

Aus dem Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde - Klinik für Psychiatrie und  
Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg

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

Klinische Forschergruppe, Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

## **Molekulargenetische Mutationsanalyse im Promoterbereich des *obese*-Gens bei Patientinnen mit Anorexia nervosa**

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

vorgelegt von

**Bert Fritz Kurt Mierke**

aus Osnabrück

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am  
03.04.2003  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:

Prof. Dr. B. Maisch

Referent:

Prof. Dr. J. Hebebrand

Correferent:

Priv.-Doz. Dr. J. Kunz

---

## ZUSAMMENFASSUNG

Anorexia nervosa (AN) ist eine Krankheit, die durch eine gestörte Körperwahrnehmung, krankhafte Angst vor dem Dickwerden, die Weigerung, ein weitgehend normales Körpergewicht aufrechtzuerhalten, und - bei Frauen - Amenorrhö gekennzeichnet ist.

Begleitet wird die ausgeprägte Gewichtsreduktion durch zahlreiche neuroendokrine und metabolische Veränderungen. Etwa 95% der Betroffenen mit dieser Störung sind weiblichen Geschlechts. Die AN beginnt meist in der Adoleszenz, gelegentlich früher und in seltenen Fällen erst im Erwachsenenalter. Es wurden Mortalitätsraten zwischen 10 und 20% berichtet. Die Lebenszeitprävalenz beträgt bei Frauen ca. 0,5-1%.

Die Ätiologie der AN ist unbekannt, doch scheinen soziale Faktoren eine Rolle zu spielen. Die Menschen in Zivilisationen sind von dem Wunsch durchdrungen, dünn zu sein, und Korpulenz wird als unattraktiv, ungesund und nicht erstrebenswert betrachtet. Etwa 80 bis 90% der Kinder in der Vorpubertät sind sich dieser Einstellung bewusst, und über 50% der Mädchen in der Vorpubertät machen eine Diät oder ergreifen Maßnahmen zur Gewichtskontrolle. Da jedoch nur ein geringer Prozentsatz eine Anorexia nervosa entwickelt, müssen noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien gaben erste Hinweise dafür, dass neben Umwelteinflüssen genetische Faktoren eine entscheidende Rolle in der Gewichtsregulation spielen. Die Regulation des Körpergewichtes ist ein komplexer Vorgang, der durch viele verschiedene periphere und zentrale Prozesse gesteuert wird. Zunehmende Erkenntnisse über die physiologischen Abläufe der Steuerung und Entwicklung des Körpergewichtes können Einblicke in die Pathologie der Gewichtsregulation eröffnen. Gegenstand dieser Arbeit ist es, den komplexen Phänotyp der Anorexia nervosa aus dem Blickwinkel einer gestörten Gewichtsregulation zu betrachten.

Die Modellvorstellung zur Gewichtsregulation haben sich gerade in jüngster Vergangenheit durch die Klonierung relevanter Gene fortentwickelt. Aus verschiedenen Tiermodellen monogen bedingter Adipositasformen ergaben sich Kandidatengene für die Gewichtsregulation des Menschen. Die Identifizierung und Klonierung des *obese*-Gens (Leptingen), eines dieser Kandidatengene, seines Produktes Leptin sowie dessen Rezeptoren erbrachten neue Erkenntnisse über die Gewichtsregulation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Promoterbereich des Leptingens untersucht, der für die Regulation der Genexpression zuständig ist, da Allelvariationen im Promoter zu einer unterschiedlichen Transkriptionsrate führen könnten. Das zur Verfügung stehende Kollektiv setzte sich aus an Anorexia nervosa leidenden Patientinnen und untergewichtigen Kontrollprobanden zusammen. Bei diesen Probanden wurden zwei Polymorphismen im Promoter des Leptingens untersucht: Der erste Polymorphismus wurde erstmals 1998 von Mammés et al. beschrieben und liegt an Position -2549 zum Leptingen. Ihm liegt ein Basenaustausch von C → A zugrunde. Dieser Basenaustausch liegt in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Hin* 6.1., welches somit zwar das Wildtypallel, nicht aber das mutierte Allel schneidet. Der Polymorphismus der Position -2549 wurde daher mittels DNA-Digestion untersucht. Der zweite Polymorphismus im Promoter des Leptingens wurde von der Klinischen Forschergruppe identifiziert und liegt an Position -1387 [Hinney et al., 1998]. Da der zugrundeliegende Basenaustausch (G → A) nicht in einer Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym liegt, kam hier eine andere Methode zur Anwendung: die Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA). Um eine mögliche Assoziation der Polymorphismen zum Phänotyp der Anorexia nervosa feststellen zu können, wurden die Allelverteilungen der Patientinnen mit AN mit der der Probanden verglichen (Fall-Kontrollstudie). Da Stratifikationsprobleme hierbei nicht auszuschließen sind, wurde für beide Polymorphismen zusätzlich ein „Transmission disequilibrium test“ (TDT) durchgeführt. Der Vergleich der Allelverteilungen bei Patientinnen mit Anorexia nervosa und untergewichtigen Probanden zeigte für beide Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede. Ebenso ergab der TDT in beiden Fällen kein Transmissionsungleichgewicht, so dass in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation von Allelen zweier Polymorphismen im Promoterbereich des Leptingens zum Phänotyp der Anorexia nervosa gefunden werden konnte.

