre) und 35 normalgewichtigen Frauen (durchschnittlicher BMI $21.2 \pm 0.36 \text{ kg/m}^2$, Alter 22 - 43 Jahre) keine signifikanten Unterschiede in der Plasma-GAL-Konzentration bei allen drei Gruppen zu beobachten gewesen.

In einer weiteren Untersuchung [Milewicz *et al.*, 2000a] zu prä- und postmenopausalen GAL-Konzentrationsunterschieden fanden sich signifikant höhere Serum-GAL-Werte bei 10 adipösen postmenopausalen Frauen (BMI $34,7 \pm 1,5 \text{ kg/m}^2$) im Vergleich zu 15 adipösen prämenopausalen Frauen (BMI $34,6 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$) und einer Kontrollgruppe von 16 normalgewichtigen prämenopausalen Frauen. Im Gegensatz dazu waren in einer vergleichbaren Studie von Baranowska *et al.* [2000] die Plasma-GAL-Spiegel signifikant niedriger in der Gruppe von 48 postmenopausalen adipösen oder normalgewichtigen Frauen im Vergleich zu 35 prämenopausalen Frauen mit Adipositas oder Normalgewicht. Jedoch unterschieden sich die niedrigeren Plasmaspiegel der postmenopausalen adipösen Frauen nicht signifikant von denen der prämenopausalen adipösen Frauen. Innerhalb der Gruppe der postmenopausalen Frauen waren jedoch die Werte bei den adipösen Frauen signifikant höher als bei den normalgewichtigen Frauen. Bei einem Vergleich der GAL-Konzentrationen im Liquor von Patientinnen mit Anorexia und Bulimia nervosa zu einer gesunden Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden [Berrettini *et al.*, 1988].

Kritisch anzumerken an den hier vorgestellten Studien ist, dass die GAL-Spiegel jeweils aus dem Plasma, Serum oder Liquor bestimmt wurden, die Konzentration in Plasma und Serum aber eher von der GAL-Produktion der peripheren Organe abhängt und die GAL-Konzentration im Liquor hauptsächlich von der Synthese im Rückenmark. Somit ist es unwahrscheinlich, dass Unterschiede in der GAL-Konzentration im Hypothalamus durch Liquor- bzw. Plasmaspiegelmessung gemessen werden können [Crawley, 1999]. In Bezug auf den Einfluss des GAL's auf das Essverhalten und die Gewichtsregulation finden die maßgeblichen Veränderungen jedoch im Hypothalamus statt, vor allem in den Regionen des N. paraventricularis und der Eminentia mediana [Leibowitz, 2005, Wang *et al.*, 1998b]. Ein weiterer Nachteil der oben genannten Studien sind sicherlich auch die verhältnismäßig geringen Fallzahlen der untersuchten Studiengruppen, so dass die Trennschärfe der erhaltenen Ergebnisse niedrig ausfällt.

2. Kein Hinweis auf Assoziation von neu identifizierten Mutationen im GAL-Gen zu frühkindlicher Adipositas.

In der Studie von Schäuble *et al.* [2005], die von der Forschergruppe unter der Leitung von Prof. Hebebrand durchgeführt wurde und auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit beinhaltet, wurde die codierende Region des GAL-Gens auf Mutationen und mögliche Assoziation bei 191 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 106 gesunden untergewichtigen Kontrollen untersucht. Hierbei konnten drei neue Polymorphismen (zwei stille Mutationen und eine Missense-Mutation) sowie eine seltene Missense-Variante identifiziert werden. Die Genotyp- und Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant in den untersuchten Gruppen.

3. GAL hemmt die Magen-Darmmotilität und reduziert den postprandialen Anstieg zahlreicher Verdauungsenzyme.

Bauer und Mitarbeiter [1989] injizierten ihren Probanden GAL intravenös, was zu einer ausgeprägten Hemmung der Magen-Darmmotilität führte. Zudem reduzierte es erheblich den postprandialen Anstieg von Glukose, Insulin, Enteroglukagon, Somatostatin und anderen Peptiden.

Die bisherigen Ergebnisse der Studien am humanen GAL lassen noch keinen Schluss auf eine maßgebliche Beeinflussung auf die Nahrungsaufnahme und die Gewichtsregulation zu. Nachgewiesen wurden jedoch eine starke Hemmung der Darmmotilität sowie eine Veränderung der Konzentration zahlreicher, an der Verdauung beteiligter Enzyme.

1.7 Die Galaninrezeptoren

1.7.1 Der Galaninrezeptor 1 (GALR1)

Der GALR1 wurde das erste Mal aus humaner cDNA eines Bowes Melanoms und fetalem Gehirn isoliert [Habert-Ortoli *et al.*, 1994], später im Gastrointestinaltrakt vom Ösophagus bis zum Rektum [Lorimer *et al.*, 1996] und aus menschlichen Fibroblasten [Nicholl *et al.*, 1995]. Der humane GALR1 besteht aus 349 Aminosäuren in insgesamt 3 Exons und gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [Probst *et al.*, 1992], die aus sieben transmembranären Helices bestehen, wie in Abb. 1-2 zu ersehen ist. Der klonierte GALR1 reduziert die Konzentration von cAMP [Habert-Ortoli *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1995; Burgevin *et al.*, 1995], öffnet G-Protein gekoppelte, in die Zelle gerichtete K⁺-Kanäle [Smith *et al.*, 1998] und aktiviert die mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase [Suefferlein *et al.*, 1996] in einem Vorgang, der durch Pertussis-

Toxin beeinflussbar ist. Dies ist konsistent mit dem Wissen über die G-Proteine vom inhibierenden Typ, die durch das Pertussis-Toxin in ihrer Funktion gehemmt werden. Das Gen für den humanen *GALR1* wurde auf dem Chromosom 18q23 lokalisiert [Nicholl *et al.*, 1995].

Der humane *GALR1* konnte peripher im Herz, Dünndarm, Prostata, den Testes sowie zentral im Kortex, Hypothalamus, Amygdala und Substantia nigra lokalisiert werden [Sullivan *et al.*, 1997; Lorinet *et al.*, 1994; Walli *et al.*, 1994]. Bei Untersuchungen an Ratten, deren *GALR1*-Sequenz zu 94 % mit der humanen übereinstimmt, konnte die entsprechende *mRNA* zentral im Hypothalamus, Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm und Rückenmark detektiert werden [Parker *et al.*, 1995; Burgevin *et al.*, 1995; Gustafson *et al.*, 1996]. Das Verteilungsmuster des Rezeptors und die Ausübung der Funktion über inhibitorische G-Proteine legen eine inhibierende Funktion auf die Freisetzung zahlreicher Neurotransmitter oder Hormone nahe, mit Effekten auf Nahrungsaufnahme, Wachstum, Emotion, Gedächtnis, Nozizeption und Epilepsie sowie Motilität und Sekretion des Darms [Branchek *et al.*, 2000; Branchek *et al.*, 1998]. Beispielsweise wurde bei Kombination von *GALR1/GALR2*-Agonisten ein ausgeprägter antikonvulsiver Effekt beobachtet [Saar *et al.*, 2002]. Weiterhin wird vermutet, dass vor allem der *GALR1* für den beobachteten analgetischen Effekt von *GAL* und dessen synergistischer Effekte mit Opiaten verantwortlich ist [Hua *et al.*, 2004]. In einer Studie von Cody *et al.* [1997] wiesen alle untersuchten Kinder mit einer Wachstumshormon-Insuffizienz eine Deletion von ca. 2 Mb des Chromosoms 18q23 auf, was dazu führt, dass kein *GALR1* vorhanden ist. Dies impliziert eine mögliche Rolle des Rezeptors bei Wachstum und Entwicklung durch Wirkung auf das Wachstumshormon (*STH*, *GH*). Es ist bekannt, dass das *STH* am Glukose- und Fettstoffwechsel beteiligt ist. So erhöht es bei Nahrungsmangel die Glykogenolyse und die Lipolyse [Klinke und Silbernagl, 1996]. In einer Untersuchung an fünf adipösen Kindern potenzierte das verabreichte *GAL* die Freisetzung von Wachstumshormon signifikant im Vergleich zu den Kontrollen [Loche *et al.*, 1990].

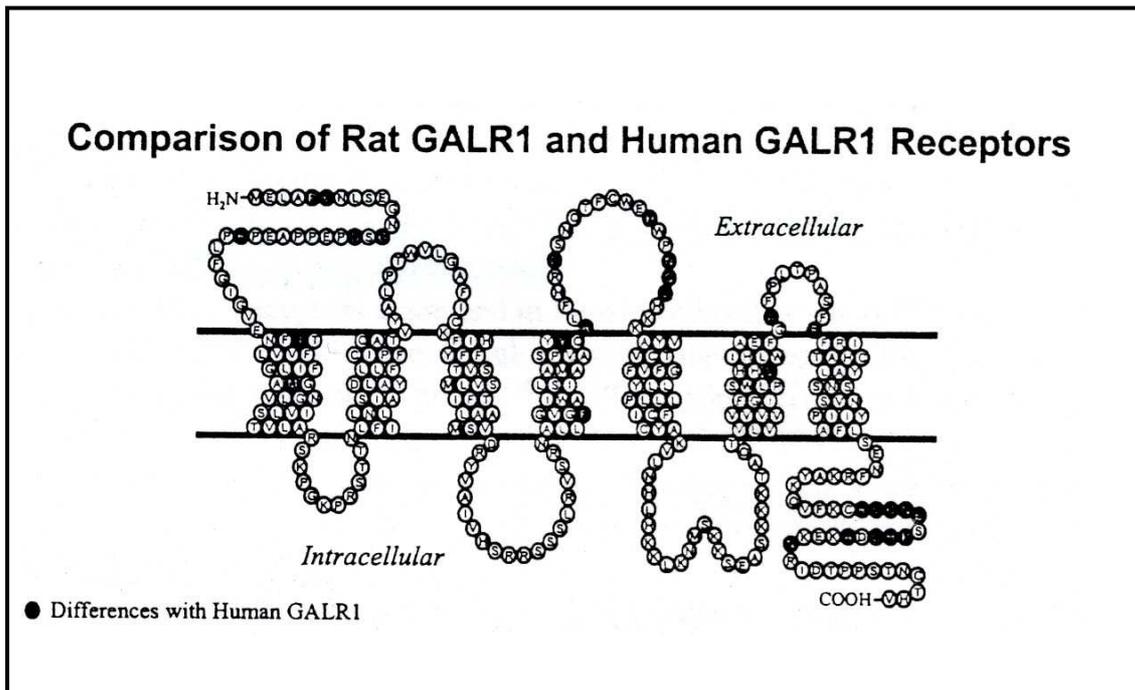


Abb. 1-2 Vergleich der Aminosäuresequenzen des rat-GALR1 und des humanen GALR1. Der GALR1 gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen. Schwarz markiert sind die vom humanen Rezeptor divergenten Aminosäuren des rat-GALR1 [Entnommen aus Branchek *et al.*, 1998].

1.7.1.1 GALR1 - Essverhalten und Gewichtsregulation

1. Bei Fettdeprivation kommt es zum Anstieg der GALR1-mRNA-Konzentration im N. paraventricularis.

Nach bisherigen Untersuchungen scheint vor allem der GALR1 Relevanz für den Einfluss von GAL auf das Essverhalten aufzuweisen. In Schweden wurde der Effekt der Glukose- und Fettdeprivation auf die GALR1-mRNA-Konzentration im N. paraventricularis und N. supraopticus bei Ratten untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg der mRNA in beiden Kerngebieten [Gorbatyuk *et al.*, 1998]. In einer weiteren Studie wurde aufgrund des Bindungsverhaltens von GAL-Analogen postuliert, dass der GALR1, dessen spezifische Analoge eine schwache Aktivität zeigten oder aber ein weiterer, bislang unbekannter Rezeptorsubtyp mit ähnlichem Bindungsverhalten für den Einfluss auf das Essverhalten verantwortlich sind [Wang *et al.*, 1998a].

2. Die GALR1-Knockout-Maus nimmt bei Anbieten fettreicher Nahrung erst mehr und dann weniger Nahrung zu sich.

Zorilla *et al.* [2007] entwickelten eine GALR1-Knockout-Maus, bei der es im Vergleich zu den Kontrolltieren bei dreitägiger Gabe fettreicher Nahrung zu einer signifikanten Steigerung der Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme sowie Hyperglykämie kam. In den darauffolgenden zwei Wochen jedoch nahmen die Knockout-Mäuse pro Tag

deutlich weniger Nahrung zu sich als die Kontrolltiere. Diese Studie unterstreicht die Hypothese, dass der Einfluss von GAL auf das Essverhalten über den *GALR1* vermittelt wird und dass bei der langfristigen Gewichtsregulation offensichtlich gegenregulatorische Mechanismen greifen.

1.7.2 *GALR2* und *GALR3*

Der klonierte *GALR2* besteht aus 387 Aminosäuren [Borowsky *et al.*, 1998]. Das entsprechende Gen konnte auf dem Chromosom 17q25.3 lokalisiert werden [Fathi *et al.*, 1998]. Der Rezeptor ist sowohl zentral in Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala, und Hypophyse, als auch peripher in Herz, Niere, Leber, Dünndarm und Retina zu finden [Fathi *et al.*, 1998; Borowsky *et al.*, 1998]. Nach Aktivierung vermittelt der *GALR2* die Inositolphosphat-Hydrolyse [Smith *et al.*, 1997; Fathi *et al.*, 1998], die intrazelluläre Ca^{2+} -mobilisation [Smith *et al.*, 1997; Fathi *et al.*, 1998], Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Cl^{-} -Kanälen [Smith *et al.*, 1997] sowie Inhibition der *cAMP*-Akkumulation [Fathi *et al.*, 1998]. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass *GALR2*-Agonisten einen neuroprotektiven und neurogenetischen Effekt vermitteln und daher einen Ansatz für die Behandlung von kognitiven bzw. neurodegenerativen Störungen wie dem M. Alzheimer darstellen könnten [Elliot-Hunt *et al.*, 2004; Hobson *et al.*, 2008].

Der *GALR3* besteht aus 368 Aminosäuren mit 2 Exons und einem Intron nach der 3. transmembranären Domäne, wie auch der *GALR2* [Smith *et al.*, 1998]. Das Gen für den Rezeptor ist lokalisiert auf dem Chromosom 22q12.2-13.1 [Kolakowski *et al.*, 1998]. *GALR3-mRNA* wurde bei Ratten in hohen Konzentrationen zentral in Hypothalamus und Hypophyse, in geringeren Konzentrationen in Bulbus olfaktorius, Kortex, Medulla oblongata, Putamen, Cerebellum und Rückenmark, peripher in Leber, Niere, Magen, Hoden, Nebennierenrinde und -mark, Lunge, Milz und Pankreas detektiert [Smith *et al.*, 1998]. Durch seine zahlreichen Lokalisationen könnte der *GALR3* in zahlreiche Regulationsmechanismen wie Emotion, Hormonsekretion aus der Hypophyse, Nozizeption, Nahrungsaufnahme u. a. involviert sein. *GALR3*-Antagonisten scheinen einen antidepressiven und anxiolytischen Effekt zu haben [Swanson *et al.*, 2005, Kuteeva *et al.*, 2008]. Die Ergebnisse der Studie von Wang und Mitarbeitern [1998a] sprechen jedoch gegen einen Einfluss auf das Essverhalten. Sie schlossen aus ihrer Studie mit Galaninanalogen, dass die Rezeptoren *GALR2* und *GALR3* bei Ratten keinen Einfluss auf das Essverhalten haben, der *GALR2* jedoch die Kontraktion des Jejunums vermittelt.

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass der *GALR1* für die Vermittlung des Effekts auf die Nahrungsaufnahme verantwortlich ist, weshalb er im Fokus der vorliegenden Arbeit steht. In der nachfolgenden Tab. 1-6 sollen die bisher bekannten drei *GAL*-Rezeptoren nochmals gegenübergestellt werden.

Tab. 1-6 Die drei humanen Galaninrezeptoren

Rezeptor	<i>GALR1</i>	<i>GALR2</i>	<i>GALR3</i>
Chromosomale Lokalisation	18q23	17q25.3	22q12.2-13.1
Größe	3 Exons, 349 AS [Jacoby et al., 1997]	2 Exons, 387 AS [Borowsky et al., 1998]	2 Exons, 368 AS [Smith et al., 1998]
Exon1	222 AS [Jacoby et al., 1997] NH ₂ -Terminus bis zur 5. transmembranären Domäne [lismaa et al., 1998]	368 bp [Fathi et al., 1998], NH ₂ -Terminus bis zur 3. transmembranären Domäne [lismaa et al., 1998]	359 bp, NH ₂ -Terminus bis zur 3. transmembranären Domäne [lismaa et al., 1998]
Intron1	ca. 5 Kb [lismaa et al., 1998]	ca. 1,4 Kb [lismaa et al., 1998]	954 bp [lismaa et al., 1998]
Exon2	22 AS [Jacoby et al., 1997] 3. intrazelluläre Schleife ⇒ Interaktion mit G-Proteinen [lismaa et al., 1998]	796 bp [Fathi et al., 1998], Rest des Rezeptors von der 2. intrazellulären Schleife bis zum COOH-Terminus [lismaa et al., 1998]	748 bp, Rest des Rezeptors von der 2. intrazellulären Schleife bis zum COOH-Terminus [lismaa et al., 1998]
Intron2	ca. 11kb	-	-
Exon3	105 AS [Jacoby et al., 1997] Rest des Rezeptors von der 6. transmembranären Domäne bis zum COOH-Terminus	-	-
Rezeptortyp	G-Protein gekoppelter Rezeptor	G-Protein gekoppelter Rezeptor	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Homologie der Aminosäuren	92 % identisch zu rat- <i>GALR1</i> [Parker et al., 1995]	39 % identisch zu <i>GALR1</i> , 85 % identisch zu rat <i>GALR2</i> [Borowsky et al., 1998],	37 % identisch zu <i>GALR1</i> [Smith et al., 1998], 57 % identisch zu <i>GALR2</i> [Borowsky et al., 1998], 90 % identisch zu rat <i>GALR3</i> [Smith et al., 1998]
Lokalisation	<u>zentral</u> : Hypothalamus, Kortex, Amygdala, Substantia nigra [Sullivan et al., 1997; Lorinet et al., 1994; Walli et al., 1994] <u>peripher</u> : Herz, Dünndarm, Prostata, Testis; [Sullivan et al., 1997], Magen-Darm-Trakt [Lorimer et al., 1996, Habert-Ortoli et al., 1994]	<u>zentral</u> : Hypothalamus, Hypophyse, Hippocampus, Nucleus supraopticus, Nucleus arcuatus, Amygdala <u>peripher</u> : Herz, Dünndarm, Niere, Leber, Retina [Borowsky et al., 1998, Fathi et al., 1998, Kolakowski et al., 1998]	<u>peripher</u> : Testis, Nebenniere, Pankreas [Kolakowski et al., 1998]

1.8 Ziel der Arbeit

In der Vergangenheit haben verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen dem Peptid Galanin (*GAL*) und dem Essverhalten belegt. Im Tierversuch führten Injektionen von *GAL* in das ZNS zu gesteigerter Nahrungsaufnahme, v. a. des Fettanteils an der Nahrung. Umgekehrt führte die gesteigerte Aufnahme fettreicher Nahrung zur erhöhten Konzentration von *GAL* im Gehirn. Zudem konnte eine Interaktion von *GAL* und den Peptiden Leptin und Neuropeptid Y (*NPY*) nachgewiesen werden, denen ebenfalls eine maßgebliche Beeinflussung des Essverhaltens nachgewiesen werden konnte. Noch keine endgültige Klarheit gibt es darüber, über welchen der drei bekannten Galaninrezeptoren das *GAL* seinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und ggf. die Gewichtskontrolle ausübt. Im Tierversuch gab es zahlreiche Hinweise dafür, dass diese Funktion über den Galaninrezeptor 1 (*GALR1*) vermittelt wird. So führte Fettdeprivation bei Ratten zu einem Anstieg der *GALR1-mRNA*-Level im N. paraventricularis. Bei der *GALR1*-Knockout-Maus kam es nach Anbieten fettreicher Nahrung zu einer kurzfristigen Steigerung der Nahrungsaufnahme.

Zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem galaninergeren System und der Ausprägung des Gewichts beim Menschen wurden bislang nur sehr wenige Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen durchgeführt. Bislang konnte die Frage, ob über das galaninerge System auch die langfristige Gewichtsregulation beeinflusst wird, noch nicht schlüssig beantwortet werden. Die hier vorliegende Arbeit war die erste, die das Galaninrezeptor 1 (*GALR1*)-Gen gezielt auf einen möglichen Einfluss auf die Ausprägung des Gewichts beim Menschen untersucht hat.

Wir untersuchten systematisch, ob eine Assoziation zwischen einem der untersuchten Phänotypen, insbesondere der extremen Adipositas im Kindes- und Jugendalter und einer möglichen Allelvariante im *GALR1*-Gen des Menschen vorliegt. Das Untersuchungsgut bestand aus Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas, Probanden mit Anorexia oder Bulimia nervosa und einer Kontrollgruppe aus gesunden untergewichtigen Studenten.

Die Schritte lassen sich im Einzelnen untergliedern in:

- Suche nach Varianten im codierenden Bereich (Exons 2 und 3) des *GALR1*-Gens
- Ermittlung der flankierenden Intronsequenz am 5'-Ende des Exon 2 des *GALR1*-Gens
- Assoziationsuntersuchungen des gefundenen Polymorphismus zu einem der untersuchten Phänotypen

2 Materialien

2.1 Puffer

Die Lösungen wurden mit über Säulen gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Die hierfür verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p. A. und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, Roth und Sigma. Die einzelnen Bestandteile der Puffer sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tab. 2-1 Puffer für die Isolierung genomischer DNA

	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	EDTA (mM)
Lysepuffer	10	7,6	5	10	
SE-Puffer				75	25
TE-Puffer	10	8,0			1

Tab. 2-2 Puffer für die PCR-Optimierung, Master-Mix

10 x Puffer				
Puffer-Nr.	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)
1	100 (500 µl)	8,3	15 (75 µl)	250 (1,25 ml)
2	100 (500 µl)	8,3	15 (75 µl)	750 (3,75 ml)
3	100 (500 µl)	8,3	35 (175 µl)	250 (1,25 ml)
4	100 (500 µl)	8,3	35 (175 µl)	750 (3,75 ml)
5	100 (500 µl)	8,8	15 (75 µl)	250 (1,25 ml)
6	100 (500 µl)	8,8	15 (75 µl)	750 (3,75 ml)
7	100 (500 µl)	8,8	35 (175 µl)	250 (1,25 ml)
8	100 (500 µl)	8,8	35 (175 µl)	750 (3,75 ml)
9	100 (500 µl)	9,2	15 (75 µl)	250 (1,25 ml)
10	100 (500 µl)	9,2	15 (75 µl)	750 (3,75 ml)
11	100 (500 µl)	9,2	35 (175 µl)	250 (1,25 ml)
12	100 (500 µl)	9,2	35 (175 µl)	750 (3,75 ml)

Tab. 2-3 Mastermix

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

Tab. 2-4 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE	Tris-Base (g)	Essigsäure 100 % (ml)	0,5 M EDTA (ml), pH 8,0
	242,0	57	100

zu 1 l Bidest H₂O**Tab. 2-5 Auftragspuffer**

Auftragspuffer	Ficoll (Type 400)	Bromphenolblau	Xylencyanol
% (w/v)	15	0,25	0,25

Tab. 2-6 Puffer für die SSCP-Analyse

10x TBE	Tris-Base (g)	Borat (g)	EDTA (g)
	108	55	8,3

Tab. 2-7 Probenpuffer

Probenpuffer		Proben	
EDTA (0,5 M)	8 ml	verdautes PCR-Prod.	6 µl
Formamid, deionisiert	190 µl	H ₂ O	1 µl
Glycerin	2 ml	Probenpuffer	8 µl
Bromphenolblau	100 mg	total	15 µl
Xylen Zyanol	100 mg	davon in Geltasche	7,5 µl
Aqua bidest	zu 20 ml auffüllen		

Tab. 2-8 Puffer für die Silberfärbung

Fixierer	Ethanol % (v/v)	Eisessig % (v/v)
	10	0,5
Entwickler	Na ₂ CO ₃ (mM)	Formaldehyd % (v/v)
	280	0,019

2.2 Oligonukleotide (Primer)

Tab. 2-9 zeigt die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide. Diese sind immer in 5'→3'- Richtung angegeben. Mit F bzw. Forward und R bzw. Reverse wurden die in 5'→3' bzw. 3'→5' gerichteten Primer (s. Kap. 3.2) gekennzeichnet. Alle Sequenzen mit Ausnahme der des Intron 1 wurden aus Jacoby *et al.* [1997] entnommen.

Tab. 2-9 Verwendete Oligonukleotide

		Oligonukleotide	Basensequenz	
Exon 2	PCR	<i>GALR1-Ex2-Forward</i>	tgttaccatttcagcatgtca	
		<i>GALR1-Ex2-Reverse</i>	tgaaaagtaacatatatatatatt	
Exon 3	PCR	<i>GALR1-F3</i>	cctcctcctcttcttcttttc	
		<i>GALR1-R3</i>	gtgtctggtccacttatatgg	
		<i>ARMS-E3No</i>	ctcagcccagagatggatggt	
	ARMS-PCR	<i>ARMS-E3Mu</i>	ctcagcccagagatggatgga	
		<i>ARMS-E3CPr</i>	caaaattattatggggagtgaagg	
Intron 1	PCR	<i>GALR1-IntronF</i>	ctcatctgcttctgctatgcca	
		<i>GALR1-Out2</i>	acttctttgacatgttcttcaactt	
	Sequenzierung	<i>GALR1-in1-sequ.For</i>	agtgacgctgaatcctcaata	Modifikation: 5' IRD 700
		<i>GALR1-Nest2</i>	ttttatgcaagtgattaaggacctg	Modifikation: 5' IRD 700

2.3 Gelprotokolle

PCR-Agarosegel (2,5%ig):

- 5 g Agarose in 200 ml 1xTAE aufkochen lassen
- unter dem Abzug kurz abkühlen lassen, dann 20 µl Ethidiumbromid zugeben, vermischen und in die Form gießen. Durch das Einlegen eines Kammes entstehen die Taschen für die DNA-Proben.

Tab. 2-10 SSCP-Gel-Protokoll

SSCP-Gel: 15 %ig, 49:1 (50 ml)	
40 % Acrylamid (Pharmacia)	18,75 ml
2 % Bisacrylamid (Pharmacia)	7,5 ml
10x TBE	2,5 ml
Aqua Bidest	auf 50 ml auffüllen
APS (10 %)	500 µl
Temed	34 µl
Laufpuffer: 0,5 x TBE (s. Kap.2.1.3.2)	
Laufbedingungen: bei Raumtemperatur 19 h mit 160 V, bei 4 °C 24 h mit 200 V; bzw. 1 h mit 600 V	

Tab. 2-11 Sequenziergel-Protokoll

Sequenzier-Gel (6 %): 41 cm	
Long Ranger (50 %) (FMC Bioproducts)	4,5 ml
Urea (8M)	15,75 g
10x TBE	3,75 ml
Aqua Bidest	auf 37,5 ml auffüllen
Temed	37,5 µl
10 % APS	260 µl
Laufpuffer: 1xTBE	

Für das Gießen des Gels wurden 41 cm well-to-read Glasplatten mit 0,3 mm Abstandhaltern und 48zähniem Haifischkamm verwendet.

2.4 Untersuchungsgut

Für die Untersuchungen wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut verwendet.

2.4.1 Rekrutierung der Probanden

Die Probanden wurden aus verschiedenen Orten Deutschlands rekrutiert [Hinney *et al.*, 1997c]:

1. Klinik Hochried, Murnau (Spezialklinik zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas): extrem adipöse Kinder u. Jugendliche.
2. Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA, Berchtesgaden (Langzeittherapie für Jugendliche mit extremer Adipositas): extrem adipöse Kinder u. Jugendliche.
3. Klinische Forschergruppe an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps- Universität, Marburg: Patienten mit Anorexia nervosa und Bulimia nervosa, adipöse Probanden und untergewichtige Studenten der Philipps-Universität Marburg.
4. Arbeitsgemeinschaft „Genetik in der Kinder- und Jugendpsychiatrie“ in den Kliniken für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitäten Köln, Frankfurt am Main und Mannheim: Patientinnen mit Anorexia nervosa und Bulimia nervosa.
5. Abteilung für Innere Medizin der Universität Heidelberg: Patienten mit Anorexia nervosa und Bulimia nervosa.

Mit den Probanden wurden Interviews zur Gewichtsanamnese, Erfassung soziodemografischer Daten und organischer Erkrankungen durchgeführt. Psychiatrische Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung der Essstörung wurden mit dem Munich-Composite International Diagnostic Interview [M-CIDI, Wittchen *et al.*, 1995] 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.

Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie:*Adipositas:*

1. frühmanifeste und extreme Adipositas
2. BMI \geq 90. Altersperzentil
3. keine organischen Erkrankungen
4. Zigarettenkonsum unter 10 Zigaretten täglich

Anorexia nervosa oder Bulimia nervosa:

Erfüllung der entsprechenden *DSM-IV*-Kriterien für Anorexia nervosa oder Bulimia nervosa.

Untergewichtige Kontrollgruppe:

1. BMI \leq 15. Altersperzentil
2. keine organischen Erkrankungen
3. Zigarettenkonsum unter 10 Zigaretten täglich
4. keine Anorexia oder Bulimia nervosa

3 Methoden

3.1 Extrahieren der Desoxyribonucleinsäure (DNA)

3.1.1 Isolierung der genomischen DNA aus dem Blut

Die Extraktion erfolgte mit der Methode nach Miller [1988]. Dabei wird die DNA aus nativem oder tiefgefrorenem EDTA-Blut extrahiert. Es werden 10 - 20 ml Blut mit 30 ml eiskaltem Puffer für die Lysierung der Erythrozyten versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 4 °C und 4000 U/min für 10 min im Ausschwingrotor. Diese dient der Sedimentierung der Leukozyten. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 25 ml Lysepuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min löst man das Pellet in 5,5 ml Aufnahmepuffer und lagert es über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator. Zur Forcierung der Proteolyse werden dann weitere 5 ml Aufnahmepuffer hinzugegeben und anschließend bei 55 °C für 10 min inkubiert. Als nächster Schritt erfolgt für das Fällen der Proteine die Durchmischung mit 2,5 ml 5M NaCl. Die Probe wird danach bei Raumtemperatur und 4000 U/min für 15 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 2.0 R; Kendro Laboratory Products GmbH). Der Überstand mit der DNA wird in ein neues Röhrchen überführt. Zur Fällung der DNA wird das Pellet mit dem 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt. Weiter wird die DNA mit einem Glashaken aufgenommen und in 70 %igem Ethanol geschwenkt. Als vorletzter Schritt wird die DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer pH 8,0 gelöst. Zum Abschluss erfolgt eine Konzentrationsbestimmung per Fotometrie. Die lyophilisierte Pronase wird mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Aqua bidest gelöst und aliquotiert. Die Aliquots können bei -20 °C ca. 6 Monate gelagert werden.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit dem Spektrofotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine Extinktion von $E_{260} = 1,0$ entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Das Verhältnis der Extinktion E_{260}/E_{280} (DNA/Protein) gibt den Reinheitsgrad der Probe an. Die DNA-Konzentration sollte sich zwischen 300 - 1000 µg/ml bewegen, während ein DNA/Protein-Quotient ab 1,5 zufriedenstellend ist.

3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.1 Einleitung

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, *PCR*) wurde 1985 von Kary B. Mullis und Mitarbeitern entwickelt [1990]. Sie beruht auf einem simplen Prinzip und imitiert den Replikationsprozess der Zelle. Mit ihrer Hilfe können geringste Mengen an Desoxyribonukleinsäure (*DNA*), dem sogenannten Träger der Erbinformation *in vitro* fast unbegrenzt vervielfältigt werden. Sie ist gekennzeichnet durch ihre Sensitivität, Schnelligkeit und Automatisierbarkeit [Volkenandt *et al.*, 1990]. Allerdings stellt die Sensitivität auch den größten Nachteil dar. Schon geringste Verschmutzungen der zu untersuchenden Probe mit probenfremder *DNA* können zu falschen Ergebnissen führen. Daher gilt es, einige Grundsätze zu beachten. Um eine Kontamination zu verhindern, sollte zwischen Vor- und Nach-*PCR*-Bereich getrennt werden. Pipetten sollten nur für die *PCR* verwendet werden. Die notwendigen Reagenzien müssen aliquotiert werden [Schimmel, 1990]. Auch die Größe des zu amplifizierenden Segments ist ein entscheidender Faktor. Am zuverlässigsten erfolgt die Reaktion bei Segmenten bis 1000 Basenpaaren = 1 Kilo-Basenpaar (Kb). Für größere Abschnitte sind oft spezielle Bestandteile und Bedingungen nötig.

3.2.2 Grundlagen

Für eine Polymerase-Ketten-Reaktion werden benötigt:

- Die zu untersuchende, aufgereinigte *DNA*.
- Zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (= Primer).
Aufgabe der Primer ist die Anlagerung (Hybridisieren, Annealing) an jeweils einen der beiden Stränge der Ursprungs-*DNA*. Sie hybridisieren am 3'-Ende des jeweiligen Stranges, und ermöglichen damit die Verlängerung des neuen *DNA*-Stranges in Richtung 5'-Ende des alten Stranges.
- Die vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs): Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytosintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) für die Synthese des neuen *DNA*-Stranges.
- Eine hitzestabile Polymerase. Bewährt hat sich dabei vor allem die *Taq*-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) [Schimmel, 1990].
- Eine Pufferlösung, um ein der Zelle möglichst identisches Niveau zu schaffen (s. Kap. 2.1).
- Über Säulen gereinigtes oder zweifach destilliertes Wasser.

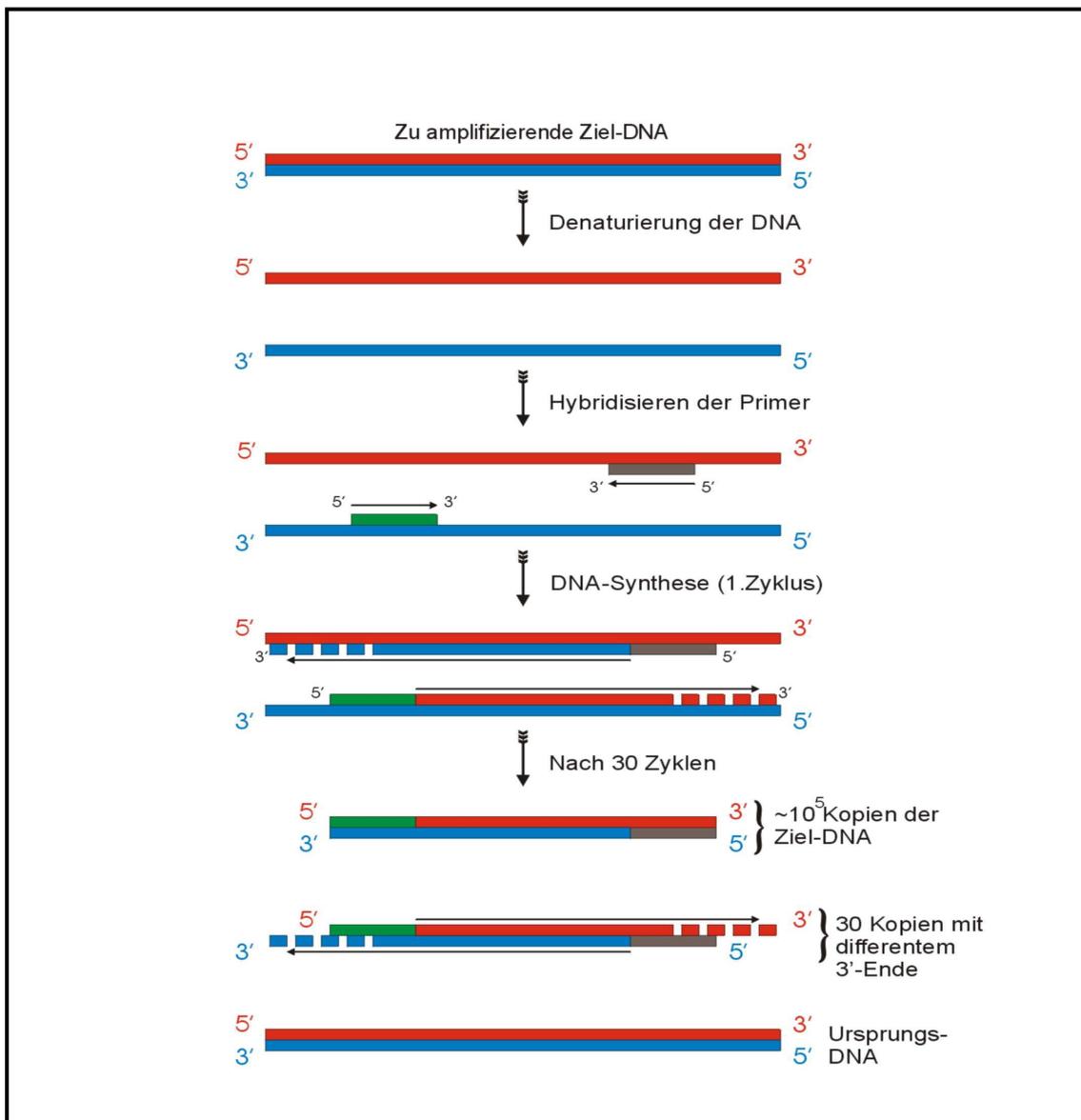


Abb. 3-1 Prinzip der PCR. 1. Denaturierung der DNA. 2. Anlagern der Primer. 3. DNA-Synthese in Richtung der Zielsequenz. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen in den Folgezyklen als Vorlage für die Synthese, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung kommt (modifiziert nach Strachan und Read, 1996).

3.2.2.1 Reaktionsablauf

Die PCR besteht aus ungefähr 30 Zyklen [Strachan und Read, 1996]. Initial erfolgt eine längere Denaturierungsphase und abschließend eine längere Synthesephase [Quiagen, 1997]. Ein Zyklus gliedert sich in 3 Phasen:

1. Denaturierung:

Typischerweise erfolgt diese bei 93 - 95 °C und dauert 30 s - 1 min. In dieser Phase wird der DNA-Doppelstrang aufgetrennt. Die Denaturierungstemperatur ist umso höher, je höher der GC-Gehalt der Zielsequenz ist.

2. *Primer-Annealing*: Die Temperatur sollte, abhängig von der Länge der Oligonukleotide zwischen 50 - 70°C betragen, der Zeitraum ca. 30 s - 1 min. Bei diesen Temperaturen wird ein Anlagern der Oligonukleotide ermöglicht (s. Kap. 3.2.2.2).

3. *DNA-Synthese*: Die *Taq*-Polymerase arbeitet am effektivsten bei etwa 72 °C [Volkenandt *et al.*, 1990], die Dauer richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Segments. Als Faustregel kann gelten, 1 Kb pro Minute [Schimmel, 1990]. Wird die Zeit zu kurz gewählt, kann der Strang nicht vollständig synthetisiert werden. Ist die Zeit wesentlich zu lang, kann es zur Bildung unspezifischer Amplifikate kommen. Sinnvoll ist es, die Synthesezeit mit zunehmender Zykluszahl zu verlängern. Durch die abnehmende Konzentration der Primer und die, durch die vielen Temperaturveränderungen zunehmend ineffektiver arbeitende Polymerase, läuft die Reaktion nicht mehr so schnell ab wie zu Beginn [Schimmel, 1990].

Nach erfolgter Reaktion, lässt sich das entstandene Produkt auf einem 1 - 2,5 %igen Agarose-Gel (je größer das Amplifikat, um so niedrigerprozentig das Gel) über Gelelektrophorese mittels Ethidiumbromid sichtbar machen. Dieses ist unter UV-Licht (ultraviolett) als scharf begrenzte Bande zu erkennen. Um die Größe und Konzentration einschätzen zu können, werden Standard-Längenmarker (z. B. 123 Basenpaar-Marker) und Standard-Konzentrationsmarker (z. B. Low DNA Mass Ladder) hinzugefügt.

3.2.2.2 Primer-Design

Diese synthetisch hergestellten Oligonukleotide sollten ca. 15 - 30 Nukleotide lang sein. Sie müssen komplementär zur Sequenz des Template-Stranges sein. Dies führt zu einem weiteren Nachteil der *PCR*: Es werden Informationen über die Sequenz der Zielsequenz benötigt, um die Oligonukleotide herstellen zu können [Strachan and Read, 1996]. Beim Design ist weiterhin zu beachten, dass die beiden Oligonukleotide keine komplementären Sequenzen zueinander enthalten, da es sonst zur Bildung sogenannter Primer-Dimere (Aneinanderlagerung der Primer) kommen kann, wodurch eine effektive Amplifikationsreaktion nicht mehr möglich ist [Schimmel, 1990]. Am 3'-Ende sind drei oder mehr aufeinanderfolgende G's oder C's möglichst zu vermeiden, ebenso wie ein T am 3'-Ende, da dies sonst die unspezifische Anlagerung (Annealing) der Primer begünstigen kann. [Löffert *et al.*, 1997]. Durch Fehlpaarungen (mismatches) am 3'-Ende der Oligonukleotid- zu der Originalsequenz wird die Synthese eines neuen Stranges unmöglich [Löffert *et al.*, 1997]. Eine Möglichkeit, die man sich bei der sogenannten *ARMS-PCR* (Amplification Refractory Mutation System) zunutze macht,

auf die an späterer Stelle eingegangen werden soll. Der GC-Gehalt der Primer sollte zwischen 40 - 60 % liegen. Als Faustregel zum Berechnen der Schmelztemperatur T_m kann folgende Formel zum Einsatz kommen:

$$T_m = 2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \text{ °C} \times (C+G)$$

Die Primer werden in der Reaktion mit einer Konzentration von 0,1 - 0,5 μM (0,2 μM) eingesetzt [Löffert *et al.*, 1997]. Das manuelle Designen der Oligonukleotide wurde durch eigens dafür entwickelte PC-Programme inzwischen erheblich vereinfacht. Die Bestellung erfolgt am einfachsten über das Internet.

3.2.2.3 Optimierungsphase

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen ist ein wichtiger Bestandteil für die erfolgreiche Durchführung der *PCR*. Das Ziel ist es, eine möglichst große Menge spezifisches Amplifikat ohne Nebenprodukte zu erhalten. Dieses kann durch eine Reihe Faktoren entscheidend beeinflusst werden.

Magnesium, Kalium, pH-Wert

Die Konzentration der Magnesium- und Kalium-Ionen beeinflusst die Denaturierung des *DNA*-Doppelstranges, die Annealingtemperatur der Oligonukleotide sowie die enzymatische Aktivität der *Taq*-Polymerase. Die Kationen lagern sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyriboserückgrats an. Dies hat geringere elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen den *DNA*-Strängen zur Folge, was das Annealing der Oligonukleotide erleichtert. Da die erforderlichen Ionenkonzentrationen für die einzelnen *DNA*-Sequenzen verschieden sind, wurden anfangs 12 Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (8,3; 8,8; 9,2), Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen (1,5 und 3,5 mM) und K^+ -Ionenkonzentrationen (35 und 75 mM) eingesetzt. Verwendet wurde letztlich der Puffer, der zur größten Menge an Amplifikat und der geringsten Menge an Nebenprodukten führte.

Annealingtemperatur

Die Berechnung der Annealingtemperatur ist in Kap. 3.2.2.2 dargestellt. Bei zu geringer Amplifikatmenge oder unspezifischen Amplifikaten wurden die Temperatur schrittweise um 1 °C und die Anlagerungszeit in Abständen von 10 s erhöht oder erniedrigt.

Primerkonzentration

Zu hohe Konzentrationen können zu unspezifischer Anlagerung führen. Bei zu geringen Mengen kann die Menge des Amplifikats negativ beeinflusst werden. Zu Beginn wurden die Primer mit einer Konzentration von 0,1 - 0,25 μM eingesetzt. Im Falle von unspezifischen Amplifikaten wurde die Konzentration erniedrigt, bei zu geringer Amplifikatmenge erhöht.

3.3 Allelspezifische Amplifikation (ARMS-PCR)

Eine modifizierte Form der *PCR* ist die Allelspezifische Amplifikation (*ARMS-PCR*). Sie dient dem schnellen und zuverlässigen Nachweis von verschiedenen Allelen in der Zielsequenz [Strachan und Read, 1996]. Dabei wird mit allelspezifischen Primern gearbeitet, die nur bei Vorliegen des Zielallels zu einer Reaktion führen. Es zeigte sich, dass Oligonukleotide, die zwar komplementär zur Allelsequenz sind, aber eine Fehlpaarung am 3'-Ende aufweisen, keine Amplifikation ermöglichen [Little, 1995]. Diese Beobachtung wird bei der *ARMS-PCR* genutzt. Dazu werden zwei Primer verwendet. Ein sogenannter Mutationsprimer, der mit der letzten Base am 3'-Ende komplementär zur Mutation ist, und ein Primer, der mit seinem 3'-Ende komplementär zur wildtypischen Allelsequenz ist. Als Gegenprimer, der in beiden Ansätzen zur Anwendung kommt, wird ein Primer (Common-Primer) ca. 150 - 250 Basen entfernt eingesetzt. Die allelspezifischen Oligonukleotide sind entweder als Forward-, oder als Reverse-Primer einsetzbar. Um die Spezifität zu erhöhen, kann an der vorletzten Stelle am 3'-Ende eine zusätzliche Fehlpaarung eingebaut werden. Die Auswahl des Mismatches richtet sich dabei nach der Fehlpaarung an der letzten Stelle. Es stellte sich heraus, dass verschiedene Fehlpaarungen auch unterschiedlich starke destabilisierende Effekte aufweisen. Ist die terminale Fehlpaarung schwach, wird eine stärkere an der vorletzten Stelle gewählt und umgekehrt [Little, 1995]. Das weitere Primerdesign entspricht dem der Standard-*PCR* (s. Kap. 3.2.2.2).

Die *ARMS-PCR* besteht aus zwei komplementären Reaktionen. Eine mit dem mutationsspezifischen Primer und eine mit dem zur wildtypischen Sequenz komplementären Primer. Der Erfolg der Reaktion lässt sich mittels Gelelektrophorese auf einem Agarosegel kontrollieren. Ist in der *DNA*-Probe mit dem mutationsspezifischen Primer eine Bande sichtbar, liegt die Mutation in der Sequenz vor. Ist bei der gleichen *DNA*-Probe in beiden Reaktionen eine Bande sichtbar, ist die Person heterozygot für die Mutation. Falls nicht, ist der Proband homozygot für die Mutation. Entsprechendes gilt für erfolgreiche Amplifikation mit dem Wildtyp-Primer.