Die hier untersuchten Polymorphismen des Leptin-Promoters kommen somit nicht als ursächlicher Faktor für die Entwicklung einer Anorexia nervosa in Frage.

Durch die Forschungen der letzten Jahre konnten viele Einblicke in die genetischen Grundlagen gewonnen werden, denen die Gewichtsregulation unterliegt. Die Komplexität des Regelkreises der Gewichtsregulation macht ein multifaktorielles polygenes Zusammenspiel wahrscheinlich, aus dem der Phänotyp des individuellen Körpergewichts resultiert. Die Ursache für Abweichungen vom Normalgewicht wie z. B. bei der Anorexia nervosa kann daher in Umweltfaktoren, verschiedenen Genveränderungen oder aber in der Kombination aus beiden liegen.

In der vorgelegten Arbeit wurde der Bogen von klinischen Aspekten bis zur Molekulargenetik gespannt. Die Verknüpfung von klinischen Fragestellungen mit biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungsansätzen ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Forschung zum Verständnis von Essstörungen. So ist es zu wünschen, dass auch weiterhin molekulargenetische Studien durch ihre Ergebnisse das Verständnis für die Krankheitsgruppe der Essstörungen erweitern. So könnten in Zukunft neue klinische Therapiekonzepte entwickelt werden.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
INHALTSVERZEICHNIS .....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1. Anorexia nervosa .....	1
1.1. Definition.....	1
1.2. Diagnostik und Klinik .....	1
1.3. Gewichtsaspekte der Anorexia nervosa .....	2
1.4. Epidemiologie .....	3
2. Molekulargenetische Befunde der Anorexia nervosa .....	4
2.1. Zwillings- und Familienstudien .....	4
3. Regulation des Körpergewichtes .....	6
3.1. Mausmodelle.....	7
3.2. Zentrale Mechanismen der Gewichtsregulation .....	7
3.2.1. Leptin.....	8
3.2.2. Dopamin .....	9
3.2.3. Neuropeptid Y.....	9
3.2.4. "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)" .....	10
3.2.5. Das Serotonerge System.....	11
3.2.6. Corticotropin Releasing Faktor und der CRF-Rezeptor.....	12

3.2.7. Das Pro-opiomelanocortin-System .....	12
3.2.8. Carboxypeptidase E Gen .....	13
3.2.9. Melanin-concentrating Hormon.....	14
3.2.10. Agouti related Protein .....	14
3.2.11. "Ciliary neurotrophic factor" Rezeptor .....	15
3.3. Periphere Mechanismen der Gewichtsregulation .....	15
3.3.1. Pankreas.....	16
3.3.2. Gastrointestinaltrakt .....	17
3.3.3. Nebennieren .....	18
3.3.4. Gonaden-Sexualhormone .....	19
3.3.5. Schilddrüse .....	20
3.3.6. "Uncoupling protein" .....	21
3.4. Kandidatengene.....	22
4. Identifizierung und Charakterisierung des <i>obese</i> -Kandidatengens (Leptingen). 24	
4.1. Das <i>obese</i> Gen-Produkt: Leptin.....	25
4.2. Der Leptinrezeptor .....	26
4.3. Untersuchungen auf Kopplung und Assoziation von Anorexia nervosa zum Leptingen .....	27
4.4. Leptin und Anorexia nervosa/ Stand der Forschung.....	29
4.5. Ziel der Arbeit.....	33
<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
1. Rekrutierung .....	35