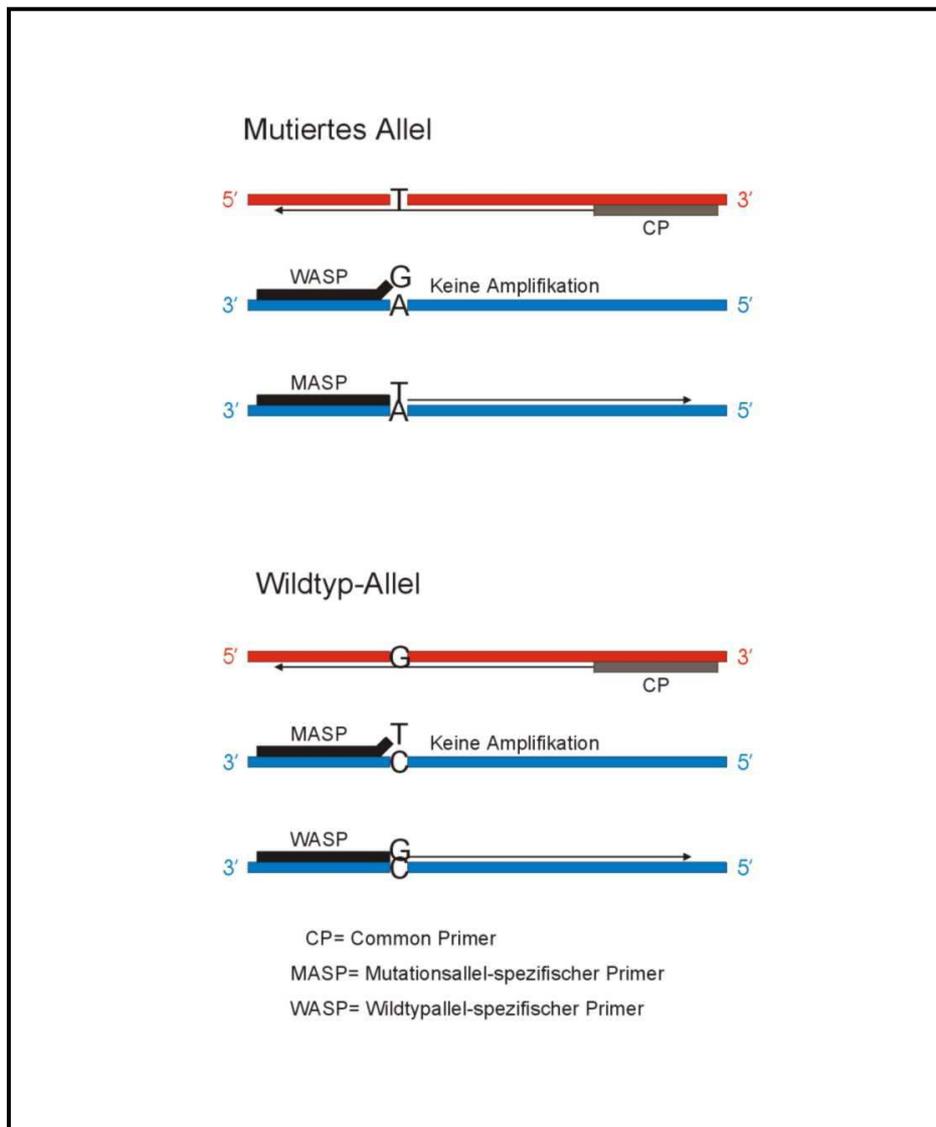


Abb. 3-2 Prinzip der ARMS-PCR. Es werden zwei komplementäre Reaktionsansätze verwendet, einer mit dem mutationsspezifischen und einer mit dem wildtypspezifischen Primer. Es kommt nur zur Amplifikation, wenn das jeweils passende Allel vorliegt (modifiziert nach Strachan und Read, 1996).

3.4 Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)

Die Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)-Analyse ist eine einfach durchzuführende Methode für das Screening einer großen Anzahl von DNA-Proben auf Mutationen [Strachan und Read, 1996]. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Faltung von DNA-Einzelsträngen, wie in Abb. 3-3 dargestellt. Schon eine einzige veränderte Base kann eine Veränderung der dreidimensionalen Faltung des Stranges bewirken. Dies kommt zustande durch veränderte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren. Durch die Veränderung zeigt die Probe ein verändertes Laufverhalten. Der Nachteil der SSCP-Analyse ist, dass sie weder Position noch Art der Mutation

aufzeigt, und die Fragmente nicht viel größer als 200 bp sein sollten. Bis zu dieser Größe liegt die Sensitivität bei 70 - 95 %. Bei Amplifikaten von mehr als 400 bp beträgt sie weniger als 50 % [Grompe, 1993].

Nach erfolgter *PCR* werden die Amplifikate denaturiert. Sind die Produkte größer als 200 bp, werden sie vorher mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen geschnitten. Für die Denaturierung werden Denaturierungspuffer mit Formamid, Bromophenol-Blau, Xylen-Zyanol und evtl. Glycerol verwendet. Zusätzlich wird der *DNA*-Doppelstrang bei 94 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Danach werden die Proben für die Elektrophorese sofort auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (s. Kap. 2.3) aufgetragen. Das Gel wird in eine Kammer gegeben, die einen Laufpuffer (s. Kap. 2.1) enthält. Für eine Mutationssuche sollte die Elektrophorese bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden, da auch die Temperatur einen Einfluss auf die Laufeigenschaften des Einzelstranges hat [Sheffield *et al.*, 1993]. In der vorliegenden Arbeit wurde die *SSCP*-Analyse bei Raumtemperatur und bei 4 °C durchgeführt. Die Dauer des Laufes richtet sich nach der angelegten Spannung, z. B. 600 V für 1 Stunde oder 160 V für 19 Stunden. Nach dem Trocknen sollten die Gele unabhängig von zwei Personen ausgewertet werden.

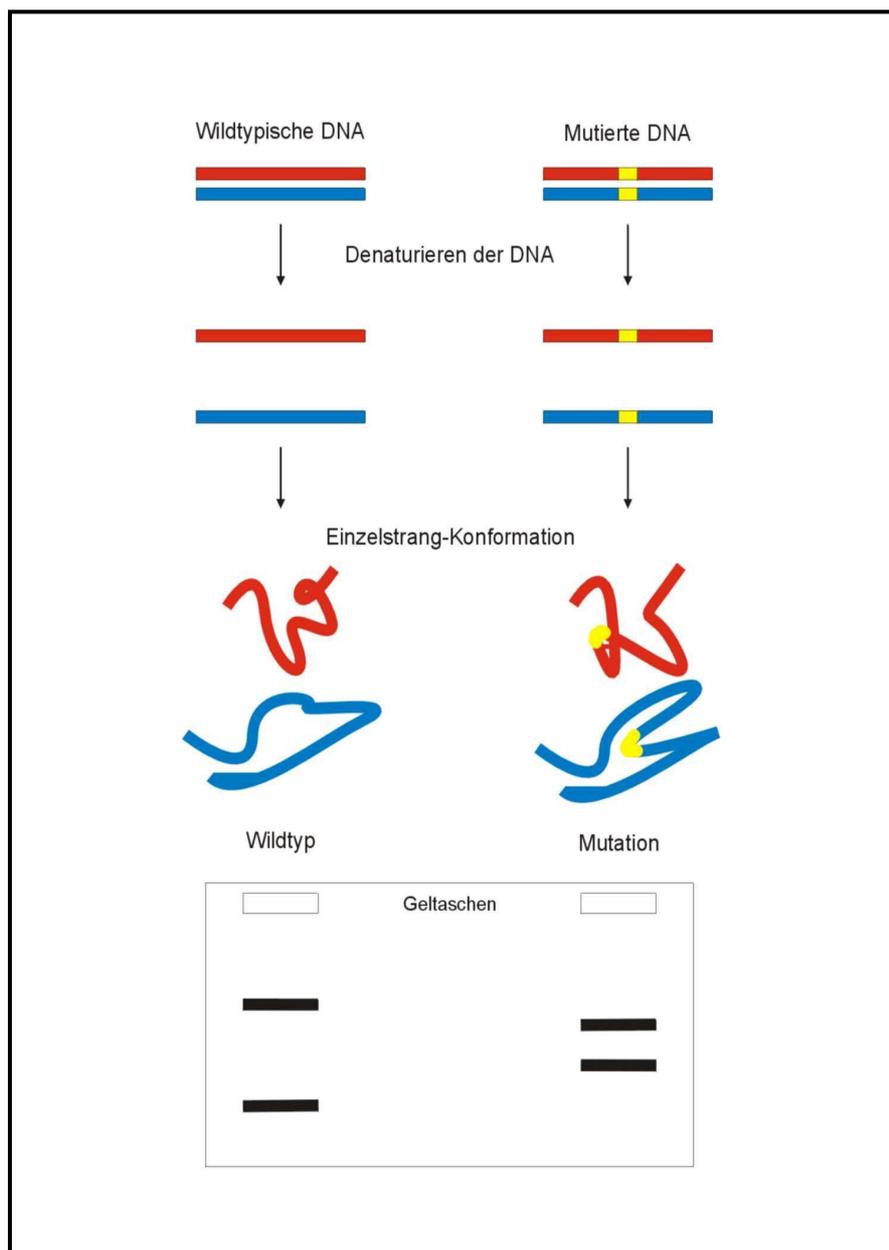


Abb. 3-3 Prinzip der SSCP-Analyse. Die DNA-Einzelstränge sind unterschiedlich räumlich gefaltet. Bereits eine einzige veränderte Base kann zu einem veränderten Laufverhalten führen. Die Laufeigenschaften im Gel werden bei unterschiedlichen Temperaturen überprüft (modifiziert nach Strachan und Read, 1996).

3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung bietet eine Möglichkeit, die exakte Basenreihenfolge eines *DNA*-Abschnittes zu ermitteln. Dadurch ist sie auch geeignet, die genaue Art und Position einer Mutation zu bestimmen [Grompe, 1993]. Voraussetzung dafür ist, dass die *DNA* einzelsträngig vorliegt. Für die Synthese des neuen Stranges werden für gewöhnlich basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs) verwendet. Im Gegensatz zu den dNTPs fehlen diesen Nukleotiden je eine Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoff-Atom und am 2'-Kohlenstoff-Atom. Ein Didesoxynukleotid kann so zwar über eine Phosphodiesterbrücke seines 5'-Kohlenstoff-Atoms mit dem 3'-Kohlenstoff-Atom des vorherigen Nukleotids in die wachsende Kette eingebaut werden, ist jedoch durch die fehlende Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom nicht in der Lage, eine Phosphodiesterbrücke mit dem 5'-Kohlenstoffatom des nachfolgenden Nukleotids einzugehen, was zum Kettenabbruch im neu synthetisierten *DNA*-Strang führt. Für die Bildung des neuen *DNA*-Stranges wird ein Sequenzierprimer benötigt, der flankierend der zu sequenzierenden Region liegt [Strachan and Read, 1996]. Das Prinzip ist in Abb.3-4 dargestellt.

Es werden parallel vier basen-spezifische Reaktionen durchgeführt, in denen jeweils ein ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) zusätzlich zu den vier dNTPs eingesetzt wird. Die spezifischen ddNTPs (z. B. ddGTP) konkurrieren mit den normalen dNTPs (z. B. dGTP) um die jeweiligen Stellen in der wachsenden *DNA*-Kette. Die Konzentration der ddNTPs ist dabei sehr viel geringer, als die der dNTPs. So kommt es im wachsenden *DNA*-Strang nur rein zufällig und sehr selten zur Anlagerung eines ddNTPs und damit zum Kettenabbruch. So erhält man am Ende jeder basenspezifischen Reaktion eine Ansammlung von *DNA*-Strängen verschiedener Größe und mit verschiedenen 3'-Enden, definiert durch das jeweilige ddNTP [Strachan and Read, 1996]. Solche Fragmente können mit Hilfe eines Polyacrylamidgels sichtbar gemacht werden, selbst bei Größenunterschieden von nur einer Base. Das Sichtbarmachen wird möglich durch den Einbau von markierten Bestandteilen in die neu synthetisierten Ketten. Dabei handelt es sich entweder um radioaktiv markierte Nukleotide oder um einen markierten Sequenzierprimer. Die Sequenz kann dann mit Hilfe eines *DNA*-Analysegerätes gelesen werden.

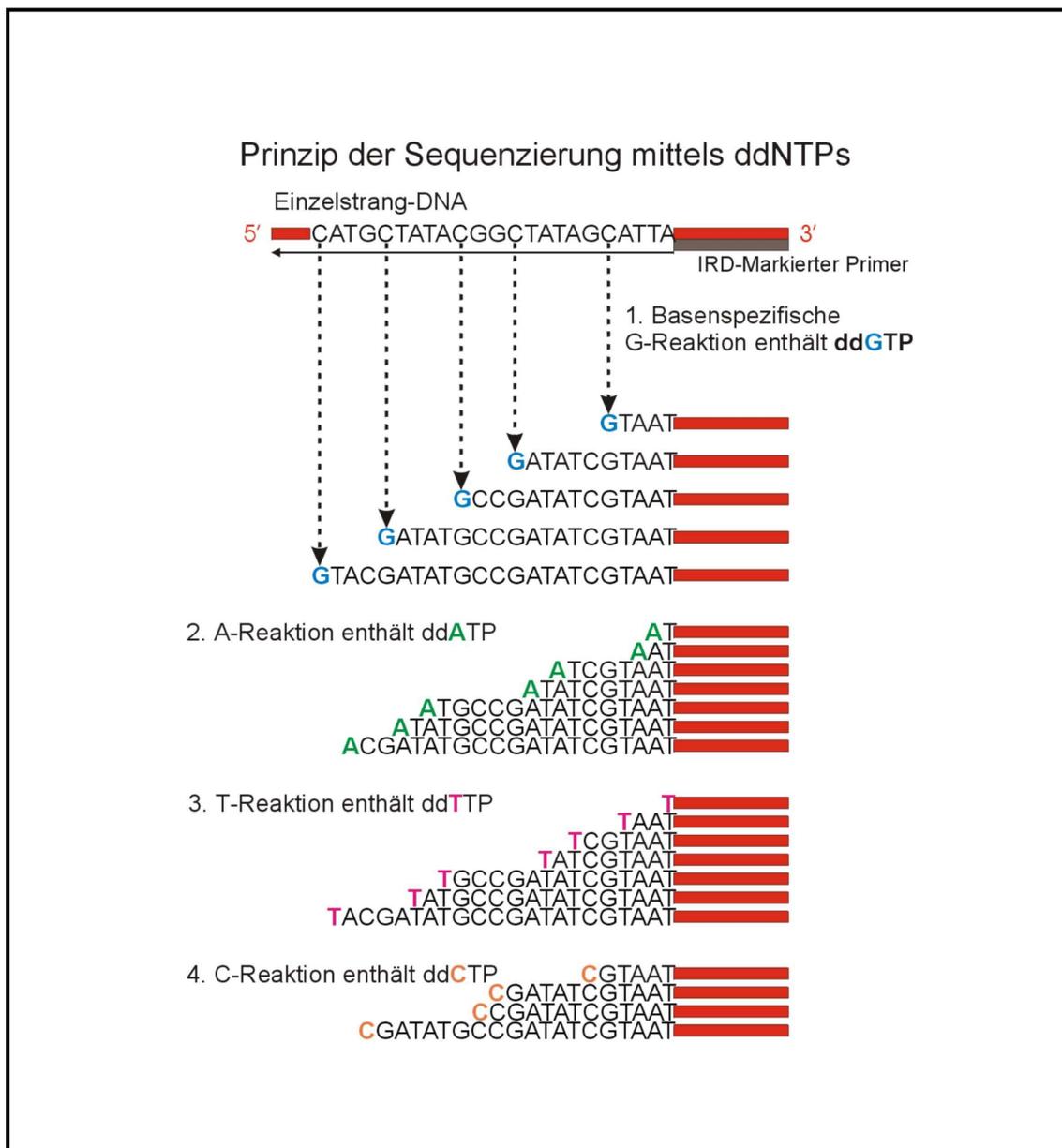


Abb. 3-4 Prinzip der Sequenzierung. Für die Synthese des *DNA*-Stranges werden basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs) verwendet, die wegen einer fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoff-Atom keine Phosphodiesterbrücke mit dem 5'-Kohlenstoffatom des nachfolgenden Nukleotids eingehen können. In jeder basenspezifischen Reaktion entstehen so durch Kettenabbruch Fragmente unterschiedlicher Länge, die dann z. B. durch IRD-markierte Primer im *DNA*-Analyser sichtbar gemacht werden können (modifiziert nach Strachan und Read, 1996).

3.5.1 Datenerhebung mit dem *DNA Analysis System 4200-2*

Das *DNA*-Analysesystem 4200-2 (Firma LI-COR) ist ein autonomes System für die Analyse von *DNA*-Sequenzen. Mit Hilfe von zwei Infrarotlasern (680 nm und 780 nm) werden IRD (Infrared Dye)-markierte *DNA*-Sequenzen mit 700 nm oder 800 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Dieses Gerät ist derart sensitiv, dass damit Banden detektiert werden können, die weniger als 10 Attomol der IRD-Markierung enthalten. Dabei wird ein Mikroskop von einem Motor (Scan-Motor) immer wieder horizontal über das Gel gefahren. Weitere Motoren sorgen dafür, dass das Mikroskop den richtigen Abstand zum Gel hat und beim Abtasten immer parallel verläuft. Die auf diese Weise gesammelten Daten werden dann in digitale Signale umgewandelt und können als Grafikdatei gespeichert werden [LI-COR, 1997, 1998]. Vor dem Beginn einer Sequenzanalyse mit dem *DNA Analysis System 4200-2* werden:

- die Empfindlichkeit der Kamera an die Eigenfluoreszenz des Gels angepasst (= Autogain),
- das Mikroskop auf die Mitte des Gels fokussiert (= Auto Focus),
- erneut ein Autogain durchgeführt,
- schließlich das Gel mit einem Vorlauf von mindestens 45 min auf ca. 50 °C erwärmt.

Des Weiteren müssen die Anzahl der Frames für die Dauer der Analyse, sowie die Spannung über dem Gel und die elektrische Leistung des LI-CORs festgelegt werden [LI-COR, 1997]. Für die Sequenzierungen wurden folgende Einstellungen verwendet:

- Frames: 25 (aktiver Kanal)
- Spannung (V): 1500
- Stromstärke (mA): 37
- Watt (W): 40
- Temperatur (°C): 50
- Scan Geschwindigkeit: 3

Vor dem Auftragen auf das Gel werden 2 µl der *DNA*-Proben mit 2 µl loading dye (Formamid/50 mM EDTA) gelöst und durch Erhitzen auf 94 °C für 3 - 5 Minuten denaturiert. Die vier Reaktionsmixe werden mit 1 µl in vorher festgelegter Reihenfolge nebeneinander in je eine Tasche am oberen Rand des Gels aufgetragen. Danach wird Spannung angelegt. Die Fragmente wandern entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durch das Gel. An einem bestimmten Punkt im Gel werden sie detektiert und

können über einen Monitor ausgewertet werden. Eine beispielhafte Darstellung findet sich in Abb. 3-5.

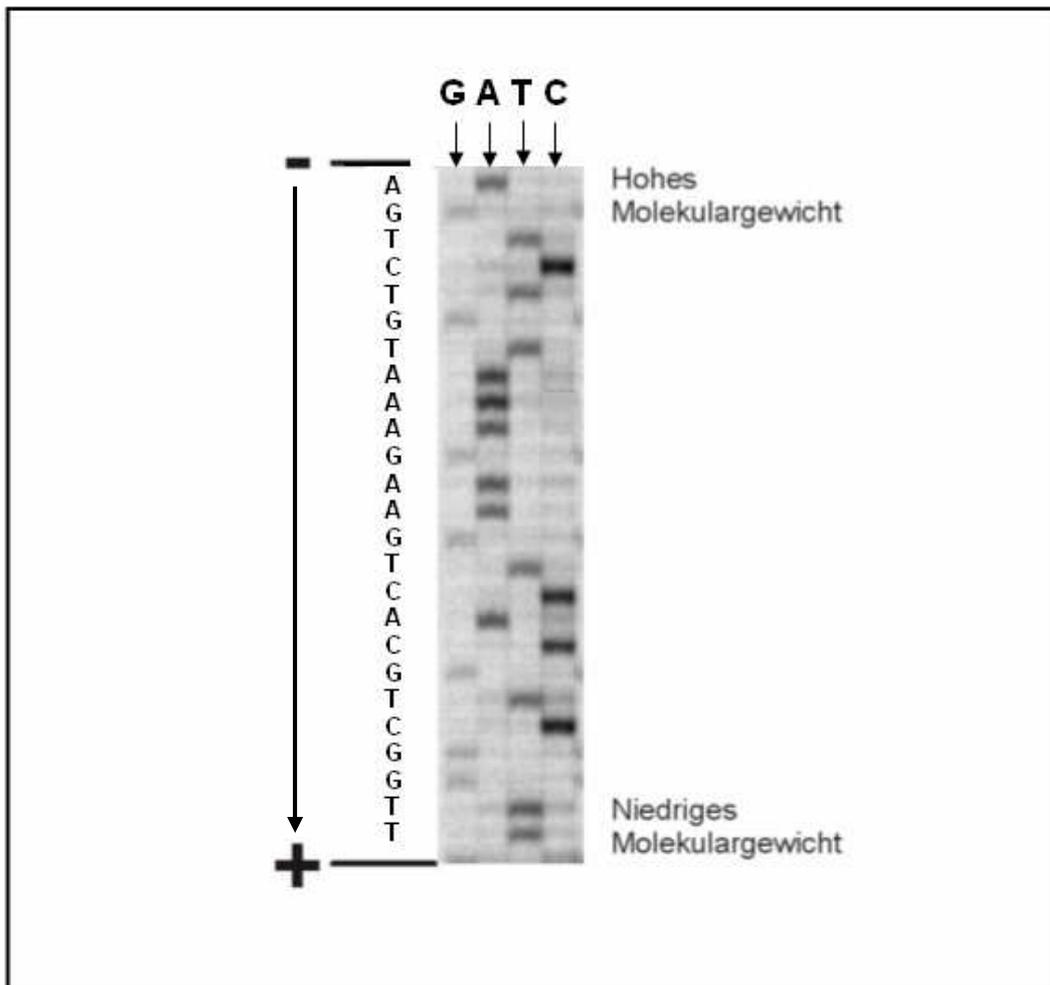


Abb. 3-5 Prinzip der Sequenzierung mit dem DNA Analysis System 4200-2. Ausschnitt aus der Sequenzierung des Intron 1 des *GALR1*. Die Fragmente wandern entsprechend ihres Molekulargewichts unterschiedlich schnell durch das Gel (s. Kap. 3.5)

3.5.2 Auswertung mittels der Software ONE-Dscan

Die Auswertung der erhaltenen TIF-Dateien erfolgte mit dem Programm ONE-Dscan 1.3 [Scanalytics, 1999]. Damit können die vier Spuren (G, A, T, C) beschriftet und einzeln automatisch gelesen werden. Diese automatische Sequenzanalyse wurde immer manuell von zwei Personen unabhängig nachkontrolliert und ggf. korrigiert.

3.6 Nomenklatur zu den Varianten (Mutationen)

Für das Verständnis der hier genannten Begriffe Missense-Mutation und Polymorphismus soll kurz erläutert werden, welche Klassen von Mutationen es gibt und was sie im Einzelnen bedeuten [Übersicht in Strachan und Read, 1996]. Mutationen sind Veränderungen im Erbgut und entstehen bei einzelnen Individuen in somatischen Zellen oder in der Keimbahn. Beeinflusst die Mutation die Möglichkeit der Fortpflanzung nicht negativ, kann sie über die Nachkommen verbreitet werden. Eine Allelvariante wird dann als *Polymorphismus* bezeichnet, wenn sie mit einer Frequenz $> 0,01$ in der Population auftritt [Strachan and Read, 1996]. Mutationen können durch Umwelteinflüsse (z. B. Radioaktivität), mutagene Stoffe (z. B. verschiedene Chemikalien) oder aber spontan entstehen. Der überwiegende Teil entsteht jedoch durch Fehler in der *DNA*-Replikation oder fehlerhafte Korrekturvorgänge. Die meisten Mutationen sind sogenannte stille Mutationen, d. h. sie führen nicht zu einer Veränderung der Erbinformation.

- Wegen der Bedeutung für die vorliegende Arbeit soll zuerst auf die Basensubstitutionen eingegangen werden. Diese können in *Transitionen* (Substitution eines Pyrimidins durch ein Pyrimidin \rightarrow C oder T oder eines Purins durch ein Purin \rightarrow A oder G) und *Transversionen* (Substitution eines Pyrimidins durch ein Purin oder umgekehrt) vorkommen. Die Basensubstitutionen treten als *stille* Mutation (keine Veränderung der Aminosäuresequenz des Genprodukts) oder als *nonsynonyme* Mutation mit Veränderung der Aminosäuresequenz im Genprodukt auf. Die nonsynonymen Mutationen gibt es in Form der *Nonsense*-Mutationen (Austausch eines Aminosäure-Codons durch ein Stop-Codon, wodurch ein verkürztes Genprodukt entstehen kann), der *Missense*-Mutation (Austausch einer Aminosäure) oder *Spleißstellen*-Mutationen, durch die die Signale für Exon/Intron-Splicing verändert werden. Bei der *Missense*-Mutation wird zwischen konservativer Substitution (Austausch durch eine Aminosäure mit chemisch ähnlichen Eigenschaften und dadurch häufig nur geringem Effekt auf die Funktion des Proteins) und *nonkonservativer* Substitution (Austausch durch eine Aminosäure mit anderer Seitenkette und dadurch möglicher ausgeprägter Veränderung der Proteinfunktion) unterschieden.
- Bei *Insertionen* kommt es zum Einbau einer oder mehrerer Nukleotide in eine Sequenz. Dabei kann es sich um den Einbau eines in der Replikation entstandenen Duplikats eines anderen Lokus handeln oder um Transposition von einem Lokus zu einem anderen.

- Wenn ein oder mehrere Nukleotide (bis zu einer Megabase) aus einer Sequenz entfernt werden, spricht man von einer *Deletion*.
- *Frameshift* (Leseraster)-Mutationen entstehen durch Deletionen im codierenden Bereich, Insertionen oder Spleißfehler. Dabei kann sich durch Einbau eines vorzeitigen Start- oder Stopcodons die Translationssequenz entscheidend verändern.

3.7 Statistische Verfahren

3.7.1 Assoziationsstudien

Assoziationsstudien vergleichen nicht-verwandte Merkmalsträger mit nicht-verwandten Kontrollen innerhalb einer Population. Eine positive Assoziation liegt vor, wenn ein Allel signifikant häufiger in der Gruppe der Merkmalsträger als in der Kontrollgruppe auftritt. Assoziation kann sehr aussagekräftig für Merkmale einer genetisch isolierten Population sein. Die ideale Population für Assoziationsstudien ist genetisch homogen und divergent zu seinen Nachbarn und stammt von einer nur kleinen Anzahl ursprünglicher Gründer ab. Passende Kontrollen auszuwählen ist entscheidend. Richtig gematchte Kontrollen sollten bis auf das zu untersuchende Merkmal in allen Eigenschaften mit der Fallgruppe gleich sein (Alter, Geschlecht, soziale Schicht usw.) [Lander *et al.*, 1994; Strachan und Read, 1996; Hebebrand *et al.*, 1998].

Eine positive Assoziation zwischen Merkmal und Marker kann verschiedene Ursachen haben:

1. Allel A ist direkt die Ursache für das Merkmal. Generell ist der Besitz von Allel A weder notwendig noch ausreichend, um das Merkmal zu entwickeln, aber es erhöht die Wahrscheinlichkeit dafür. In diesem Fall würde man erwarten, die gleiche Assoziation von Allel A und dem Merkmal in jeder untersuchten Population zu sehen (außer die Ursachen für das Merkmal variieren in den Populationen).
2. Eine sehr enge Kopplung auf der Populationsebene kann Assoziation hervorrufen [Strachan und Read, 1996]. Voraussetzung ist, dass die merkmalsrelevanten Chromosomen in der Bevölkerung von einem oder wenigen Chromosomen der Vorfahren abstammen. Das untersuchte Gen ist dann zwar nicht merkmalsverursachend, wird aber mit dem mutationstragenden Gen zusammen vererbt (*linkage disequilibrium*) [Strachan und Read, 1996]. Das Allel auf dem Locus A, welches mit dem Merkmal assoziiert ist, kann von Population

zu Population verschieden sein. Dieser Effekt macht sich besonders bei geschichtlich jungen, isolierten Populationen bemerkbar (d. h. es gab kaum Rekombinationen aufgrund weniger Meiosen und einer nur geringen Anzahl von Fremdallelen).

3. Personen mit dem Merkmal und Personen ohne das Merkmal in einer Studie können genetisch verschiedenen Subgruppen einer Population angehören, die sich auch in der Frequenz von merkmalsstragenden Allelen unterscheiden (*population stratification, admixture*). Dies führt zu einer scheinbaren Assoziation und verdeutlicht die Wichtigkeit des richtigen Matchens von Kontroll- und Fallgruppe.
4. Natürliche Selektion: Personen mit dem Merkmal haben höhere Überlebenschancen und können sich fortpflanzen, wenn sie Träger des Allels A sind.
5. Statistische Artefakte: Assoziationsstudien werden häufig an einer großen Anzahl von Loci durchgeführt, jeweils mit verschiedenen Allelen, um eine Assoziation mit einer Krankheit finden zu können. Die p-Werte müssen demnach für die Anzahl der Tests korrigiert werden. Wird dies vernachlässigt, können positive Assoziationen in nachfolgenden Studien oft nicht repliziert werden.

Bei einer Assoziationsstudie wird eine sogenannte Null-Hypothese ($H_0: p_1 = p_2$) sowie eine zweiseitige Alternativ-Hypothese ($H_1: p_1 \neq p_2$) formuliert. Dabei stehen p_1 und p_2 für die jeweiligen Anteile der Grundgesamtheiten mit einer bestimmten Ausprägung des Phänotyps (z. B. p_1 für die gesunden Probanden und p_2 für die Erkrankten). Bei der Null-Hypothese geht man davon aus, dass die Verteilung der Allele unabhängig vom Phänotyp ist. Bei der Alternativ-Hypothese hingegen nimmt man an, dass die Verteilung vom Phänotyp abhängig ist. In diesem Falle spricht man von Assoziation. Bereits eine geringe Anzahl falsch bestimmter Genotypen kann schon zu einer fälschlichen Annahme oder Ablehnung der Null-Hypothese führen. Dies ist bei Assoziationsstudien für Allele mit einer geringen Frequenz besonders wichtig, um eine falsch positive Assoziation bzw. das „Übersehen“ einer Assoziation zu vermeiden. Da bezüglich der vorliegenden Untersuchung keine Informationen über die Allelverteilung vorlagen, wurde die Alternativ-Hypothese zweiseitig formuliert ($p_1 > p_2$ oder $p_1 < p_2$), da keine Angaben über die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer vorlagen.

3.8 Teststatistik

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

Mittels des zweiseitigen asymptotischen χ^2 -Test nach Pearson wurden die Unterschiede in den Allelhäufigkeiten zwischen den Gruppen untersucht, mittels des Cochran-Armitage Trend Test die Unterschiede der Genotyphäufigkeiten.

3.8.1 Pearson χ^2 -Test

Der Chi-Quadrat-Test (χ^2) wird zur Analyse von Häufigkeiten verwendet, genauer von Kontingenztafeln (Vierfeldertafeln) wie in Tab. 3-1 dargestellt. Man kann damit in einer Zahl ausdrücken, wie sich die beobachteten Häufigkeiten von den erwarteten Häufigkeiten unterscheiden. Dabei werden folgende Hypothesen überprüft:

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

H_1 = Die Verteilung der Allele ist abhängig von dem Phänotyp. Es liegt Assoziation vor.

Tab. 3-1 Modell einer Kontingenztafel. Die festgestellten Häufigkeiten der Allele in den einzelnen Stichproben werden in eine Kontingenztafel eingetragen.

		Merkmal 1 (Allel)	
		Allel A	Allel a
Merkmal 2 (Gewicht)	Fälle	a	b
	Kontrollen	c	d

Die Teststatistik χ^2 wird definiert als:

$$\chi^2 = \text{Summe über alle Zellen der } \frac{(\text{beobachteten} - \text{erwarteten Probandenanzahl})^2}{\text{erwartete Probandenanzahl}}$$

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

Nach Glantz [1998] gelten folgende Regeln für den Einsatz:

- Für die Daten stellt man eine Kontingenztafel auf.
- Man berechnet Zeilen- und Spaltensummen, absolut und prozentual.
- Man benutzt diese Häufigkeiten, um die Zahl der Individuen zu berechnen, die man erwarten würde, wenn das Allel keinen Einfluss hätte.
- Man fasst die Differenzen aus den erwarteten und den beobachteten Werten zu χ^2 zusammen.
- Die Zahl der Freiheitsgrade berechnet sich aus der Kontingenztafel. Dann vergleicht man den errechneten Wert für χ^2 mit dem kritischen Wert, um zu sehen, ob er noch durch Zufall erklärt werden kann.

3.8.2 Exakter Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher kommt dann zur Anwendung, wenn es sich um kleine Studien mit erwarteten Häufigkeiten unter 5 handelt. Hierbei werden alle möglichen Varianten beobachteter Werte aufgelistet und für jede Anordnung eine exakte Wahrscheinlichkeit berechnet. Der exakte Test nach Fisher besitzt eine einseitige und eine zweiseitige Variante. Man kann also die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der beobachtete Werte auftreten, die in eine oder in beide Richtungen so extrem oder noch extremer als die tatsächlichen Werte sind [Glantz, 1998].

3.8.3 Cochran-Armitage Trend Test

Der Cochran-Armitage Trend Test prüft einen Trend für eine binomial verteilte Variable (ja-/nein-Variable) über die Level einer zweiten kategorialen Variable. Der Test darf für beliebige (2×k)- oder (k×2)-Kontingenztafeln verwendet werden. Bei festgestellter Signifikanz des asymptotischen χ^2 -Test nach Pearson wurden nachfolgend die Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Cochran-Armitage Trend Test untersucht.

3.8.4 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*HWG*) beschreibt die Genotyphäufigkeiten aus den Anteilen der verschiedenen Allele eines Gens in einer Population. Auf diese Weise lassen sich die Häufigkeiten der drei möglichen Genotypen (aa, Aa und AA) in einer Population mit Hilfe der experimentell bestimmten Allelfrequenz berechnen. Die berechneten Genotypfrequenzen sollten mit den experimentell gefundenen Häufigkeiten übereinstimmen [Strachan und Read, 1996].

Die Häufigkeit der drei Genotypen (aa, Aa und AA) ergibt sich aus der Binomialbeziehung:

$$\text{Hardy-Weinberg-Gleichgewicht: } (p+q)^2=1$$

Dabei entspricht p der Häufigkeit des Allels A und q der Häufigkeit des Allels a.

Als Voraussetzung für das *HWG* müssen die untersuchten Populationen ausreichend groß sein, die Paarungstypen entsprechend der Häufigkeit der Allele vorkommen und Panmixie⁶ vorliegen. Verschiebungen des *HWG* können durch assortative (nicht zufällige) Paarung, fortgesetzte Änderung der Mutationshäufigkeit, Selektion, genetischen Drift bei kleinen Populationen, Migration eines Allels und Gründereffekt hervorgerufen werden [Strachan und Read, 1996].

3.9 Protokolle

3.9.1 Intron 1

3.9.1.1 PCR

Damit die gesamte Zielsequenz nach der Amplifikation auf Varianten untersucht werden kann, sollte man die Oligonukleotide (Primer) außerhalb dieser Sequenz positionieren. Um das 5'-Ende des Exon 2 vollständig sequenzieren zu können, war es deshalb notwendig, zuvor etwa 30 - 40 Basen am 3'-Ende des davor liegenden Introns zu bestimmen. Denn zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit waren nur die letzten vier Basen am 3'-Ende des Intron 1 bekannt [Jacoby *et al.*, 1997]. Für die PCR des Introns wurde der Primer (*GALR1-IntronF*) für die 5'→3'-Amplifikation auf die Basenpositionen 643 - 665 des Exon 1 [Jacoby *et al.*, 1997] gelegt. Für die 3'→5'-Amplifikation wurden die Basenpositionen 22 - 46 des Exon 2 [Jacoby *et al.*, 1997] gewählt. Eine ausreichende Menge Amplifikat ließ sich mit dem Advantage®-GC Genomic PCR Kit von Clontech erzielen. Wichtig für den Erfolg war eine hohe Konzentration der eingesetzten DNA (0,1 µg/µl vom Hersteller empfohlen).

⁶ zufällige Paarung

Reaktionsansatz:

22,8 µl	H ₂ O
10 µl	5 x GC Genomic PCR Reaction Buffer
2,2 µl	25 mM Mg(OAc) ₂
10 µl	GC-Melt (5 M)
1 µl	DNA-Template (100 ng/µl)
1 µl	<i>GALR1-IntronF</i> (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
1 µl	<i>GALR1-Out2</i> (ARK Scientific; (25 pmol/µl))
1 µl	50x dNTP Mix (10 µM je dNTP)
1 µl	<u>Advantage-GC Genom. Pol. Mix</u>
50 µl	total

Thermocyclerbedingungen:

- I. 94 °C 4 min
- II. 94 °C⇒30 sek, 62 °C⇒40 sek, 68 °C⇒5 min } 10 Zyklen
- III. 94 °C⇒30 s, 62 °C⇒40 s, 68 °C⇒5 min + 10 sek jeder Zyklus } 25 Zyklen
- IV. 68 °C⇒7 min, 4 °C⇒∞

Größen- und Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte auf einem 1,2 %igen Agarosegel mit Hilfe eines Längenstandards (Low DNA mass ladder, GIBCO BRL). Die Fragmentgröße wurde mit dem 123 bp-Marker (GIBCO BRL) bestimmt. Nach Auftrag von 4 µl PCR-Produkt und 2 µl des Low DNA mass ladder, bzw. 4 µl des 123 bp-Markers wurde für 45 min eine Spannung von 200 V angelegt (Gelelektrophorese). Auf dem UV-Schirm wurden Größe und Konzentration abgelesen. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem digitalen Videosystem (Polaroid Digitales Video System; Polaroid).

3.9.1.2 Sequenzierung

Für die Sequenzierung in 5'-Richtung wurde ein markiertes Oligonukleotid benutzt (*GALR1-Nest2*, IRD 700, MWG-Biotech AG). Seine Sequenz entspricht den letzten 3 Basen des Intron 1 bis zur Position 22 der Basensequenz des Exon 2. Dieses Oligonukleotid wurde auf eine Konzentration von 1 pmol/µl verdünnt. Die dNTPs lieferte das „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ von Amersham/Pharmacia Biotech.

Reaktionsansatz:

12 µl H₂O
6 µl PCR-Produkt
1,5 µl GALR1-Nest2 (MWG Biotech); (1 pmol/µl)
1,5 µl DMSO
21 µl total

Von den dNTPs wurden je 2 µl in ein Cup (also 4x pro Amplifikat) vorgelegt. Von dem Mix wurden je 4,5 µl hinzupipettiert.

Dieser 6,5 µl-Ansatz wurde unter folgenden Thermocycler-Bedingungen amplifiziert:

Thermocyclerbedingungen:

- I. 94 °C⇒5 min
- II. 94 °C⇒30 s, 62 °C⇒30 s, 72 °C⇒5 min } 30 Zyklen
- III. 72 °C⇒5 min, 4 °C⇒∞

Das Sequenzier-Gel wurde nach dem Standardprotokoll angefertigt (s. Kap. 2.3) und für mindestens 2 h getrocknet.

Sequenzierung zur Erfolgskontrolle

Um die Korrektheit der gelesenen Sequenz zu überprüfen, wurde ein Sequenzierprimer soweit wie möglich an das 5'-Ende gelegt, ca. 700 Basen vor dem Exon2.

Der Primer *GALR1-In1-Sequ.-For.* war markiert durch 5' IRD 700 (MWG-Biotech AG). Die Vorgehensweise entsprach derjenigen bei der Sequenzierung mit dem Primer *GALR1-Nest2*.

Reaktionsansatz:

11 µl H₂O
6 µl PCR-Produkt
2,5 µl *GALR1-In1-Sequ.-For.* (MWG Biotech); (1 pmol/µl)
1,5 µl DMSO
21 µl total

Thermocyclerbedingungen:

- I. 94 °C⇒5 min
- II. 94 °C⇒30 s, 56 °C⇒30 s, 72 °C⇒5 min } 30 Zyklen
- III. 72 °C⇒5 min, 4 °C⇒∞

3.9.2 Exon 2

3.9.2.1 PCR

Mit der nun vorhandenen Sequenzinformation wurde ein Primer (*GALR1-Ex2-Forward*) etwa 70 Basen vor das 3'-Ende des Intron 1 gelegt. Der Primer für die Amplifikation in die entgegengesetzte Richtung wurde in den Bereich am 5'-Ende des Intron 2 gelegt (Basenposition 74 - 108 nach Jacoby *et al.*, 1997). Das fertige Amplifikat hatte eine Größe von ca. 180 bp. Bei der Optimierung brachte die schrittweise Erniedrigung der Annealingtemperatur von anfangs 60 °C auf 48 °C eine deutliche Steigerung der Spezifität und Quantität des Amplifikats. Zur weiteren Erhöhung der Quantität wurde die Zyklenzahl von 30 auf 35 erhöht. Bei der Pufferoptimierung führte Puffer 7 zu den Produkten mit der höchsten Spezifität. Daneben gelang eine positive Amplifikation in geringerer Menge mit Puffer 3 und Puffer 11. Als letzter Optimierungsschritt wurde die Syntheszeit von 30 s auf 40 s erhöht.

Reaktionsansatz:

18,65 µl	H ₂ O
2,5 µl	DNA (20 ng/µl)
2,5 µl	10x Puffer7
0,5 µl	Master-Mix
0,25 µl	<i>GALR1-Ex2-Forward</i> (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
0,25 µl	<i>GALR1-Ex2-Reverse</i> (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
0,25 µl	dNTP-Mix (Pharmacia/Amersham); enthält je 20 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
0,1 µl	<u><i>Taq</i>-Polymerase (MWG/Biotech); entspricht 0,5 Units (5 U/µl)</u>
25 µl	total

Thermocyclerbedingungen:

- I. 94 °C ⇒ 5 min
- II. 94 °C ⇒ 40 s, 48 °C ⇒ 30 s, 72 °C ⇒ 40 s } 35 Zyklen
- III. 72 °C ⇒ 5 min, 4 °C ⇒ ∞

Die Erfolgskontrolle erfolgte unter UV-Licht nach Elektrophorese von 5 µl Amplifikat und 4 µl 123 bp-Marker auf einem 2,5 %igem Agarose-Gel bei 200 V für 20 min.

3.9.2.2 SSCP

Die Vorgehensweise für die SSCP-Analyse erfolgte nach dem gleichen Schema wie für das Exon 3 und ist im Kap. 3.9.3.3 nachzulesen.

3.9.3 Exon 3

3.9.3.1 PCR

Für die Herstellung der beiden Primer wurden die Sequenzinformationen von Jacoby *et al.* [1997] verwandt. Bei der Optimierung der Annealingtemperatur wurden zunächst 55 °C, 60 °C und 65 °C verwandt. Eine Amplifikation (394 bp) konnte bei allen drei Temperaturen bei den Ansätzen erzielt werden, die einen der drei Puffer 3, 7 oder 11 enthielten. Das Produkt mit der höchsten Spezifität wurde mit Puffer 11 bei 60 °C erzielt.

Reaktionsansatz:

18,8 µl	H ₂ O
2,5 µl	DNA (20 ng/µl)
2,5 µl	10x Puffer11
0,5 µl	Master-Mix
0,25 µl	GAL1-F3 (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
0,125 µl	GAL2-R3 (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
0,25 µl	dNTP Mix (Pharmacia/Amersham); enthält je 20 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<u>0,1 µl</u>	<u>Taq-Polymerase (MWG/Biotech); entspricht 0,5 Units (5 U/µl)</u>
25 µl	total

Thermocyclerbedingungen:

- I. 94 °C ⇒ 5 min
- II. 94 °C ⇒ 30 s, 60 °C ⇒ 30 s, 72 °C ⇒ 30 s } 30 Zyklen
- III. 72 °C ⇒ 5 min, 4 °C ⇒ ∞

Die Erfolgskontrolle erfolgte durch Auftrag auf 2,5 %iges Agarose-Gel mit 5 µl Amplifikat und 4 µl des 123 bp-Markers mit einem ca. 20 minütigem Lauf in der Elektrophoresekammer (200 V) und anschließender Mengen- und Größenabschätzung auf dem UV-Schirm.

3.9.3.2 Restriktion

Nach erfolgreicher PCR wurden die Proben geschnitten. Hierfür wurde das Restriktionsenzym ACS I von Eurogentec mit dem dazugehörigen Puffer Violett verwendet.

Reaktionsmix:

- 0,2 µl Enzym ACS I
- 3 µl Puffer
- 11,8 µl H₂O
- 15 µl PCR-Produkt
- 30 µl total

Die Proben wurden für mindestens drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad (GFL 1083) inkubiert. Bei positiver Restriktion waren nach Auftrag auf Agarose-Gel Doppelbanden unter dem UV-Schirm sichtbar.

3.9.3.3 SSCP

Von dem geschnittenen Produkt wurden dann 6 µl für die SSCP weiterverarbeitet.

Reaktionsansatz:

- 6 µl Restriktions-Produkt
- 8 µl Probenpuffer
- 1 µl H₂O
- 15 µl total

Nach dem Pipettieren erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für 5 min. Den Mix sofort auf Eis gelegt, wurden von jeder Probe 7,5 µl in die Taschen des SSCP-Gels gefüllt. Der Lauf fand bei Raumtemperatur für 19 Stunden mit 160 V sowie bei 4 °C für 24 Stunden bei einer Spannung von 200 V statt.

3.9.3.4 Silberfärbung

(modifiziert nach Budowle, 1991)

Ansatz mit 250 ml pro Gel.

1. 25 ml 10 % Ethanol und 1,25 ml 0,5 % Eisessig für mindestens 5 min
2. 4 ml 1 % Salpetersäure (65 %) für 10 min
3. Spülen mit Aqua Bidest
4. 25 ml 12 mM AgNO₃ für 20 bis 30 min
5. Spülen mit Aqua Bidest
6. 100 ml (5x) NaCO₃ (280 mM) und 255 µl 0,019 Formamid (37 %) auf 500 ml auffüllen⇒ 20 min wirken lassen
7. 25 ml 10 % Eisessig für 5 min
8. Aqua Bidest mit Glycerol für 5 min

Das Trocknen der Gele erfolgte mit einer Vakuumpumpe (Rothhaar & Schroeder).

3.9.3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde in den Sequence Laboratories Göttingen GmbH vorgenommen.

3.9.3.6 ARMS-PCR

Reaktionsansatz:

- 19,65 µl H₂O
- 1,5 µl DNA (20 ng/µl)
- 2,5 µl 10x Puffer3
- 0,5 µl Master-Mix
- 0,25 µl ARMS-E3-CPr (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
- 0,25 µl ARMS-E3-No/Mu (ARK Scientific); (25 pmol/µl)
- 0,25 µl dNTP Mix (Pharmacia/Amersham); enthält je 20 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 0,1 µl Taq-Polymerase (MWG/Biotech); entspricht 0,5 Units (5 U/µl)
- 25 µl total

Thermocyclerbedingungen:

- I. 94 °C⇒5 min
- II. 94 °C⇒30 s, 58 °C⇒30 s, 72 °C⇒30 s} 30 Zyklen
- III. 72 °C⇒5 min, 4 °C⇒∞

4 Ergebnisse

4.1 Exon 2

4.1.1 PCR des Intron 1

Ein Hindernis bei der Suche nach Sequenzvarianten im Exon 2 des *GALR1* war die Tatsache, dass zum Zeitpunkt der praktischen Durchführung der vorliegenden Arbeit nur die letzten vier Basen der Sequenz des davor liegenden Intron 1 bekannt waren. Um die Sequenz des Exons in seiner gesamten Länge vervielfältigen und damit auf Varianten screenen zu können, war es jedoch notwendig, die Primer außerhalb dieser Sequenz binden zu lassen. Da bei der automatischen Sequenzierung die dafür verwendeten basenspezifischen Dideoxynukleotide nach den Primern eingebaut werden, erscheint daher auf dem Bildschirm in diesem Bereich nur die Primerbande. Ziel war es deshalb, die genaue Sequenz der ca. letzten 100 Basen des Intron 1 vor dem Exon 2 zu identifizieren, um den Primer für die PCR in diesem Bereich binden lassen zu können. Voraussetzung dafür war eine Amplifikation des Intron 1. Auf Grund der enormen Größe von ca. 5 Kb konnten die Protokolle der Standard-PCR (zuverlässig bei Segmenten bis zu 1 Kb) nicht angewandt werden (s. auch Kap. 3.2). Daher wurden speziell für diese Größenordnung entwickelte PCR-Kits eingesetzt. Das Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech) ergab nach Optimierung der Thermocyclerbedingungen ein spezifisches Amplifikat in ausreichender Quantität. Zu diesen Optimierungsschritten gehörten eine Verlängerung der Synthesezeit nach dem 10. Zyklus um jeweils 10 s in den folgenden 25 Zyklen. Dadurch konnte eine höhere Quantität erzielt werden. Weiterhin wurde die Annealingzeit auf 40 s erhöht, was die Amplifikatmenge ebenfalls erhöhte. Die Erhöhung der Ausgangskonzentration der eingesetzten DNA-Proben brachte eine deutliche Steigerung der Amplifikationen und eine wesentlich höhere Quantität des Amplifikats.