2.	Chemikalien .....	36
2.1.	Puffer und Lösungen .....	37
2.1.1.	Puffer .....	37
2.1.2.	Sonstige Lösungen .....	39
2.2	Enzyme .....	41
2.3	Primer .....	41
3.	Geräte .....	42
4.	Methoden .....	43
4.1.	DNA-Extraktion.....	43
4.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	44
4.3.	Agarose-Gelelektrophorese .....	51
4.4.	Allgemeines Verfahren der Digestion.....	53
4.5.	Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA).....	54
5.	Statistische Auswertungen.....	57
6.	Ethikantrag.....	59
	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
1.	Untersuchung des Polymorphismus der Position <b>-2549</b> mittels DNA-Digestion.....	60
1.1.	PCR-Optimierung .....	60
1.2.	DNA-Digestion .....	60
1.3.	Genotyp- und Allelfrequenzen.....	61
1.4.	Transmission disequilibrium test .....	62



---

2.	Untersuchung des Polymorphismus der Position <b>-1387</b> mittels SSCA.....	63
2.1.	PCR-Optimierung .....	63
2.2.	SSCA-Optimierung .....	63
2.3.	Genotyp- und Allelfrequenzen.....	64
2.4.	Transmission disequilibrium test .....	65
	<b>DISKUSSION</b> .....	66
1.	Zusammenfassende Darstellung der bisherigen Erkenntnisse .....	66
2.	Darstellung der untersuchten Genabschnitte .....	68
3.	Ergebnisdiskussion .....	70
4.	Methodendiskussion.....	72
4.1.	PCR .....	72
4.2.	DNA-Digestion .....	72
4.3.	SSCA .....	73
5.	Statistische Auswertung .....	74
6.	Anorexia nervosa ein genetisch determiniertes Gewichtsextrem? .....	75
	LITERATURVERZEICHNIS.....	77
	LEBENS LAUF.....	90
	VERZEICHNISS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....	91
	DANKSAGUNGEN .....	92
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	93

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ACTH	Adrenokorticotropes Hormon
Ag	Argentum (Silber)
Ala	Alanin
AN	Anorexia Nervosa
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest:	Destilliertes Wasser
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
Asn	Asparagin
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines-Serum-Albumin
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C/EBP	CAT-enhancer-binding protein
cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CCK	Cholecystokinin
cDNA	copy Desoxyribonucleid-Acid
Cl	Chlorid
CLIP	Corticotropin like intermediate lobe peptide
Cm	Zentimeter
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CPE	Carboxypeptidase
CRE	cAMP response element
CRF	Corticotropes-Releasing-Faktor
CSGE	Conformation sensitive gel electrophoresis
CTP	Cytidin-tri-phosphat
d	Tag
db	Diabetis
ddNTP	Didesoxynucleotid
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribo-Nucleid-Acid
E	Extinction
EDTA	Ethylene diamin tetraacetic acid
et al.	und Mitarbeiter
F	forward-primer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Guanin
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
Gluc	Glukose
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure

HVL	Hypophysenvorderlappen
K	Kalium
Kg	Kilogramm
kp	Kilobasen
5-HT	5- Hydroxytryptamin/ Serotonin
ICD 10	International Classification of Diseases Auflage 10
l	Liter
Leu	Leucin
LH	Luteinisierendes Hormon
LPH	Lipotropes-Hormon
LPL	Lipo-Protein-Lipase
Lys	Lysin
m	milli
M	molare Lösung
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
Mb	Megabasen
MC	Melano-Cortin
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	Melanin-concentrating hormon
Met	Methionin
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mol	6,023 x 10 <sup>23</sup> Teilchen
Mrd.	Milliarden
m-RNA	messenger-Ribo-Nucleid-Acid
MSH	Melanozyten-stimulierendes-Hormon
NCHS	National Center for Health Statistics
NHANES	The National Health and Nutrition Examination Survey
nm	Nanometer
NPY	Neuropeptid Y
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
n.t.	nicht typisiert
NVS	Nationale-Verzehr-Studie
ob	obese
Ob-R	obese-Rezeptor
p	pico
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PC-1	POMC-Carboxypeptidase 1
PEG	Polyethyleneglycol
ph	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phanylalanin
POMC	Pro-opiomelanocortin
Pro	Prolin
QTL	Quantitative Trait Locus
R	reverse-primer
RCLP	red cell lysis buffer
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodiumdodecylsulphat
SE	NaCl, Na <sub>2</sub> EDTA
Ser	Serin
SSCA	Single-stranded-conformation-analysis
t	Zeit
T	Thymin, Thrombozyten
T <sub>3</sub>	Tri-jod-thyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TAE	Tris-Acetyl-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TDT	transmission disequilibrium test
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIID	transcription factor class II genes
TRH	Thyroxin-releasing-hormon
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
u.s.w.	und so weiter
UV	Ultra-Violett
V	Volt
Val	Valin
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales-Nerven-System
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
	unendlich
®	führt zu