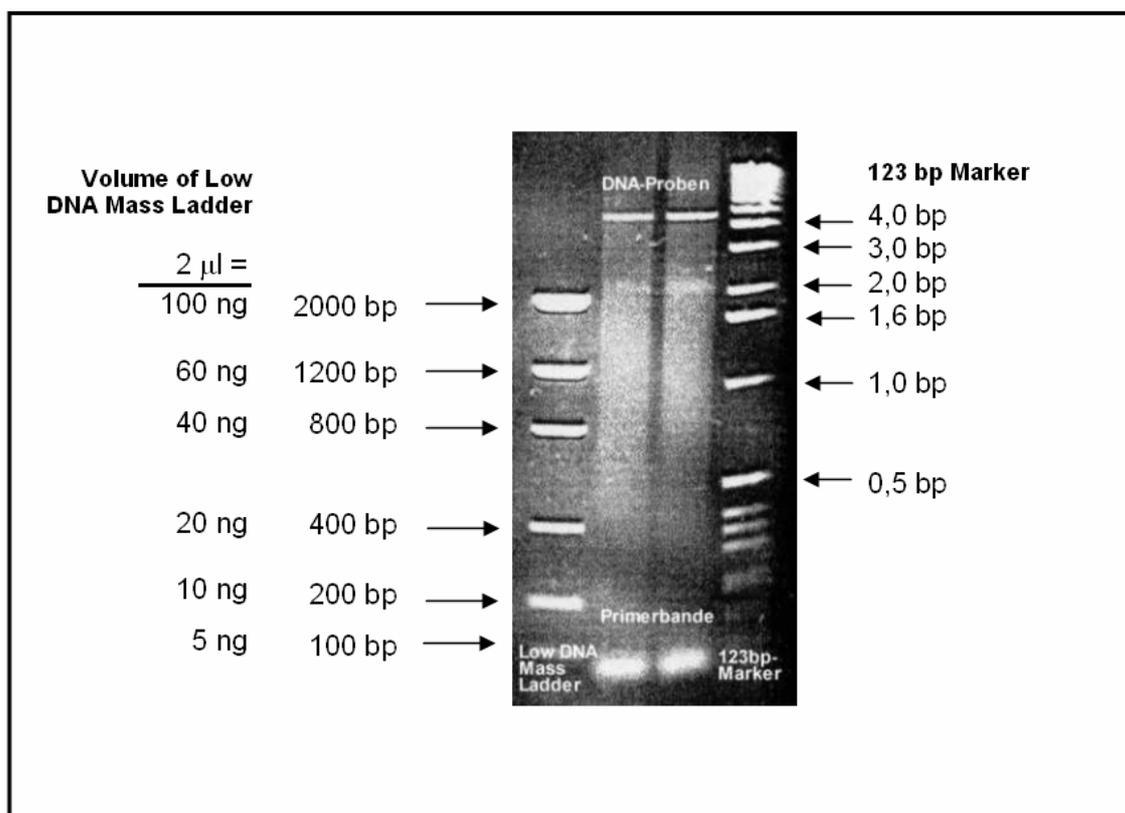


Abb. 4-1 Darstellung der PCR-Amplifikate des Intron 1 nach Gel-Lauf und Sichtbarmachen unter dem UV-Schirm. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte mit dem 123bp-Marker, die Konzentrationsbestimmung mit dem Low DNA Mass Ladder

4.1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (Pharmazia/Amersham). Die Sequenzierungsreaktion wurde wesentlich beeinflusst von der eingesetzten Menge des Amplifikats. Die Stärke der Banden auf dem Schirm nahm mit der Erhöhung der Amplifikatmenge von anfangs 2 μ l auf 6 μ l deutlich zu. Eine Veränderung der Konzentration des Sequenzierprimers im Ansatz wirkte sich nicht erkennbar auf das Ergebnis aus. Nach erfolgter Optimierung konnten ca. 700 Basen in 3'-5'-Richtung detektiert werden. Bei zwei untersuchten, unterschiedlichen DNA-Proben stimmte die Sequenz dabei vollständig überein. Die Sequenzierung wurde zur Kontrolle zweimal wiederholt. Die Auswertung wurde von mindestens zwei erfahrenen Personen unabhängig voneinander vorgenommen.

4.1.3 PCR des Exon 2

Mit der nun vorhandenen Sequenzinformation wurde ein Primer (*GALR1-Ex2-Forward*) ungefähr 70 Basen vor das 3'-Ende des Intron 1 gelegt. Das Oligonukleotid für die Amplifikation in die entgegengesetzte Richtung wurde in den bekannten Bereich am 5'-Ende des Intron 2 gelegt⁷. Das fertige Amplifikat hatte eine Größe von ca. 180 bp. In der Optimierungsphase wurde die Temperatur schrittweise auf 48 °C erniedrigt, die Zyklenzahl auf 35 erhöht und die Synthesezeit auf 40 s erhöht (s. Tab. 4-1).

Tab. 4-1 Verlauf der Optimierungsphase der PCR des Exon 2 (vor und ⇒ nach Optimierung)

Temperatur	60 °C ⇒ 48 °C
Zyklenzahl	30 ⇒ 35
Puffer	3, 7, 11 ⇒ 7
Synthesezeit	30 s ⇒ 40 s

4.1.4 SSCP

Die weitere Suche nach Sequenzvarianten im Exon 2 wurde mittels *SSCP*-Analyse vorgenommen. Die *SSCP* wurde bei Raumtemperatur mit 600 V für 1 Stunde auf einem 12 %igen Gel und bei 4 °C mit 600 V für 1 Stunde auf einem 10 %igen Gel durchgeführt. Hierbei fanden sich keine abweichenden Bandenmuster in den untersuchten Gruppen. Da die Sensitivität der *SSCP*-Analyse bei den oben genannten Bedingungen bis zu 95 % beträgt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation übersehen wurde, als sehr niedrig einzuschätzen. Auch die Sequenzierung von zwei Proben der Wildtypsequenz zeigte keine Abweichungen von der bekannten Sequenz. Die Suche nach Sequenzvarianten im Exon 2 wurde damit abgeschlossen.

4.2 Exon 3

4.2.1 PCR

Die Optimierung der Annealingtemperatur begann mit 55 °C, 60 °C und 65 °C. Eine erfolgreiche Amplifikation konnte bei den Ansätzen erzielt werden, die einen der Puffer 3, 7 oder 11 enthielten. Das Produkt mit der höchsten Spezifität wurde letztlich mit Puffer 11 bei 60 °C erzielt.

⁷ Basenposition 74-108 nach Jacoby *et al.*, 1997

Tab. 4-2 Verlauf der Optimierungsphase der PCR des Exon 3 (vor und \Rightarrow nach Optimierung)

Temperatur	55 °C, 60 °C, 65 °C \Rightarrow 60 °C
Zyklenzahl	30 \Rightarrow 30
Puffer	3, 7, 11 \Rightarrow 11
Synthesezeit	30 s \Rightarrow 30 s

4.2.2 SSCP

Auf Grund der Größe des Amplifikats von 394 bp war vor der SSCP-Analyse eine Restriktion notwendig, da die Sensitivität der SSCP bei dieser Amplifikatgröße nur noch ca. 50 % beträgt (s. Kap. 3.4). Durch Restriktion mit dem Enzym ACS I entstanden zwei Fragmente von 216 bp und 178 bp Größe. Die Erfolgskontrolle auf Agarosegel mit 123 bp-Marker zeigte zwei Banden von dieser Größenordnung. Die deutlichsten Bandenmuster konnten mit einem 15 %igen SSCP-Gel (s. Kap. 2.3) bei folgenden Laufbedingungen erzielt werden: Raumtemperatur bei 160 V für 19 h und, 4 °C bei 200 V für 24 h. Bei der anschließenden Silberfärbung konnten insgesamt drei verschiedene Bandenmuster detektiert werden (s. Abb. 4-2).

4.2.3 Sequenzierung

Um die Position der Sequenzvariante im Exon 3 zu bestimmen, wurden zwei Proben mit abweichenden Bandenmustern und eine Wildtypvariante sequenziert. Dafür wurden die entsprechenden PCR-Amplifikate mit den Primern in ein Auftragssequenzierlabor nach Göttingen (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) geschickt. Nach erfolgreicher Sequenzierung konnte ein Polymorphismus an Position 793 der codierenden Sequenz (nach Jacoby *et al.*, 1997) in Form eines Basenaustauschs von Alanin zu Thymin (**793A \rightarrow T**) identifiziert werden.

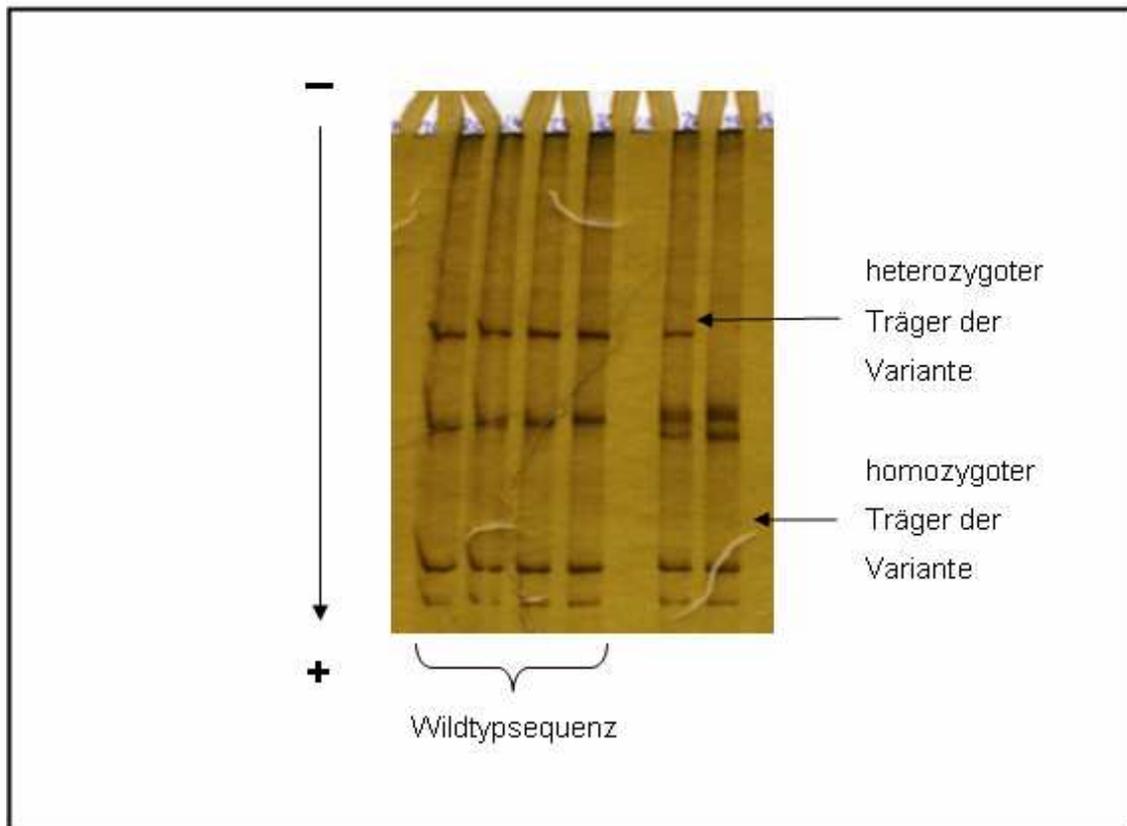


Abb. 4-2 Ausschnitt eines Gels der SSCP-Analyse des Exon 3 nach Silberfärbung. Zu sehen sind von links: vier Träger der Wildtyp-Variante, ein heterozygoter und ein homozygoter Träger des Polymorphismus.

4.2.4 ARMS-PCR

Nachdem die Position der Sequenzvariante durch Sequenzierung identifiziert war, wurden mittels der ARMS-Methode weitere Proben untersucht. Hierfür wurden, wie in Kap. 3.3 beschrieben, sequenzspezifische Primer verwendet, welche nur bei Vorliegen dieser bestimmten Basensequenz binden. Das fertige Produkt hatte eine Größe von 267 Basen. In der Optimierungsphase konnte eine positive Amplifikation mit den Puffern 3, 7 und 11 erzielt werden. Die höchste Quantität wurde mit Puffer 3 erreicht. Eine Verringerung der Annealingtemperatur von 60 °C auf 58 °C führte zu einer weiteren Erhöhung der Amplifikatmenge. Bei der Erfolgskontrolle auf Agarosegel befand sich das Amplifikat in der Größenordnung von ca. 250 Basen, was die Spezifität der Reaktion bestätigt. Beim Screening wurden die zuvor in der SSCP durch abweichende Bandenmuster auffälligen Proben als Kontrollen erneut eingesetzt. Hierbei ergaben sich keine Abweichungen. Während des Screenings fanden sich weitere heterozygote Träger für den Polymorphismus. Es wurde ein homozygoter Träger der Variante in der untergewichtigen Kontrollgruppe gefunden.

4.2.5 Identifizierte Allelvariante (793A→T)

Die identifizierte Basensubstitution an Position 793 der Exonsequenz des *GALR1* von Alanin zu Thymin (**793A→T**) bewirkt eine Änderung der Aminosäuresequenz an dieser Position durch Austausch von Isoleucin (**ATC**) zu Phenylalanin (**TTC**). Es handelt sich hierbei um eine nonkonservative Missense-Mutation⁸ (**Ile265Phe**). Die einzelnen Genotyp- und Allelhäufigkeiten in den untersuchten Studiengruppen sind in Tab. 4-3 dargestellt. Alle gefundenen Genotyphäufigkeiten stimmen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überein.

Tab. 4-3 Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Polymorphismus 793A→T

		Studiengruppen			
		Adipositas	Patienten mit Anorexia nervosa	Patienten mit Bulimia nervosa	Kontroll- gruppe
Genotyp- häufigkeiten	Wildtyp	167	92	25	97
	Heterozygot	20	7	2	8
	Variante	0	0	0	1
	% Wildtyp	89,30	92,93	92,59	91,51
	% heterozygot	10,70	7,07	7,41	7,55
	% Variante	0,00	0,00	0,00	0,94
	Summe	187	99	27	106
Allelhäufig- keiten	Wildtyp	354	191	52	202
	Mutation	20	7	2	10
	Summe	374	198	54	212
	p-Wildtyp	0,9465	0,9646	0,9630	0,09528
	% Wildtyp	94,65	96,46	96,30	95,28
	q-Wildtyp	0,0535	0,0354	0,0370	0,0472
	% Variante	5,35	3,54	3,70	4,72
Hardy- Weinberg- Äquilibrium	HWG T-Wert	0,60	0,13	0,04	2,73
	HWG P-Wert	0,44	0,72	0,84	0,10

⁸ Austausch durch eine Aminosäure mit anderer Seitenkette und dadurch möglicher Veränderung der Proteinfunktion

4.2.6 Durchgeführte Assoziationsuntersuchungen

Mit Hilfe von Assoziationstests sollte der Frage nachgegangen werden, ob die detektierte Variante mit einem der untersuchten Phänotypen assoziiert ist. Es wurden sowohl die Genotypen wie auch die Allele zur Berechnung herangezogen. Da in den Gruppen der Anorexie-, Bulimie und Adipositasprobanden kein homozygoter Träger der Variante **793A→T** vorkam, wurden die Genotypen zur Berechnung herangezogen. Die mittels asymptotischen Pearson Chi²-Test erhaltenen p-Werte waren nicht signifikant. Die Tests ergaben keine signifikanten Unterschiede für den Genotyp und die Allelhäufigkeiten ($p > 0,05$) zwischen den untersuchten Gruppen (s. Tab. 4-4).

Tab. 4-4 p-Werte der durchgeführten Assoziationstests

p-Werte	Adipositas		Bulimia nervosa		untergew. Studenten	
	Genotyp	Allel	Genotyp	Allel	Genotyp	Allel
Anorexia nervosa	0,319	kM	0,733	kM	0,741	0,549
Adipositas	-	-	0,727	kM	0,905	0,739
Bulimia nervosa	-	-	-	-	1,000	0,829

Genotyp: **exakter Test nach Fisher**
 Cochran-Armitage Trend Test
 asymptotischer Pearson Chi² Test

Allel: kM – keine Personen homozygot für den Polymorphismus
exakter Test nach Fisher
 asymptotischer Pearson Chi² Test

4.3 Exon1

Die Ergebnisse zur parallel durchgeführten Arbeit am Exon 1 des *GALR1*-Gens sind in der Arbeit von Schäuble *et al.* [2005] beschrieben.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Sequenzvarianten in den Exons 2 und 3 [Exon 1 in Schäuble *et al.*, 2005] des Galaninrezeptor 1 (*GALR1*)-Gens bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, untergewichtigen gesunden Kontrollen sowie PatientInnen mit Anorexia nervosa oder Bulimia nervosa zu identifizieren und auf Assoziation zu testen. Wir fanden einen nonkonservativen Missense-Single-Nukleotid-Polymorphismus **Ile265Phe (793A→T)** im Exon 3 des *GALR1*-Gens. Die angewandten Assoziationstests ergaben keine signifikanten Werte ($p > 0,05$). Im folgenden Abschnitt sollen zuerst die verwendeten Methoden diskutiert werden. Im Anschluss daran sollen die gefundenen Ergebnisse diskutiert werden.

5.1 Nachteile der Assoziationsuntersuchung

Wie in Kap. 3.7.1 bereits ausführlich beschrieben, vergleichen Assoziationsstudien nicht-verwandte Merkmalsträger mit nicht-verwandten Kontrollen innerhalb einer Population.

Bei einer Assoziationsstudie wird eine sogenannte Null-Hypothese ($H_0: p_1 = p_2$) sowie eine zweiseitige Alternativ-Hypothese ($H_1: p_1 \neq p_2$) formuliert. Bei der Null-Hypothese geht man davon aus, dass die Verteilung der Allele unabhängig vom Phänotyp ist. Bei der Alternativ-Hypothese hingegen nimmt man an, dass die Verteilung vom Phänotyp abhängig ist, also Assoziation vorliegt. Bereits eine geringe Anzahl falsch bestimmter Genotypen kann zu einer fälschlichen Annahme oder Ablehnung der Null-Hypothese führen. Dies ist bei Assoziationsstudien für Allele mit einer geringen Frequenz besonders wichtig, um eine falsch positive Assoziation bzw. das „Übersehen“ einer Assoziation zu vermeiden. Da bezüglich der vorliegenden Untersuchung keine Informationen über die Allelverteilung und keine Angaben über die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer vorlagen, wurde die Alternativ-Hypothese zweiseitig formuliert ($p_1 > p_2$ oder $p_1 < p_2$).

Die Fallzahl bei den untersuchten Kollektiven mit Adipositas, Anorexia nervosa und den untergewichtigen Kontrollen kann für Assoziationsuntersuchungen als ausreichend groß betrachtet werden. Bei den Probanden mit Bulimia nervosa war sie mit 27 Probanden vergleichsweise niedrig. Eine höhere Fallzahl würde hier die Trennschärfe der Ergebnisse und damit auch deren Aussagekraft erhöhen. Will man Signifikanz bei

Allelen mit vergleichsweise niedriger Frequenz nachweisen, werden deutlich höhere Fallzahlen benötigt als bei Gleichverteilung der Allele.

5.2 Auswahl der Studienkollektive

Wie in Kap. 3.7.1 verdeutlicht, sind Fall-Kontroll-Studien abhängig von der Qualität der Auswahl der untersuchten Gruppen (Matching). Zusätzliche phänotypische Unterschiede, die nicht kontrolliert wurden oder Unterschiede in der ethnischen Herkunft können zu falsch positiven Ergebnissen führen (Hebebrand *et al.*, 1998b). Eine genaue Festlegung der Bedingungen zur Aufnahme in die Studie ist daher zwingend notwendig. Werden zu viele Parameter für die Kategorisierung eines Phänotyps verwendet, sinkt auch die Zahl der in Frage kommenden Individuen der Fallgruppe drastisch. Das führt wiederum zu einem erheblichen Abfall der Power eines Assoziationstests [Hinney *et al.*, 2000a].

Bei der Rekrutierung der Probanden für die Gruppe der adipösen Kinder und Jugendlichen wurde der M-CIDI-Interviewbogen verwendet. Es durften keine schweren, das Gewicht beeinflussenden Erkrankungen vorliegen (z. B. Diabetes mellitus). Weiterhin wurde darauf geachtet, dass keine den Phänotyp beeinflussenden Verhaltensweisen vorlagen (z. B. starker Nikotinkonsum). Der Rekrutierung von extrem adipösen Kindern und Jugendlichen liegt unter anderem die Überlegung zugrunde, dass der Einfluss der Gene auf den BMI in der späten Kindheit bzw. in der Jugend am stärksten ausgeprägt ist, bzw. der Phänotyp noch nicht so stark von den Umwelteinflüssen abhängig ist [Pietilainen *et al.*, 1999]. In dem Studienkollektiv der Klinischen Forschergruppe Marburg unter der Leitung von Prof. J. Hebebrand lagen ca. 50 % der adipösen Kinder und Jugendlichen über dem 99. Perzentil. Zudem waren etwa 50 % der Mütter bzw. Väter adipös, weshalb der prädiktive Wert für das Gewicht im Erwachsenenalter als hoch einzuschätzen ist. Das wiederum macht deutlich, warum sich dieses Kollektiv in hervorragendem Maße dazu eignet, nach Mutationen im Genom zu suchen, die an der Ausprägung dieses Phänotyps beteiligt sind.

Für das Kontrollkollektiv gilt, dass es sich optimalerweise nur in einem Merkmal von dem zu untersuchenden Phänotyp unterscheiden soll. Daher wurden gesunde untergewichtige Kontrollen, die aus Studenten rekrutiert wurden, für die Untersuchungen verwendet. Wie auch bei den anderen Kollektiven wurden schwere, vor allem die Gewichtsregulation beeinflussende körperliche Erkrankungen zuvor ausgeschlossen, ebenso wie den Phänotyp beeinflussende Verhaltensweisen. Die Verwendung von

untergewichtigen jungen Erwachsenen dient zudem der Minimierung des Risikos, dass sich im weiteren Verlauf eine Adipositas entwickelt.

Bei den Probanden mit Anorexia nervosa bzw. Bulimia nervosa war Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie die Erfüllung der entsprechenden Kriterien nach *DSM-IV* (s. Kap. 1.3 und 1.4).

5.3 Methoden zur Mutationsdetektion

5.3.1 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, *PCR*) wurde 1985 von Kary B. Mullis und Mitarbeitern entwickelt [Mullis *et al.*, 1990]. Sie imitiert den Replikationsprozess der Zelle und dient dazu, geringste Mengen an Desoxyribonukleinsäure (*DNA*) *in vitro* in fast unbegrenzter Menge zu vervielfältigen [Strachan and Read, 1996]. Die *PCR*-Bedingungen sind entscheidend für die Qualität und Quantität des Amplifikats. Eine zu hoch oder zu niedrig gewählte Temperatur führt zu einer unspezifischen bzw. unmöglichen Anlagerung der Primer. Ist das Reaktionsvolumen zu gering, wirkt sich dies ebenfalls negativ auf die Menge des Amplifikats aus. Bei geringer Menge an Ausgangs-*DNA* lässt man die Reaktion mehr Zyklen durchlaufen und steigert die Zykluszeit zunehmend. Jedoch ist die Steigerung der Zykluszahl über eine bestimmte Grenze hinaus nicht mehr sinnvoll, da ein Plateau erreicht wird (z. B. durch die abnehmende Primer-Konzentration oder die abnehmende Aktivität der Polymerase). Wird die Synthese-Zeit zu kurz gewählt, kann der Strang nicht vollständig synthetisiert werden. Ist die Zeit wesentlich zu lang, kann es zur Bildung unspezifischer Amplifikate kommen. Durch die mit steigender Zykluszahl abnehmende Primer-Konzentration und die, durch die vielen Temperaturveränderungen zunehmend ineffektiver arbeitende Polymerase, läuft die Reaktion nicht mehr so schnell ab wie zu Beginn [Schimmel *et al.*, 1990]. Um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen, erfolgte vor jeder *PCR* eine intensive Optimierungsphase (s. Kap. 3.9).

5.3.1.1 *Taq*-Polymerase

Die *Taq*-Polymerase arbeitet nur bei bestimmten Temperaturen optimal und verliert mit zunehmender Zykluszahl an Effektivität. Daher wurde bei der *PCR* des Intron 1 die Syntheszeit ab dem 10. Zyklus konstant um jeweils 10 s verlängert. Des Weiteren besitzt die *Taq*-Polymerase durch ihre fehlende 3'⇒5'-Exonuklease-Aktivität keine Möglichkeit des Korrekturlesens. Das bedeutet, dass das Risiko falsch eingebauter

Nukleotide deutlich höher ist als bei der *in vivo* DNA-Replikation [Strachan und Read, 1996]. Von van Huijsduijnen und Mitarbeitern [1998] wurde die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase bei der durchschnittlichen *PCR* mit 6×10^{-3} angegeben. Für ein Fragment mit einer Größe von 400 bp bedeutet dies etwa 2 - 3 fälschlich eingebaute Nukleotide in 30 Zyklen. Potenzielle Fehler dieser Art wurden in der vorliegenden Studie durch Wiederholungen der *PCR* bei auffälligen *SSCP*-Bandenmustern nivelliert, da das Auftreten eines erneut falsch eingebauten Nukleotids an genau der gleichen Basenposition als höchst unwahrscheinlich bezeichnet werden kann.

5.3.1.2 Fragmentgröße

Die Größe der zu amplifizierenden Sequenz ist entscheidend für die Thermocycler-Bedingungen (s. Abschnitt 3.2.1). Die standardisierten Protokolle der *PCR* werden für Fragmente bis zu einer Größe von 1 Kb empfohlen. Durch die Größe des Intron 1 des Galaninrezeptor 1 (*GALR1*) von ca. 5 Kb war es notwendig, von diesen Standards abzuweichen. Das bedeutete konkret, ein speziell für Amplifikate dieser Größenordnung entwickeltes *PCR*-Kit (Advantage®-GC Genomic *PCR* Kit von Clontech) zu verwenden. Dieses Kit enthält einen optimierten Puffer sowie das GC-Melt, was die Vervielfältigung komplexer und GC-reicher *DNA*-Abschnitte erleichtert. Wichtig für die erfolgreiche Replikation waren weiterhin die Konzentration der eingesetzten *DNA* (0,1 µg/µl vom Hersteller empfohlen), die Verlängerung der Syntheszeit nach dem 10. Zyklus um jeweils 10 s in den folgenden Zyklen und die Erhöhung der Zykluszahl auf 35. Weiterhin wurde die Annealingzeit für die Primer auf 40 s erhöht. Alle Schritte zusammen brachten eine deutliche Steigerung der Amplifikationen und der Quantität des Amplifikats.

5.3.1.3 Fremdkontamination

Durch Kontamination mit probenfremder *DNA* (z. B. durch Kontamination der Dosierpipetten oder der Handschuhe mit *DNA* des Untersuchers) kann es zu falsch positiven Ergebnissen bei der Amplifikation kommen. Um diese Fehlerquelle gering zu halten, wurde bei jedem Lauf eine Negativkontrolle in Form von Aqua bidest anstelle von *DNA* eingesetzt. Die Arbeitsbereiche waren räumlich getrennt in Vor- und Nach-*PCR*. Für das Pipettieren wurden nur Einweg-Pipetten verwendet. Es wurden immer Einmal-Gummihandschuhe benutzt, die regelmäßig gewechselt wurden. Die Proben-*DNA* wurde in Aliquots zu 50 µl (20 ng/µl) bei -20 °C aufbewahrt.

5.3.2 SSCP

Die Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) ist ein einfaches und preiswertes Verfahren zur Detektion von Mutationen in *DNA*-Fragmenten, die eine Größe von 250 bp nicht überschreiten. Das Prinzip der SSCP beruht auf der unterschiedlichen Faltung von *DNA*-Einzelsträngen, die bereits durch eine einzige abweichende Base im Strang in einem veränderten Laufverhalten resultieren kann. Bei einer Größe bis zu 200 bp beträgt die Sensitivität 70 - 95 % (s. Kap. 3.4). Aus diesem Grund wurde das Amplifikat des Exon 3 (394 Basen) mit Hilfe eines Restriktionsenzym geschnitten (s. Kap. 3.7.3.2). Allerdings besteht auch bei einer Größe bis zu 200 bp noch eine, wenn auch geringe Wahrscheinlichkeit, dass eine mögliche Variante nicht entdeckt wird. Es lässt sich also nicht völlig ausschließen, dass Sequenzvariationen unerkannt bleiben. Da die Temperatur sich wesentlich auf das Migrationsverhalten der *DNA*-Einzelstränge auswirkt, wird die Sensitivität der SSCP bereits durch Verwendung zweier verschiedener Temperaturen (bei Raumtemperatur und 4 °C) deutlich erhöht. Auch die Gelzusammensetzung sowie die weiteren Bedingungen (z. B. Laufpuffer) müssen möglichst optimal gestaltet sein, um die z. T. geringen Laufunterschiede der Einzelstränge erkennen zu können, welche durch die sequenzspezifische räumliche Konformation zustande kommen [Strachan und Read, 1996]. Ist die Gelkonzentration zu hoch gewählt, sind gering ausgeprägte Unterschiede eventuell nicht mehr zu sehen. Zur weiteren Prüfung der Replizierbarkeit der Ergebnisse wurden einige Proben mit abweichenden Bandenmustern als Kontrollen in weiteren Läufen verwendet. Die Proben mit abweichendem Laufmuster wurden anschließend durch eine Sequenzierung untersucht. Ein Nachteil der SSCP-Analyse ist nämlich, dass weder Art noch Position der Mutation festgestellt werden können. Der Nachweis der Allelvariante durch die Sequenzierung mittels Detektion der genauen Basen-Position bestätigte die hohe Sensitivität der SSCP. Sämtliche, in der SSCP-Analyse von der Wildtyp-Variante abweichenden Muster wurden zur Bestätigung sequenziert.

5.3.3 ARMS-PCR

Die *ARMS-PCR* ist eine hervorragende Methode für das schnelle Screenen von großen Studiengruppen hinsichtlich bekannter Allelvarianten. Die Oligonukleotide (Primer) am 3'-Ende hatten eine Größe von 21 Basen (sequenzspezifisch zur Variante oder zur Wildtyp-Sequenz) und von 28 Basen am 5'-Ende (Common Primer). Wichtig für das Erhalten sequenzspezifischer Amplifikate ist ein zusätzliches Mismatching (Fehlpaarung) bei der vorletzten Base am 3'-Ende der beiden Primer. Da bekannt ist, dass die Stärke des destabilisierenden Effekts je nach Fehlpaarung unterschiedlich stark ist, sollten terminales und präterminales Mismatch möglichst je einen starken und

einen schwachen destabilisierenden Effekt besitzen [Little, 1995] (s. auch Kap. 3.3). Diese Richtlinien wurden bei der Konfiguration der Primer für das Erhalten höchstmöglicher Spezifität berücksichtigt.

5.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung ist eine aufwendige und kostenintensive Methode zur Identifikation von Mutationen, weshalb sie für die Untersuchung von zahlenmäßig großen Testreihen ungeeignet ist. Vorteil der Sequenzierung ist die Möglichkeit der genauen Aussage über die Position und folglich auch die Art der Mutation [Strachan and Read, 1996]. Daher wurde diese Methode bei allen auffälligen Mustern der *SSCP*-Analyse eingesetzt, sowie für die Sequenzierung der Intronsequenz vor dem Exon 2 des *GALR1*, um aus diesen Sequenzinformationen einen Primer für die *PCR* des Exon 2 bestimmen zu können. Zusätzlich wurden Proben der Wildtypvariante der jeweiligen Amplifikate sequenziert um sicherzustellen, dass es sich um das korrekte Amplifikat handelte.

Für die Konfiguration eines Primers im Bereich des Intron 1 wurden zwei *DNA*-Proben (eine Probe als Kontrolle) sequenziert (s. Kap. 4.1.2). Die bei der automatischen Detektion gefundenen Sequenzen des Intron 1 wurden immer von mindestens zwei erfahrenen Mitarbeitern unabhängig kontrolliert. Zur weiteren Fehlerminimierung wurde die Sequenzierung der beiden verwendeten *DNA*-Proben je zweimal durchgeführt. Zusätzlich wurde ein markierter Primer an das Ende der detektierten Sequenz gelegt und diese in 5'-3'-Richtung erneut sequenziert. Die Ergebnisse stimmten dabei mit denen der 3'-5'-Sequenzanalyse überein. Nachfolgend wurde ein Primer im sequenzierten Bereich des Intron 1 konfiguriert und für die *PCR* des Exon 2 eingesetzt. Hierbei konnte eine ausreichende Menge Amplifikat in der erwarteten Größe hergestellt werden. Die Auswertung wurde immer von mindestens zwei erfahrenen Personen unabhängig voneinander vorgenommen. Bei Abweichungen wurde die Auswertung wiederholt und, falls notwendig, die Sequenzierung erneut durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung mit Bestimmung der Position der Mutation bestätigten die Validität der Methode der *SSCP*-Analyse. Umgekehrt konnten in der Sequenzierung keine weiteren Polymorphismen detektiert werden, was für die hohe Sensitivität der *SSCP*-Methode spricht. Durch Einsatz von zusätzlichen *DNA*-Proben bekannten Genotyps bei der *SSCP*, der *ARMS-PCR* und der Sequenzierung wurde das Fehlerrisiko weiter minimiert.

5.4 Eigene Ergebnisse

In der Einleitung wurde bereits anhand verschiedener Studien dargelegt, dass die Phänotypen Adipositas, Anorexia und Bulimia nervosa genetischen Einflüssen unterliegen. Zahlreiche Hormone und Neurotransmitter sind aus diesem Grunde in den letzten Jahren auf einen möglichen Einfluss auf die oben genannten Phänotypen untersucht worden. Eines der in der jüngeren Vergangenheit entdeckten Neurotransmittersysteme ist das galaninerge System. Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, konnte im Tierversuch ein Einfluss des Peptids Galanin (GAL) auf das Essverhalten und die Gewichtsregulation nachgewiesen werden (s. Kap. 1.6 und 1.7). Zur Beantwortung der Frage, welcher der drei bislang identifizierten Galaninrezeptoren am ehesten für den Einfluss auf die Nahrungsaufnahme verantwortlich ist, wurden verschiedene Studien an Ratten und Mäusen durchgeführt, deren Ergebnisse nahelegen, dass diese Funktion über den *GALR1* vermittelt wird, was das humane *GALR1*-Gen zu einem plausiblen Kandidatengen macht. Es wurden bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit keine Studien durchgeführt, die sich auf Veränderungen der Gensequenz der humanen Galaninrezeptoren konzentrierten. Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen möglichen Veränderungen der codierenden Bereiche (Exon 2 und 3) des *GALR1*-Gens und den Phänotypen Adipositas, Anorexia nervosa und Bulimia nervosa beim Menschen gibt. Die dabei gefundenen Ergebnisse sollen nachfolgend diskutiert werden.

5.4.1 Exon 1 des *GALR1*

Das Exon 1 des *GALR1* war nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Jedoch wurde das Mutationsscreening zum Exon 1 des *GALR1* parallel von der gleichen Forschergruppe durchgeführt. Dabei wurde ein weiterer Polymorphismus in Form einer stillen Mutation⁹ identifiziert [nachzulesen in Schäuble *et al.*, 2005].

5.4.2 Exon 2 des *GALR1*

Das Exon 2 des *GALR1* codiert für die dritte intrazelluläre Schleife des Rezeptors. Diese ist bei vielen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in die Interaktion mit dem G-Protein einbezogen, außerdem ist sie bei einigen Rezeptoren der Ort für alternatives Splicen und bestimmt somit die funktionelle Diversität der Rezeptoren [Iismaa *et al.*, 1998]. Eine Mutation in diesem Exon könnte nach dieser Theorie also zu relevanten

⁹ Keine Veränderung der Aminosäuresequenz.

funktionellen Veränderungen im Rezeptor führen. Bei den von uns untersuchten Studiengruppen fand sich kein von der bekannten Wildtyp-Variante abweichendes Bandenmuster in der SSCP-Analyse. Die Sensitivität des SSCP-Screenings beträgt bei einer Fragmentgröße von ca. 200 bp bis zu 95 % [Grompe, 1993]. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine vom Wildtyp abweichende Sequenz übersehen wurde, ist demnach sehr gering. Es bleibt zu prüfen, ob in weiteren Untersuchungen mit Probanden gleicher oder anderer ethnischer Herkunft funktionsrelevante Mutationen in diesem Bereich vorkommen. Bislang gibt es hierzu keine weiteren Studien.

5.4.3 Identifizierter Polymorphismus im Exon 3 des *GALR1*

Das Exon 3 des *GALR1*-Gens codiert ab der 6. intrazellulären Domäne bis zum Ende des Rezeptors. Die Mutationssuche führten wir mit der SSCP-Methode durch. Die Positionsbestimmung erfolgte durch Sequenzierung. Es wurde ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus an Position **793** der codierenden Sequenz des *GALR1* (Aminosäure 265) identifiziert, der zu einem Basenaustausch von **A→T** führt. Dadurch kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin (Codierung ATC) zu Phenylalanin (Codierung TTC), also einer Missense-Mutation (**Ile265Phe**). Durch die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Aminosäuren spricht man von einer sogenannten nonkonservativen Missense-Mutation. Bei der Aminosäure Isoleucin handelt es sich um eine aliphatische Aminosäure, die kein Ringsystem enthält und deren Seitenketten ausgeprägt unpolar sind. Die Aminosäure Phenylalanin gehört zu den aromatischen Aminosäuren mit mesomeriestabilisierten Ringsystemen. Auch diese hat ausgeprägt unpolare Eigenschaften. Veränderungen in der Aminosäuresequenz können zu funktionellen Anomalien und Krankheiten führen. Einige schwere Krankheiten wie die Sichelzellenanämie oder die zystische Fibrose beispielsweise beruhen auf dem Austausch einer einzigen Aminosäure in einem einzigen Protein [Stryer, 1996].

Der homozygote Träger des Polymorphismus kommt aus der gesunden, untergewichtigen Kontrollgruppe (s. Kap. 4.2.4). Der Anteil der heterozygoten Träger unterschied sich mit Genotyp-Häufigkeiten von 7,07 - 10,7 % nicht signifikant in den untersuchten Gruppen (s. Tab. 4-4). Das relativ häufige Vorkommen heterozygoter Träger in allen untersuchten Studiengruppen spricht dafür, dass diese nonkonservative Missense Mutation und die damit verbundene Änderung der Aminosäure-Sequenz des *GALR1*-Gens offensichtlich zu keinem funktionell bedeutsamen selektiven Nachteil führt. Der Polymorphismus **793A→T** liegt in der 6. transmembranären Domäne. An den Transmembrandomänen werden häufig die entsprechenden Hormone oder

Neurotransmitter gebunden [Stryer, 1996], so dass eine relevante Veränderung der Funktion des *GALR1*-Rezeptors durch den Polymorphismus nicht ausgeschlossen werden kann, bislang jedoch nicht nachgewiesen wurde.

In einem zweiten Schritt versuchten wir, einen möglichen Einfluss des Polymorphismus auf die Phänotypen Adipositas, Anorexia nervosa und Bulimia nervosa aufzudecken. Um dies zu klären, führten wir Assoziationstests¹⁰ zu den genannten Phänotypen durch, die jedoch keine signifikanten Ergebnisse brachten (p-Werte > 0,05). Ein Einfluss der identifizierten Missense-Mutation auf die untersuchten Studiengruppen erscheint somit unwahrscheinlich, kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Weitere Überlegungen zur Klärung eines funktionellen Einflusses des Polymorphismus.

Es besteht theoretisch die Möglichkeit, dass ein möglicher funktioneller Effekt der Mutation auf die untersuchten Phänotypen durch andere Genprodukte verdeckt wird. Durch die Vielzahl exprimierter Gene lässt sich der Einfluss des Einzelnen auf einen Phänotyp bis heute nicht genau bestimmen. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass der Polymorphismus erst in einem späteren Lebensalter einen Einfluss auf die Ausprägung der Phänotypen Adipositas, Anorexia nervosa oder Bulimia nervosa hat. Dieser Überlegung liegt die Theorie zugrunde, dass für die Gewichtsregulation im Kindes- und Jugendalter andere Gene als im Erwachsenenalter verantwortlich sind (s. Kap. 1.1). Um hierzu eine Aussage zu treffen, müsste weitere Untersuchungen zu diesem Polymorphismus an erwachsenen Probanden durchgeführt werden. Weiterhin wäre interessant zu überprüfen, inwiefern ein Einfluss des Polymorphismus auf die Gewichtsregulation bei anderen ethnischen Populationen vorhanden sein könnte. Letztlich wurden in der vorliegenden Arbeit nur Phänotypen bezüglich der Gewichtsregulation untersucht. Vorstellbar wäre darüber hinaus auch, dass die identifizierte Allelvariante bei anderen Phänotypen als den hier untersuchten eine funktionelle Relevanz besitzt, vor allem im Hinblick darauf, dass das galaninerge System an zahlreichen Prozessen wie Lernen, Emotion, Sucht, Darmmotilität, Nozizeption usw. beteiligt ist und der *GALR1* sowohl zentral als auch peripher exprimiert wird. Jedoch gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt hierzu keinerlei Studien (s. Kap. 1.6).

¹⁰ exakter Test nach Fisher, Chi-Quadrat-Test, Cochran-Armitage Trend Test

Weiterführende Untersuchungsergebnisse

Ob der identifizierte Polymorphismus einen Einfluss auf die Fettpräferenz bei der Nahrungsaufnahme hat (s. Kap. 1.6 und 1.7), wurde in einer anschließenden Studie untersucht. Dabei wurden adipöse Probanden, die mit dem Anteil der Nahrungsfette an der Gesamtenergiezufuhr im höchsten versus niedrigsten Quartil lagen, verglichen und Assoziationstests mit dem identifizierten Polymorphismus **793A→T** durchgeführt. Hierbei handelte es sich um die erste Assoziationsuntersuchung dieser Art, welche die Fettpräferenz bei der Nahrungsaufnahme in einer Studie am Menschen berücksichtigt. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorhandensein des Polymorphismus und der Fettpräferenz ($p > 0,05$) gefunden werden [Schäuble *et al.*, 2005]. Dies unterstreicht das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass der identifizierte Polymorphismus wahrscheinlich keinen Einfluss auf die untersuchten Phänotypen, insbesondere die extreme Adipositas bei Kindern und Jugendlichen besitzt.

Einschränkungen der vorliegenden Studie

Die vorliegende Studie kann nur Aussagen über die codierenden Bereiche der Exons 2 und 3 des *GALR1*-Gens machen. Die Untersuchungen zum Exon 1 wurden jedoch parallel in einer weiteren Studie durchgeführt [nachzulesen in Schäuble *et al.*, 2005]. Ein möglicher Einfluss auf die Funktion des Rezeptors durch Veränderungen in der Intronsequenz wurde ebenfalls nicht untersucht. Zusätzliche Studien hierzu könnten ggf. zu anderen Ergebnissen gelangen, da Intronsequenzen bekanntermaßen nicht nur sogenannten *DNA*-Müll darstellen, sondern auch eine wichtige Rolle beim Alternativen Spleißen spielen, bei dem aus einer *DNA*-Sequenz mehrere unterschiedliche Proteine hergestellt werden können. Veränderungen in diesen Bereichen können also ebenfalls zu veränderten Genprodukten bzw. zur Abwesenheit alternativer Genprodukte führen, was ebenfalls eine veränderte Funktion nach sich ziehen kann [Strachan und Read, 1996; Stryer, 1996].

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Bei zahlreichen Genen konnte eine Beteiligung an der Ausprägung des Gewichts nachgewiesen werden. Das zentral und peripher vorkommende Peptid Galanin (*GAL*) ist beteiligt am Essverhalten und der Gewichtsregulation. Mehrere Studien haben gezeigt, dass diese Funktion offensichtlich über den Galaninrezeptor 1 (*GALR1*) ausgeübt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen der Exons 2 und 3 des *GALR1* auf Mutationen untersucht. Hierbei konnten wir einen bislang unbekanntem Single Nukleotid Polymorphismus (*SNP*) **793A→T** im Exon 3 des *GALR1*-Gens

identifizieren, der in Form einer nonkonservativen Missense-Mutation zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt (**Ile265Phe**). Die durchgeführten Assoziationsuntersuchungen des Polymorphismus zu Probandengruppen mit frühkindlicher Adipositas, Anorexia nervosa und Bulimia nervosa ergaben keine signifikanten Werte ($p > 0,05$). Ein Zusammenhang der Mutation zu den untersuchten Phänotypen erscheint durch die erhaltenen Ergebnisse unwahrscheinlich. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Polymorphismus zu einer funktionellen Änderung im exprimierten Rezeptor führt, was jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde.

Die genaue Kenntnis der Wirkungsmechanismen des Galanins (*GAL*) und der drei Galaninrezeptoren (*GALR*) könnte Ansatzmöglichkeiten für die Entwicklung neuer diagnostischer Möglichkeiten oder neuer pharmakologischer Therapieformen bei zahlreichen Krankheiten, wie z. B. metabolischen Störungen, Wachstum und Entwicklung, M. Alzheimer, Epilepsie, affektiven Störungen, Alkoholabhängigkeit, Schmerz oder Tumoren geben. So sind Studien zum galanineren System bei M. Alzheimer, Depression und Angst, als Tumormarker sowie Schmerz in letzter Zeit zunehmend in das Zentrum der Untersuchungen gerückt (s. Kap. 1.6). Eine Berücksichtigung des von uns identifizierten Polymorphismus **793A→T** im humanen *GALR1*-Gen bei diesen Untersuchungen könnte dazu beitragen, die Bedeutung des galanineren Systems und damit auch dessen vielfältige Funktionen weiter aufzuklären und dadurch mögliche diagnostische und therapeutische Ansätze für die Behandlung der oben genannten Krankheitsbilder zu erhalten.

6 Literaturverzeichnis

- Adams A. C., Clapham J. C., Wynick D., Speakman J. R. (2008) Feeding behaviour in galanin knockout mice supports a role of galanin in fat intake and preference. *J. Neuroendocrinol.*, 20 (2), 199-206.
- Ahima R. S., Dushay J., Flier S. N., Prabakaran D., Flier J. S. (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J. Clin. Invest.*, 99 (3), 391-395.
- Akabayashi A., Koenig J. I., Watanabe Y., Alexander J. T., Leibowitz S. F. (1994) Galanin-containing neurons in the paraventricular nucleus: A neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10375-10379.
- Ando T., Komaki G., Naruo T., Okabe K., Takii M., Kawai K., Konjiki F., Takei M., Oka T., Takeuchi K., Masuda A., Ozaki N., Suematsu H., Denda K., Kurokawa N., Itakura K., Yamaguchi C., Kono M., Suzuki T., Nakai Y., Nishizono-Maher A., Koide M., Murakami K., Nagamine K., Tomita Y., Ookuma K., Tomita K., Tonai E., Ooshima A., Ishikawa T., Ichimaru Y. (2006) Possible role of proghrelin gene polymorphisms in susceptibility to bulimia nervosa. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 141B (8), 929-934.
- Bado A., Lévassieur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau J. P., Bertoluzzi M. N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y., Lewin M. J. (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394 (6695) 790-793.
- Baranowska B., Radzikowska M., Wasilewska-Dziubinska E., Roguski K., Polonowski A. (2000) Relationship among leptin, neuropeptide Y, and galanin in young women and in postmenopausal women. *Menopause*, 7 (3), 149-155.
- Baranowska B., Wasilewska-Dziubinska E., Radzikowska M., Plonowski A., Roguski K. (1997) Neuropeptide Y, galanin, and leptin release in obese women and in women with anorexia nervosa. *Metabolism*, 46 (12), 1384-1389.
- Bartfai T., Fisone G., Langel Ü. (1992): Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical properties. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 312-317.
- Bartfai T., Hokfelt T., Langel U. (1993) Galanin - a neuroendocrine peptide. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 7, 229-274.
- Bauer F. E., Zintel A., Kenny M. J., Calder D., Ghatei M. A., Bloom S. R. (1989) Inhibitory effect of galanin on postprandial gastrointestinal motility and gut hormone release in humans. *Gastroenterology*, 97 (2), 260-264.
- Belfer I., Hipp H., Bollettino A., McKnight C., Evans C., Virkkunen M., Albaugh B., Max M. B., Goldman D., Enoch M. A. (2007) Alcoholism is associated with GALR3 but not two other galanin receptor genes. *Genes Brain Behav.*, 6, 473-481.
- Bergen A. W., Yeager M., Welch R. A., Haque K., Ganjei J. K. van den Bree M. B., Mazzanti C., Nardi I., Fichter M. M., Halmi K. A., Kaplan A. S., Strober M., Treasure J., Woodside D. B., Bulik C. M., Bacanu S. A., Devlin B., Berrettini W. H., Goldman D., Kaye W. H. (2005) Association of multiple DRD2 polymorphisms with anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology*, 30 (9), 1703-1710.

- Bergonzelli G. E., Pralong F. P., Glauser M., Cavadas C., Grouzmann E., Gaillard R. C. (2001) Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y. *Diabetes*, 50 (12), 2666-2672.
- Bersani M., Johnsen A. H., Hojrup P., Dunning B. E., Andreasen J. J., Holst J. J. (1991) Human galanin: primary structure and identification of two molecular forms. *FEBS Lett.*, 283 (2), 189-194.
- Borowsky B., Walker M. W., Huang L.-Y., Jones K. A., Smith K. E., Bard J., Branchek T. A., Gerald C. (1998) Cloning and characterization of the human galanin GALR2 receptor. *Peptides*, 19 (10), 1771-1781.
- Bouchard C., Després J.-P., Mauriège P., Marcotte M., Chagnon M., Dionne F. T., Bélanger A. (1991) The genes in the constellation of determinants of regional fat distribution. *Int. J. Obes.*, 15, 9-18.
- Bouchard C., Pérusse L. (1993) Genetics of obesity. *Ann. Rev. Nutr.*, 13, 337-354.
- Bouchard C., Tremblay A., Després J.-P., Nadeau A., Lupien P. J., Thériault G., Dussault J., Moorjani S., Pinault S., Fournier G. (1990) The response to long-term overfeeding in identical twins. *New Engl. J. Med.* 322: 1477-1482.
- Branchek T. A., Smith K. E., Gerald C., Walker M. W. (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21 (3), 109-117.
- Branchek T. A., Smith K. E., Walker M. W. (1998) Molecular biology and pharmacology of galanin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 863 (12), 94-107.
- Bray G. A. (1987) Overweight is risking fate. definition, classification, prevalence, and risks. In: Wurtmann R. J., Wurtmann J. J. (eds) *Human obesity*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 499, 14-28.
- Bray G., Bouchard C. (1997) Genetics of human obesity: research directions. *FASEB J.* 11 (12), 937-945.
- Brown K. M., Bujac S. R., Mann E. T., Campell D. A., Stubbins M. J., Blundell J. E. (2007) Further evidence of association of OPRD1 and HTR1D polymorphisms with susceptibility to anorexia nervosa. *Biol. Psychiatry.*, 61 (3), 367-373.
- Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M., Eisenberg A. J., Allen R. C. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 137-144.
- Bulik C. M., Sullivan P. F., Kendler K. S. (1998) Heritability of binge-eating and broadly defined bulimia nervosa. *Biol. Psychiatry*, 44, 1210-1218.
- Bultmann S. J., Michaud E. J., Woychik R. P. (1992) Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71, 1195-1204.
- Burgevin M. C., Loquet I., Quarteronet D., Habert-Ortoli E. (1995) Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *J. Mol. Neurosci.*, 6, 33-41.
- Campfield L. A., Smith F. J., Guisez Y., Devos R., Burn P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269 (5223), 546-549.

- Carey D. G., Iismaa T. P., Ho K. Y., Rajkovic I. A., Kelly J., Kraegen E. W., Ferguson J., Inglis A. S., Shine J., Chisholm D. J. (1993) Potent effects of human galanin in man: Growth hormone secretion and vagal blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 90-93.
- Chagnon Y. C., Pérusse L., Lamothe M., Chagnon M., Nadeau A., Dionne F. T., Gagnon J., Chung W. K., Leibel R. L., Bouchard C. (1997) Suggestive linkages between markers on human 1p32-p22 and body fat and insulin levels in the Quebec Family Study. *Obes. Res.*, 5, 115-121.
- Chehab F. F., Lim M. E., Lu R. (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.*, 12 (3), 318-320.
- Chehab F. F., Mounzih K., Lu R., Kim M. E. (1997) Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*, 275 (5296), 88-90.
- Chen H., Charlat O., Tartaglia L. A., Wolf E. S., Weng X., Ellis S. J., Lakey N. D., Culpepper J., Moore K. J., Breitbart R. E., Duyk G. M., Tepper R. I., Morgenstern J. P. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84 (3), 491-495.
- Chua S. C., White D. W., Wu-Peng X. S., Liu S. M., Okada N., Kershaw E. E., Chung W. K., Power-Kehoe L., Chua M., Tartaglia L. A., Leibel R. L. (1996) Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (LEPR). *Diabetes*, 45 (8), 1141-1143.
- Cioffi J. A., Shafer A. W., Zupancic T. J., Smith-Gbur J., Mikhail A., Platika D., Snodgrass H. R. (1996) Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat. Med.*, 2 (5), 585-589.
- Clément K., Garner C., Hager J., Philippi A., Leduc C., Carey A., Harris T. J. R., Jury C., Cardon L. R., Basdevant A., Demenais F., Guygrand B., North M., Froguel P. (1996) Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes*, 45, 687-690.
- Clément K., Vaisse C., Lahlou N., Cabrol S., Pelloux V., Cassuto D., Gormelen M., Dina C., Chambaz J., Lacorte J. M., Basdevant A., Bougneres P., Lebouc Y., Froguel P., Guy-Grand B. (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392 (6674), 398-401.
- Clément K., Vaisse C., Manning B. S., Basdevant A., Guy-Grand B., Ruiz J., Silver K. D., Shuldiner A. R., Froguel P., Strosberg A. D. (1995) Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N. Engl. J. Med.* 333 (6), 382-383.
- Cody J. D., Hale D. E., Brkanac Z., Kaye C. I., Leach R. J. (1997) Growth hormone insufficiency associated with haploinsufficiency at 18q23. *Am. J. Med. Genet.*, 71 (4), 420-425.
- Coleman D. L. (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologica*, 14, 141-148.
- Coleman D. L., Eicher E. M. (1990) Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J. Hered.*, 81 (6), 424-427.
- Collier D. A., Arranz M. J., Li T., Mupita D., Brown N., Treasure J. (1997) Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. *Lancet*, 350 (9075), 412.

- Comuzzie A. G., Hixson J. E., Almasy L., Mitchell B. D., Mahaney M. C., Dyer T. D., Stern M. P., MacCluer J. W., Blangero J. (1997) A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nat. Genet.*, 15, 273-276.
- Cone R. D., Lu D., Koppula S., Vage D. I., Klungland H., Boston B., Chen W., Orth D. N., Pouton C., Kesterson R. A. (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 51, 287-317.
- Crawley J. N. (2008): Galanin impairs cognitive abilities in rodents: relevance to alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 1836-1841.
- Crawley J. N. (1995) Biological actions of galanin. *Regulatory Peptides*, 59, 1-16.
- Crawley J. N. (1999) The role of galanin in feeding behavior. *Neuropeptides*, 33 (5), 369-375.
- Crawley J. N., Austin M.C., Fiske S. M., Martin B., Consolo S., Berthold M., Langel U., Fisone G., Bartfai T. (1990) Activity of centrally administered galanin fragments on stimulation of feeding behavior and on galanin receptor binding in the rat hypothalamus. *J. Neurosci.*, 10, 3695-3700.
- Dardennes R. M., Zizzari P., Tolle V., Foulon C., Kipman A., Romo L, Iancu-Gontard D., Boni C., Sinet P. M., Therese Bluet M., Estour B., Mouren M. C., Guelfi J. D., Rouillon F., Gorwood P., Epelbaum J. (2007) Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with anorexia nervosa: association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology*, 32 (2), 106-113.
- Dempfle A., Hinney A., Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M., Geller F., Gudermann T., Schäfer H., Hebebrand J. (2004) Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J. Med. Genet.*, 41 (10), 795-800.
- Dostálová I., Haluzík M. (2008) The role of ghrelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa. *Physiol. Res. (im Druck)*.
- Dragani T. A., Zeng Z. B., Canzian F., Gariboldi M., Ghilarducci M. T., Manenti G., Pierotti M. A. (1995) Mapping of body weight loci on mouse chromosome X. *Mamm. Genome*, 6, 778-781.
- Duhl D. M., Vrieling H., Miller K. A., Wolff G. L., Barsh G. S. (1994) Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat. Genet.*, 8 (1), 59-65.
- Elliot-Hunt C. R., Marsh B., Bacon A., Pope R., Vanderplank P., Wynick D. (2004) Galanin acts as a neuroprotective factor to the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 5105-5110.
- Erickson J. C., Clegg K. E., Palmiter R. D. (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, 381, 415-421.
- Evans H., Baumgartner M., Shine J., Herzog H. (1993) Genomic organization and localization of the gene encoding human preprogalanin. *Genomics*, 18, 473-477.
- Fabsitz R. R., Carmelli D., Hewitt J. K. (1992) Evidence for independent genetic influences on obesity in middle age. *Int. J. Obes.*, 16, 657-666.

- Fathi Z., Battaglini P. M., Iben L. G., Li H., Baker E., Zhang D., McGovern R., Mahle C. D., Sutherland G. R., Iismaa T. P., Dickinson K. E. J., Zimanyi I. A. (1998) Molecular characterization, pharmacological properties and chromosomal localization of the human GALR2 galanin receptor. *Mol. Brain Res.*, 58, 156-169.
- Feigerlová E., Diene G., Conte-Auriol F., Molinas C., Gennero I., Salles J. P., Arnaud C., Tauber M. (2008) Hyperghrelinemia precedes obesity in prader-willi syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (7), 2800-2805
- Fisler J. S., Warden C. H., Pace M. J., Lusk J. A. (1993) A new mouse model of multigenic obesity. *Obes. Res.* 1 (4), 271-280.
- Foster C. M., Barkan A., Kasa-Vubu J. Z., Jaffe C. (2007) Ghrelin concentrations reflect body mass index rather than feeding status in obese girls. *Pediatr. Res.* 62 (6), 731-34.
- Gantz I., Miwa H., Konda Y., Shimoto Y., Tashiro T., Watson S. J., DelValle J., Yamada T. (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.*, 268, 15174-15179.
- Garrow J. S. (1981) *Treat obesity seriously: a clinical manual*. Edinburgh; Churchill Livingstone
- Geller F., Reichwald K., Dempfle A., Illig T., Vollmert C., Herpertz S., Siffert W., Platzer M., Hess C., Gudermann T., Biebermann H., Wichmann H. E., Schäfer H., Hinney A., Hebebrand J. (2004) Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am. J. Hum. Genet.*, 74 (3), 572-581.
- Gerald C., Walker A. W., Criscione L., Gustafson E. L., Batzl-Hartman C., Smith K. E., Vaysses P., Durkin M. M., Laz T. M., Linemeyer D. L., Schaffhauser A. O., Whitebread S., Hofbauer K. G., Taber R. I., Branchek T. A., Weinshank R. L. (1996) A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*, 382, 168-171.
- Glantz S. A. (1998) *Biostatistik. Ein Fach für die Praxis*. Dt. Ausg. herausgegeben von: Heinecke A., Köpcke W., McGraw-Hill International (UK) Ltd., 4. Aufl.
- Gorbatyuk O., Hokfelt T. (1998) Effect of inhibition of glucose and fat metabolism on galanin-r1 receptor mRNA levels in the rat hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroreport*, 9 (16), 3565-3569.
- Grompe M. (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics*, 5 (2), 111-117.
- Gustafson E. L., Smith K. E., Durkin M. M., Gerald C., Branchek T. A. (1996) Distribution of a rat galanin receptor mRNA in rat brain. *Neuroreport*, 7, 953-957.
- Habert-Ortoli E., Amiranoff B., Loquet I., Laburthe M., Mayaux J. F. (1994) Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9780-9783.
- Hager J., Dina C., Francke S., Dubois S., Houari M., Vatin V., Vaillant E., Lorentz N., Basdevant A., Clement K., Guy-Grand B., Froguel P. (1998) A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat. Genet.*, 20, 304-308.
- Halaas J. L., Gajiwala K. S., Maffei M., Cohen S. L., Chait B. T., Rabinowitz D., Lallone R. L., Burley S. K., Friedman J. M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269 (5223), 543-546.

- Hebebrand J., Fichter M., Gerber G., Görg T., Hermann H., Geller F., Schäfer H., Remschmidt H., Hinney A. (2002) Genetic predisposition to obesity in bulimia nervosa: a mutation screen of the melanocortin-4 receptor gene. *Mol. Psychiatry.*, 7 (6), 647-51.
- Hebebrand J., Herpertz-Dahlmann B., Remschmidt H. (1995c) Anorexia nervosa: Aspekte moderner Gewichtsforschung. *TW Neurologie Psychiatrie*, 9, Heft 7-8, 415-422
- Hebebrand J., Hesecker H., Himmelmann W., Schäfer H., Remschmidt H. (1994) Altersperzentile für den Body-Mass-Index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren. *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 19, 259-265.
- Hebebrand J., Hinney A., Klug J. (1996) Neue molekularbiologische Befunde zur Regulation des Körpergewichts. *Biospektrum* 3/96, 2. Jahrgang, 30-32.
- Hebebrand J., Hinney A., Remschmidt H. (1998a) Genetik der Anorexia nervosa. *Medgen*, 10, 412-414.
- Hebebrand J., Hinney A., Roth H., Ziegler A. (1998b) Genetische Aspekte der Adipositas. In Wechsler J. G. (Hrsg.): *Adipositas/Ursachen und Therapie*. Berlin-Wien:Ex Libris Roche-Blackwell, 105-117.
- Hebebrand J., Remschmidt H. (1995a) Genetische Aspekte der Adipositas. *Adipositas*, 9, 20-24.
- Hebebrand J., Remschmidt H. (1995b) Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Medizinische Klinik*, 90 (7), 403-410.
- Hebebrand J., Sommerlad C., Geller F., Görg T., Hinney A. (2001) The genetics of obesity: practical implications. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 25, 10-18.
- Hebebrand J., Wulfstange H., Goerg T., Ziegler A., Hinney A., Barth N., Mayer H., Remschmidt H. (2000) Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24 (3) 345-353.
- Heiman M. L., Witcher D. R. (2006) Ghrelin in obesity. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 4 (1), 37-42.
- Hinney A., Becker I., Heilbült O., Nottebom K., Schmidt A., Ziegler A., Mayer H., Siegfried W., Blum W. F., Remschmidt H., Hebebrand J. (1998a) Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 3737-3741.
- Hinney A., Bettecken T., Tarnow P., Brumm H., Reichwald K., Lichtner P., Scherag A., T. Nguyen T., Schlumberger P., Rief W., Vollmert C., Illig T., Wichmann H. E., Schäfer H., Platzer M., Biebermann H., Meltinger T., Hebebrand J. (2006) Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from germany. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91 (5), 1761-1769.
- Hinney A., Bornscheuer A., Depenbusch M., Mierke B., Tölle A., Middeke K., Ziegler A., Roth H., Gerber G., Zamzow K., Ballauff A., Hamann A., Mayer H., Siegfried W., Lehmkuhl G., Poustka F., Schmidt M. H., Hermann H., Herpertz-Dahlmann B. M., Fichter M., Remschmidt H., Hebebrand J. (1998b) No evidence for involvement of the leptin gene

- in anorexia nervosa, bulimia nervosa, underweight or early onset extreme obesity. *Mol. Psychiatry*, 3 (6), 539-543.
- Hinney A., Hohmann S., Geller F., Vogel C., Hess C., Wermter A. K., Brokamp B., Goldschmidt H., Siegfried W., Remschmidt H., Schäfer H., Gudermann T., Hebebrand J. (2003) Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88 (9), 4258-4267.
- Hinney A., Lentjes K.U., Rosenkranz K., Barth N., Roth H., Ziegler A., Hennighausen K., Coners H., Wurmser H., Jacob K., Romer G., Winnikes U., Mayer H., Herzog W., Lehmkuhl G., Poustka F., Schmidt M. H., Blum W. F., Pirke K. M., Schäfer H., Grzeschik K. H., Remschmidt H., Hebebrand J. (1997c) Beta 3-adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight or anorexia nervosa. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 21, 224-230.
- Hinney A., Remschmidt H., Hebebrand J. (2000a) Candidate gene polymorphisms in eating disorders. *European Journal of Pharmacology*, 410, 147-159.
- Hinney A., Rosenkranz K., Roth H., Hebebrand J. (1997a) Gene in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. *Adipositas*, 7(13), 6-12.
- Hinney A., Schmidt A., Nottebom K., Heilbult O., Becker I., Ziegler A., Gerber G., Sina M., Gorg T., Mayer H., Siegfried W., Fichter M., Remschmidt H., Hebebrand J. (1999) Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 1483-1486.
- Hinney A., Ziegler A., Nöthen M., Remschmidt H., Hebebrand J. (1997b) 5-HT_{2A} receptor gene polymorphisms, anorexia nervosa, and obesity. *Lancet*, 350, 1324-1325.
- Hinney A., Ziegler A., Oeffner F., Wedewardt C., Vogel M., Wulfstange H., Geller F., Stübing K., Siegfried W., Goldschmidt H.P., Remschmidt H., Hebebrand J. (2000b) Independent confirmation of a major locus for obesity on chromosome 10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 2962-2965.
- Hobson S. A., Bacon A., Elliot-Hunt C. R., Holmes F. E., Kerr N. C. H., Pope R., Vanderplank P., Wynick D. (2008) Galanin acts as a trophic factor to the central and peripheral nervous systems. *Cell Mol. Life Sci.*, 65, 1806-1812.
- Hoffmann S. O., Hochapfel G. (1995) *Neurosenlehre, Psychotherapeutische und Psychosomatische Medizin*, 5., erw. Aufl. – Schattauer.
- Hohmann J. G., Cadd G. C., Teal T. H., Clifton D. K., Steiner R. A. (1997) Transgenic mice that overexpress the galanin gene in brainstem neurons. *Soc. Neurosci.*, 23 (729), 15.
- Hökfelt T., Millhorn D., Serogy K., Tsuruo Y., Cecatelli S., Lindh B., Meister B., Melander T., Schalling M., Bartfai T., Terenius T. (1987) Coexistence of peptides with classical transmitters. *Experientia*, 43, 768-780.
- Holland A. J., Sicotte N., Treasure J. (1988) Anorexia nervosa: evidence for a genetic basis. *J. Psychosom. Res.*, 32, 561- 571.

- Holland A., Hall A., Murray R., Russel G. F. M., Crisp A. H. (1984) Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. *Brit. J. Psychiat.*, 145, 414-419.
- Hua X. Y., Hayes C. S., Hofer A., Fitzsimmons B., Kilk K., Langel U., Bartfai T., Yaksh T. L. (2004) Galanin acts at GALR1 receptors in spinal antinociception: synergy with morphine and AP-5. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308, 574-582.
- Huijsduijinen van R.H.(1998) PCR-assisted cDNA cloning: a guided tour of the minefield. *Biotechniques*, 29, 24-28.
- lismaa T. P., Fathi Z., Hort Y. J., Iben L. G., Dutton J. L., Baker E., Sutherland G. R., Shine J. (1998) Structural organization and chromosomal localization of three human galanin receptor genes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (863), 56-63.
- Invitti C., Brunani A., Pasqualinotto L., Dubini A., Bendinelli P., Maroni P., Cavagnini F. (1995) Plasma galanin concentrations in obese, normal weight and anorectic women. *Int. J. Obes.*, 19, 347-349.
- Invitti C., Giraldi F. P., Dubini A., Moroni P., Losa M., Piccoletti R., Cavagnini F. (1999) Galanin is released by adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocr. and Metab.*, 84 (4),: 1351-1356.
- Jackson R. S., Creemers J. W., Ohagi S., Raffin-Sanson M. L., Sanders L., Montague C. T., Hutton J. C., O'Rahilly S. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.*, 16, 303-306.
- Jacoby A. S., Webb G. C., Liu M. L., Kofler B., Hort Y. J., Fathi Z., Bottema C. D. K., Shine J., lismaa T. P. (1997) Structural organization of the mouse and human GALR1 galanin receptor genes (GALnr and GALNR) and chromosomal localization of the mouse gene. *Genomics*, 45, 496-508.
- Johard H. A., Lundquist C. T., Rokaeus A., Nassel D. R. (1992) Autoradiographic localization of 125I-galanin binding sites in the blowfly brain. *Regul. Pept.*, 42, 123-134.
- Kask K., Berthold M., Bartfai T. (1997) Galanin receptors: involvement in feeding, pain, depression and alzheimer's disease. *Life Sciences*, 60 (18) 1523-1533.
- Kaye W. H., Berrettini W., Gwirtsman H., George D. T. (1990) Altered cerebrospinal fluid neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47, 548-556.
- Kaye W. H., Gwirtsman H. E., George D. T., Ebert M. H. (1991) Altered serotonin activity in anorexia nervosa after long-term weight restoration. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48, 556-562.
- Klinke R., Silbernagl S. (1996) *Lehrbuch der Physiologie.*, Georg Thieme Verlag, 2. Aufl.
- Koenig J. I., Hooi S. C., Maiter D. M., Martin J. B., Gabriel S. M., Strauss R. M., Kaplan L. M. (1991) On the interactions of galanin within the hypothalamic pituitary axis of the rat. In: Hokfelt T., Bartfai T., Jacobowitz J. M., Otteson D. (eds). *Galanin and the hypothalamic-pituitary axis.* New York: (MacMillan), 331-342.
- Kolakowski Jr L. F., O' Neill G. P., Howard A. D., Broussard S. R., Sullivan K. A., Feighner S. D., Sawzdargo M., Nguyen T., Kargman S., Shiao L. L., Hreniuk D. L., Tan C. P., Evans

- J., Abramovitz M., Chateaufneuf A., Coulombe N., Ng G., Johnson M. P., Tharian A., Khoshbouei H., George S. R., Smith R. G., O' Dowd B. F. (1998) Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J. Neurochem.*, 71 (6), 2239-2251.
- Krude H., Biebermann H., Luck W., Horn R., Brabant G., Grüters A. (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics*, 19, 155-157.
- Kuo L.E., Kitlinska J. B., Tilan J. U., Li L., Baker S. B., Johnson M. D., Lee E. W., Burnett M. S., Fricke S. T., Kvetnansky R., Herzog H., Zukowska Z. (2007) Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat. Med.* 13 (9), 803-811.
- Kuteeva E., Hökfelt T., Wardi T., Ögren S. O. (2008) Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 1854-1863.
- Lander E. S., Schork N. J. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265, 2037-2048.
- Lee G. H., Proenca R., Montez J. M., Carroll K. M., Darvishzadeh J. G., Lee J. I., Friedman J. M. (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379 (6566), 632-635.
- Leibowitz K. L., Chang G. Q., Pamy P. S., Hill J. O., Gayles E. C., Leibowitz S. F. (2007) Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight. *Int. J. Obes.*, 31 (8), 1210-1221.
- Leibowitz S. F. (2005) Regulation and effects of hypothalamic galanin: relation to dietary fat, alcohol ingestion, circulating lipids and energy homeostasis. *Neuropeptides*, 39 (3), 327-332.
- Leibowitz S. F., Akabayashi A., Alexander J. T., Wang J. (1998a) Gonadal steroids and hypothalamic galanin and neuropeptide Y: role in eating behavior and body weight control in female rats. *Endocrinology*, 139 (4) 1771-1780.
- Leibowitz S. F., Akabayashi A., Wang J. (1998b) Obesity on a high-fat diet: role of hypothalamic galanin in neurons of the anterior paraventricular nucleus projecting to the median eminence. *J. Neurosci.*, 18, 2709-2719.
- Leibowitz S. F., Kim T. (1992) Impact of a galanin antagonist on exogenous galanin and natural patterns of fat ingestion. *Brain Res.*, 599, 148-152.
- Lerner J. T., Sankar R., Mazarati A. M. (2008) Galanin and epilepsy. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 1864-1871.
- LI-COR (1997): Model 4200 Operator's Manual; LI-COR Inc.; Biotechnology Division; 4308 Progressive Avenue; P.O.Box 4000, Lincoln, Nebraska 68504.
- LI-COR (1998): LI-COR 4200 Series Sequencing Manual, LI-COR Inc.; Biotechnology Division; 4308 Progressive Avenue; P.O.Box 4000, Lincoln, Nebraska 68504.
- Little S. (1995) Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *clinical molecular diagnostics*, Unit 9.8., 1-12.

- Loche S., Pintus S., Cella S. G., Boghen M., Vannelli S., Benso L., Müller E. E., Corda R., Pintor C. (1990) The effect of galanin on baseline and GHRH-induced growth hormone secretion in obese children. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 33 (2), 187-192.
- Löffert D., Karger S., Berkenkopf M., Seip N., Kang J. (1997) PCR optimization: primer design. *Qiagen News*, 5, 3-6.
- Lönnqvist F., Thöme A., Nilzell K., Hoffstedt J., Arner P., (1995) A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity. *J. Clin. Invest.* 95 (3) 923.
- Loos R. J., Lindgren C. M. *et al.* (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.*, 40 (6) 768-775.
- Lord G. M., Matarese G., Howard J. K., Baker R. J., Bloom S. R., Lechler R. I. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394 (6696), 897-901.
- Lorimer D. D., Benya R. V. (1996) Cloning and quantification of galanin-1 receptor expression by mucosal cells lining the human gastrointestinal tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 379-385.
- Lorinet A. M., Javoy-Agid F., Laburthe M., Amiranoff B. (1994) Galanin receptors in human hypothalamus: biochemical and structural analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, 269 (1), 59-64.
- Lu D., Willard D., Patel I. R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., Woychik R. P., Wilkison W. O., *et al* (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, 371, 799-802.
- Lu X., Barr A. M., Kinney J. W., Sanna P., Conti B., Behrens M. M., Bartfai T. (2005) A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 874-879.
- Luiten P. G., Horst G. J., Steffens A. B. (1987) The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol.*, 28, 1-54.
- Magenis R. E., Smith L., Nadeau J. H., Johnson K. R., Mountjoy K. G., Cone R. D. (1994) Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm. Genome*, 5, 503-508.
- Manson J. E., Willett W. C., Stampfer M. J. (1995) Body weight and mortality among women. *N. Engl. J. Med.*, 333, 677-685.
- Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., Mise H., Nishimura H., Yoshimasa Y., Tanaka I., Mori T., Nakao K. (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.*, 3 (9), 1029-1033.
- Melander T., Hokfelt T., Rokaeus A. (1986) Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 248, 475-517.
- Merchenthaler I., Lopez F. J., Negro-Villar A. (1993) Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog. Neurobiol.*, 40, 711-769.

- Milewicz A., Bidzinska B., Mikulski E., Demissie M., Tworowska U. (2000a) Influence of obesity and menopausal status on serum leptin, cholecystokinin, galanin and neuropeptide Y levels. *Gynecol. Endocrinol.*, 14, 196-203.
- Milewicz A., Mikulski E., Bidzinska B. (2000b) Plasma insulin, cholecystokinin, galanin, neuropeptide Y and leptin levels in obese women with and without type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24 (2), 152-153.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16, 1215.
- Mitsukawa K., Lu X., Bartfai T. (2008) Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cell Mol. Life Sci.*, 65, 1796-1805.
- Miyasaka K., Hosoya H., Sekime A., Ohta M., Amono H., Matsushita S., Suzuki K., Higuchi S., Funakoshi A. (2006) Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J. Neural. Transm.*, 113 (9), 1279-1285.
- Moll P. P., Burns T. L., Lauer R. M. (1991) The genetic and environmental sources of body mass index variability: the muscatine ponderosity family study. *Amer. J. Hum. Genet.*, 49, 1243-1255.
- Montague C. T., Farooqi I. S., Whitehead J. P., Soos M. A., Rau H., Wareham N. J., Sewter C. P., Digby J. E., Mohammed S. N., Hurst J. A., Cheetham C. H., Earley A. R., Barnett A. H., Prins J. B., O'Rahilly S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387 (6636), 903-908.
- Mullis K. B. (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4), 56-61, 64-5.
- Nacmias C., Ricca V., Tedde A., Mezzani B., Rotella C. M., Sorbi S. (1999) 5-HT_{2A} receptor gene polymorphisms in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Neurosci. Lett.*, 277, 134-136.
- Nagase H., Bray G. A., York D. A. (1996) Effect of galanin and enterostatin on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. *Brain Res.*, 709 (1), 44-50.
- Naggert J. K., Fricker L. D., Varlamov O., Nishina P. M., Rouille Y., Steiner D. F., Carroll R. J., Paigen B. J., Leiter E. H. (1995) Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.*, 10 (2), 135-142.
- Nicholl J., Kofler B., Sutherland G. R., Shine J., Iismaa T. P. (1995) Assignment of the gene encoding human galanin receptor (GALR) to 18q23 by in situ hybridization. *Genomics*, 30, 629-630.
- Norman R. A., Leibel R. L., Chung W. K., Power-Kehoe L., Chua Jr S. C., Knowler W. C., Thompson D. B., Bogardus C., Ravussin E. (1996) Absence of linkage of obesity and energy metabolism to markers flanking homologues of rodent obesity genes in Pima Indians. *Diabetes*, 45 (9), 1229-1232.
- Ormandy C. J., Lee C. S. L., Ormandy H. F., Fantl V., Shine J., Peters G., Sutherland R. L. (1998) Amplification, expression, and steroid regulation of the preprogalanin gene in human breast cancer. *Cancer Res.*, 58, 1353-1357.

- Parker E. M., Izzarelli D. G., Nowak H. P., Mahle C. D., Iben L. G., Wang J., Goldstein M. E. (1995) Cloning and characterization of the rat GALR1 galanin receptor from Rin14B insulinoma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 34, 179-189.
- Pelleymounter M. A., Cullen M. J., Baker M. B., Hecht R., Winters D., Boone T., Collins F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269 (5223), 540-543.
- Pépin M. C., Pothier F., Barden N. (1992) Impaired type II glucocorticoid receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature*, 235, 725-728.
- Pietilainen K. H., Kaprio J., Rissanen A., Winter T., Rimpela A., Viken R. J., Rose R. J. (1999) Distribution and heritability of BMI in Finish adolescents aged 16y and 17y: a study of 4884 twins and 2509 singletons. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 23, 107-115.
- Probst W. C., Snyder L. A., Schuster D. I., Brosius J., Sealfon S. C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell. Biol.*, 11, 1-20.
- QUIAGEN GmbH: Taq PCR Handbook 05/97, QUIAGEN GmbH, Max-Volmer-Str. 4, 40724 Hilden
- Rattan S. (1991) Role of galanin in the gut. *Gastroenterology*, 100, 1762-1768.
- Reed D., Ding R. Y., Xu W. Z., Green E. D., Price R. A. (1996) Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes*, 45 (5), 691-4.
- Remschmidt H. (2000) *Kinder- und Jugendpsychiatrie- Eine praktische Einführung. 3., neu bearb. und erw. Aufl.-Stuttgart; New York: Thieme*
- Rosenkranz K., Hinney A., Ziegler A., Hermann H., Fichter M., Mayer H., Siegfried W., Young J. K., Remschmidt H., Hebebrand J. (1998a) Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 4524-4527.
- Rosenkranz K., Hinney A., Ziegler A., Prittwitz v. S., Barth N., Roth H., Mayer H., Siegfried W., Lehmkuhl G., Poustka F., Schmidt M., Remschmidt H., Hebebrand J. (1998b) Screening for mutations in the neuropeptide Y Y5 receptor gene in cohorts belonging to different weight extremes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 22 (2), 157-63.
- Roth H., Hinney A., Ziegler A., Barth N., Gerber G., Stein K., Brömel T., Mayer H., Siegfried W., Schäfer H., Remschmidt H., Grzeschik K.-H., Hebebrand J. (1997) Further support for linkage of extreme obesity to the obese gene in a study group of obese children and adolescents. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 105, 341-344.
- Saar K., Geller F., Rüschenhoff F., Reis A., Friedel S., Schäuble N., Nürnberg P., Siegfried W., Goldschmidt H. P., Schäfer H., Ziegler A., Remschmidt H., Hinney A., Hebebrand J. (2003) Genome scan for childhood and adolescent obesity in German families. *Pediatrics*, 111 (2), 321-327
- Saar K., Mazarati A. M., Mahlapuu R., Hallnemo G., Soomets U., Kilk K., Hellberg S., Pooga M., Told B. R., Shi T. S., Hökfelt T., Wasterlain C., Bartfai T., Langel U. (2002) Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 7136-7141.

- Scanalytics (1999) ONE-Dscan User's Guide; Scanalytics Inc.; 8550 Lee Highway, Suite 400; Fairfax VA 22031-1515.
- Schäuble N., Reichwald K., Grassl W., Bechstein H., Müller H. C., Scherag A., Geller F., Utting M., Siegfried W., Goldschmidt H., Blundell J., Lawton C., Alam R., Whybrow S., Stubbs J., Platzer M., Hebebrand J., Hinney A. (2005) Human galanin (GAL) and galanin 1 receptor (GALR1) variations are not involved in fat intake and early onset obesity. *The Journal of Nutrition*, 135 (6), 1387-1392.
- Schimmel U (1990) PCR - Die Fußangeln einer Technik und die Wege zur Perfektionierung. Sonderdruck aus BioTec, Vogel Verlag und Druck KG, Würzburg.
- Schwartz M. W., Seeley R. J., Campfield L. A., Burn P., Baskin D. G. (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.*, 98 (5), 1101-1106.
- Sheffield V. C., Beck J. S., Kwitek A. E., Sandstrom D. W., Stone E. M. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16, 325-332.
- Sina M., Hinney A., Ziegler A., Neupert T., Mayer H., Siegfried W., Blum W. F., Remschmidt H., Hebebrand J. (1999) Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 65, 1501-1507.
- Siracusa L. D. (1994) The agouti gene: turned on to yellow. *Trends Genet.*, 10 (12), 423-428.
- Smith B. K., York D. A., Bray G. A. (1994) Chronic cerebroventricular galanin does not induce sustained hyperphagia or obesity. *Peptides*, 15 (7), 1267-1272.
- Smith K. E., Forray C., Walker M. W., Jones K. A., Tamm J. A., Bard J., Branchek T. A., Linemeyer D. L., Gerald C. (1997) Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J. Biol. Chem.*, 272, 24612-24616.
- Smith K. E., Walker M. W., Jones K. A., Artymyshyn R., Bard J., Borowsky B., Tamm J. A., Yao W. J., Vaysse P. J.-J., Branchek T. A., Gerald C., Jones K. A. (1998) Galanin GALR3 receptors: cloning and functional expression of rat and human receptors. *J. Biol. Chem.*, 273, 23321-23326.
- Son, J.H., Baker H., Park D. H., Joh T. H. (1994) Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons in a lethal neurodevelopmental mouse mutant, anorexia (anx). *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 25, 129-134.
- Sorensen T. I. A., Holst C., Stunkard A. J., Skovgaard L. T. (1992) Correlations of body mass index of adult adoptees and their biological and adoptive relatives. *Int. J. Obes.*, 16, 227-236.
- Sorensen T. I. A., Price R. A., Stunkard A. J., Schulsinger F. (1989) Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *Brit. Med. J.*, 298, 87-90.
- Stanley B. G., Leibowitz S. F. (1984) Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.*, 35, 2635-2642.
- Stephens T. W., Basinski M., Bristow P. K., Bue-Valleskey J. M., Burgett S. G., Craft L., Hale J., Hoffmann J., Hsiung H. M., Kriauciunas A., Mackellar W., Rosteck P. R., Schoner B.,

- Smith D., Tinsley F. C., Zhang X. Y., Helman M. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 377 (6549), 530-532.
- Strachan T. and Read A. P. (1996) *Human molecular genetics*. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Strober M., Freeman R., Lampert C., Diamond J., Kaye W. (2000) Controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence of shared liability and transmission of partial syndromes. *Am. J. Psychiatry*, 157, 393-401.
- Stryer, L. (1996) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 4. Aufl.
- Stunkard A. J., Harris J. R., Pedersen N. L., McClearn G. E. (1990) The body-mass index of twins who have been reared apart. *New Engl. J. Med.*, 322, 1483-1487.
- Stunkard A. J., Sorensen T. I. A., Hanis C., Teasdale T. W., Chakraborty R., Schull W. J., Schulsinger F. (1986) An adoption study of human obesity. *New. Eng. J. Med.*, 314, 193-198.
- Suefferlein T., Rozenfurt E. (1996) Galanin, neurotensin, and phorbol esters rapidly stimulate activation of mitogen-activated protein kinase in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 56, 5758-5764.
- Sullivan K. A., Shiao L. L., Cascieri M. A. (1997) Pharmacological characterization and tissue distribution of the human and rat GALR1 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233 (3), 823-828.
- Swanson C. J., Blackburn T. P., Zhang X., Zheng K., Xu Z. Q., Hokfelt T., Wolinsky T. D., Konkol M. J., Chen H., Zhong H., Walker M. W., Craig D. A., Gerald C. P., Branchek T. A. (2005) Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (GALR3) antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 17489-17494.
- Swanson L. W., Sawchenko P. E. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.*, 6, 269-324.
- Takaya K., Ogawa Y., Hiraoka J., Hosoda K., Yamori Y., Nakao K., Koletsky R. J. (1996) Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat. Genet.*, 14 (2), 130-131.
- Tartaglia L. A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G. J., Campfield L. A., Clark F. T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K. J., Smutko J. S., Mays G. G., Wolf E. A., Monroe C. A., Tepper R. I. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83 (7), 1263-1271.
- Tatemoto K., Rökaeus A., Jörnvall H., McDonald T., Mutt V. (1983) Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett*; 164, 124-128.
- Tempel D. L., Leibowitz S. F. (1990) Galanin inhibits insulin and corticosterone release after injection into the PVN. *Brain Res.*, 536, 353-357.
- Thompson D. B., Ravussin E., Bennett P. H., Bogardus C. (1997) Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese pima indians. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 675-679.

- Tiesjema B., la Fleur S. E., Luijendijk M. C., Brans M. A., Lin E. J., During M. J., Adan R. A. (2007) Viral mediated neuropeptide Y expression in the rat paraventricular nucleus results in obesity. *Obesity*, 15 (10), 2424-2435.
- Treasure J. (1991) Genes and the aetiology of eating disorders. In: McGuffin P., Murray R. (eds) *The new genetics of mental illness*. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, pp 198-211.
- Vaisse C., Clement K., Durand E., Hercberg S., Guy-Grand B., Froguel P. (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Invest.*, 106, 253-262.
- Vaisse C., Clement K., Guy-Grand B., Froguel P. (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet.*, 20, 113-114.
- Volkenandt M., Löhr M., Dicker A. P. (1990) Genamplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion. *Dtsch. med. Wschr.*, 115, 670-676.
- Walli R., Schäfer H., Morys-Wortmann C., Paetzold G., Nustede R., Schmidt W. E. (1994) Identification and biochemical characterization of the human brain galanin receptor. *J. Mol. Endocrinol.*, 13 (3), 347-356.
- Walston J., Silver K., Bogardus C., Knowler W. C., Celi F. S., Austin S., Manning B., Strosberg A. D., Stern M. P., Raben N., Sorkin J. D., Roth J., Shuldiner A. R. (1995) Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N. Engl. J. Med.*, 333, 343-347.
- Wang H. J., Geller F., Dempfle A., Schäuble N., Friedel S., Lichtner P., Fontenla-Horro F., Wudy S., Hagemann S., Gortner L., Huse K., Remschmidt H., Bettecken T., Meitinger T., Schäfer H., Hebebrand J., Hinney A. (2004) Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *89 (1)*, 157-162.
- Wang J., Akabayashi A., Yu H. J., Dourmashkin J., Alexander J. T., Silva I., Lighter J., Leibowitz S. F. (1998b) Hypothalamic galanin: control by signals of fat metabolism. *Brain Res.*, 804, 7-20.
- Wang J., Leibowitz K. L. (1997) Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Res.*, 777, 231-236.
- Wang S., Ghibaudi L., Hashemi T., He C., Strader C., Bayne M., Davis H., Hwa J. J. (1998a) The GALR2 galanin receptor mediates galanin-induced jejunal contraction, but not feeding behavior, in the rat: differentiation of central and peripheral effects of receptor subtype activation. *FEBS Lett.*, 434, 277-282.
- Warden C. H., Fisler J. S., Shoemaker S. M., Wen P. Z., Svenson K. L., Pace M. J., Lusis A. J. (1995) Identification of four chromosomal loci determining obesity in a multifactorial mouse model. *J. Clin. Invest.*, 95, 1545-1552.
- Widén E., Lehto M., Kanninen T., Walston J., Shuldiner A. R., Groop L. C. (1995) Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N. Engl. J. Med.*, 333, 348-351.

- Wirth A. (1997) Adipositas- Epidemiologie, Ätiologie, Folgekrankheiten, Therapie. Springer-Verlag.
- Wittchen H. U., Kessler R. C., Zhao S., Abelson J. (1995) Reliability and clinical validity of UMCIDI DSM-III-R generalized anxiety disorder. *J. Psychiatr. Res.*, 29, 95-110.
- Wynick D., Small C. J., Bacon A., Holmes F. E., Norman M., Ormandy C. J., Kilic E., Kerr N. C. H., Ghatei M., Talamantes F., Bloom S. R., Pachnis V. (1998) Galanin regulates prolactin release and lactotroph production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12671-12676.
- Yeo G. S., Farooqi I. S., Aminian S., Halsall D. J., Stanhope R. G., O'Rahilly S. (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.*, 20, 111-112.
- Yun R., Dourmashkin J. T., Hill J., Gayles E. C., Fried S. K., Leibowitz S. F. (2005) PVN galanin increases fat storage and promotes obesity by causing muscle to utilize carbohydrate more than fat. *Peptides*, 26 (11), 2265-2273.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 (6505), 425-432.
- Ziegler A., Hebebrand J., Gorg T., Rosenkranz K., Fichter M., Herpertz-Dahlmann B., Renschmidt H., Hinney A. (1999) Further lack of association between the 5-HT_{2A} gene promoter polymorphism and susceptibility to eating disorders and a meta-analysis pertaining to anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry*, 4, 410-412.
- Zini S., Roisin M. P., Langel U., Bartfai T., Ben-Ari Y. (1993) Galanin reduces release of endogenous excitatory aminoacids in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 245, 1-7.
- Zorrilla E. P., Brennan M., Sabino V., Lu X., Bartfai T. (2007) Galanin type 1 receptor knockout mice show altered responses to high-fat diet and glucose challenge. *Physiol. Behav.*, 91 (5), 479-485.

7 Anhang

Genomische Struktur der Exons 2 und 3 des *GALR1*-Gens

Exon 2 [nach Jacoby *et al.*, 1997]

```

1  tcaggtcctt aatcacttgc ataaaaagtt gaagaacatg tcaaagaagt ctgaagcatc
   V L N H L H K K L K N M S K K S E A S
61 caagaaaaag gtaatgatca caaatatata tatatatggtt acttttca
   K K K

```

Exon 3 [nach Jacoby *et al.*, 1997]

```

1   ctcatagaag tgactatttg gagcaaagtc cagcgctcct ccgagatgca ttgctgggtga
61  tacagctgcy gtgggtgaga tgcttgaaca gttttgctag tttaaaagtt acagtctcta
121 actttgtact tttctagttc catgacttga agcatacttc ctataatgca tttcacatat
181 atcacaaaat tattactatg gaaggtaatg acaggctctg gaaaagttaa gaacaaaatt
241 attatgggga gtgaagggtta acacttaaag cagatgtagt atccattttt gatctcatga
301 aaatatacat aaaattagct taggatgtat tttaaaatgc tggattcctt ttgtgttgta
361 atcaatgaat ttccttcctt cttcttctcc cttaccgect cctctctctc ctctctctcc
421 tcctcttctt cttttctaga ctgcacagac agttctgggtg gtgggtgtgg tgtttggaat
      T A Q T V L V V V V V F G I

```

T



```

481 ctcttggtg cgcaccaca tcatccatct ctgggctgag tttggagttt tcccgctgac
   S W L P H H I I H L W A E F G V F P L T

```

F

```

541 gccggcttcc ttcctcttca gaatcaccgc ccactgectg gcgtacagca attcctccgt
   P A S F L F R I T A H C L A Y S N S S V
601 gaatcctatc atttatgcat ttctctctga aaatttcagg aaggcctata aacaagtgtt
   N P I I Y A F L S E N F R K A Y K Q V F
661 caagtgtcac attcgcaaag attcacacct gagtgatact aaagaaaata aaagtcgaat
   K C H I R K D S H L S D T K E S K S R I
721 agacacccca ccatcaacca attgtactca tgtgtgataa aagatagagt atccttatgg
   D T P P S T N C T H V

```

```

781 ttgagtttcc atataagtgg accagacaca gaaacaaaca gaatgagcta gtaagcgatg
841 ctgcaacttg ttatcttaac aagaattcaa gtcgthttta ttaaatecca cgtgtgttaa
901 aaagtacttt gatccattta ggaaattcct aggtctagtg agaattatth ttcaatttta
961 ttttagttct aaattatggt tcagaaacaa aagacaatgc tgtacagttt tattctcttt
1021 cagacatgaa agggaacata tatattccat atatatgttc aactcttcat agattgtgaa
1081 ctggcccatc aatatgggtca ggaatatttg cagtctacat tttaaagcca atttatttag
1141 aaaaaaaatt tgagctttta ttcttttaatt ttaagagaag taatattgtg aactatgtat
1201 tttaaaatat gatcatggac acacaatgat gaattttttg gccatttaca tagacatatc
1261 tattaagtgg aaagaaggct ttctgaagtc tgtttgcaca ggtggcattt gcttccaatt
1321 gtagctagcg cacagagcct tggaagcctg tcattatgag atacagtcgg tttacctcag
1381 gagtcaattc agtgtttgtac tgggtgacct ggatgcagta gtaggcactg ttgattcaaa
1441 tttatcctgt gaaactggct ttatagagtt aacaaaacag agtcagagac cactgtctta

```

```
1501 acagtggaag atgcaaataa gtttttgaga ataaaactgg attttgaaat tttacattag
1561 tacttgacaa aagttttcat tttgccttga atggaaccta ctaaaaagag agatgaaaaa
1621 aaatcagcga ggttgatgta gataataatt tctatgggac caaagactag acagaattca
1681 gtaagtcaca tgaagtaatg gtcatgcctg tacataaagc atatttcattg tttgatttag
1741 atgacattca aaaaaaatca tgggactgaa tatacctggg gtatcctatc ttgtacaaat
1801 gcatgctttt tcattaaatt tgtaatgatg tttaatgaac atttccacca aacattattt
1861 cctctaaaaa tgtaatttg gggttaaaac catcaccatt tgaatttcaa atgtagtttt
1921 catgacaatt ttatattgat gtgtgtttac aatgagaaaa tggcatgaaa atattaaatt
1981 gtcttgtatc g
```

Polymorphismus -> t-Thymin, F-Phenylalanin

Wildtyp -> a-Alanin, I-Isoleucin

Die unterstrichenen Bereiche stellen die jeweiligen Exonsequenzen dar.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Baum, Beyer, Bolm, Christiansen, Czubayko, Daut, Engel, Geus, Göke, Görk Ch., Görk K., Gotzen, Gressner, Grimm, Griss, Habermehl, Happle, Hebebrand, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmer, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz, Maisch, Martin, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Renschmidt, Röhm, Rogausch, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneyer, Schreiber, Schulz, Schulze, Schüffel, Seifart, Slenczka, Steiniger, Stiletto, Sturm, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, v. Wichert

In Graz:

Dimai, Krejs

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Universität Duisburg-Essen, Herrn Prof. Dr. Johannes Hebebrand, für die Überlassung des interessanten Themas. Er unterstützte mich kontinuierlich bei der Durchführung der Arbeit und war jederzeit für Fragen offen.

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

Des weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Anke Hinney, Laborleiterin der Klinischen Forschergruppe, für ihre kompetente Beratung und konstruktive Kritik während der gesamten Dauer meiner Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. Helmut Schäfer und insbesondere PhD stud. Frank Geller aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg danke ich für ihre statistischen Auswertungen, Berechnungen und die Studie begleitenden Beratungen bezüglich des Studiendesigns.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen MitdotorandInnen Helen, Britta, Christine und Markus für die gegenseitige Hilfe und Motivation während der Labortätigkeit. Auch allen anderen MitarbeiterInnen möchte ich meinen Dank aussprechen für die Unterstützung, rege Diskussionsmöglichkeit und die jederzeit offene Beantwortung von Fragen.

Meinen Eltern Christina und Peter und meiner Schwester Ulrike möchte ich für die ständige Unterstützung vor, während und nach dem Studium danken. Besonderer Dank gebührt auch Daniela für den seelisch-moralischen Beistand und das unermüdliche und zeitaufwendige Korrekturlesen meines Manuskriptes, für ihre Geduld und fortwährende Ermutigung, die mir die Kraft zur Fertigstellung der vorliegenden Dissertation gab.

Außerordentlich möchte ich mich auch bei den beteiligten PatientInnen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.