---

## **EINLEITUNG**

### **1. Anorexia nervosa**

#### **1.1. Definition**

Die Anorexia Nervosa ist eine Essstörung, die durch Untergewicht, spezifische psychopathologische Auffälligkeiten und (bei Frauen) primäre oder sekundäre Amenorrhoe charakterisiert ist [American Psychiatric Association, 1994].

#### **1.2. Diagnostik und Klinik**

Psychopathologisch vorherrschende Auffälligkeit der Anorexia nervosa ist die Nahrungsverweigerung aus Angst vor Gewichtszunahme bei gestörter Wahrnehmung des eigenen Körpers und Krankheitsverleugnung.

Um die Diagnose Anorexia nervosa zu rechtfertigen und um sie von anderen Essstörungen abgrenzen zu können, müssen verschiedene Kriterien erfüllt sein. Diese Kriterien werden u.a. in der vierten Auflage des Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders– kurz **DSM-IV** –erläutert.

- 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).
- B** Ausgeprägte Angst vor einer Gewichtszunahme oder davor, dick zu werden, trotz des 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 Körpergewichts.
- D** Bei postmenarchalen Frauen das Vorliegen einer sekundären Amenorrhoe, d.h. das Ausbleiben von mindestens drei aufeinanderfolgenden Menstruationszyklen

Ergänzend zu den vier Hauptkriterien können noch zwei weitere Subtypen der Anorexia nervosa unterschieden werden. Beim **restriktiven Typ** bestimmen Fasten, Diäten und gesteigerte körperliche Aktivität das klinische Bild. Der **bulimische Typ** äußert sich darüberhinaus durch rezidivierende Essattacken, in deren Anschluss häufig durch selbstinduziertes Erbrechen der Magen wieder entleert wird. Hier findet man zusätzlich häufig einen Laxantien- und Diuretikaabusus.

Klinisch fallen bei der Anorexia nervosa die familiär gehäuft vorkommenden psychopathologischen Symptome wie Depressionen und zwanghafte Persönlichkeitsstörungen auf [Hudson et al., 1983]. Oftmals liegt bereits vor Diagnosestellung eine perfektionistische oder ängstliche Persönlichkeitsstruktur vor.

In diesem Zusammenhang muss kritisch angemerkt werden, ob im Zuge der Semistarvation einzelne Auffälligkeiten nicht auch als organisch bedingt zu werten sind, da dass zunehmende Untergewicht auch gravierende körperliche Veränderungen nach sich zieht. Neben der Kachexie kommen häufig bradykarde Herzrhythmusstörungen (Haupttodesursache), art. Hypotension, Krampfleiden, Sinterungsfrakturen, Ödeme, Hypothermie und wieder einsetzende Lanugobehaarung vor. Mitverantwortlich für diese körperlichen Befunde sind die zahlreichen endokrinologisch-metabolischen Veränderungen, wie die Elektrolytentgleisung mit Hypo-kali-natri-calcämien, Leukopenien, Leberenzymerrhöhung und die Verschiebung der hormonellen Homöostase mit niedrigen Gonadotropin-, Östrogen-, Thyroxinwerten und einem Hypercortisolismus [Fauci et al.,1998].

### 1.3. Gewichtsaspekte der Anorexia nervosa

Da das exzessive Untergewicht (Kachexie) bei Patienten mit AN eine Reihe von klinisch relevanten somatischen Veränderungen bedingt, ist es wichtig, auf das Kriterium Gewicht gesondert einzugehen. Das Ausmaß des Untergewichtes bestimmt nicht zuletzt die Lebenserwartung der Patienten, da die Erkrankung mit der höchsten Mortalität aller psychiatrischen Störungen einhergeht [Stoving et al., 1999].

Um das Individualgewicht zu klassifizieren und in Bezug zur „Norm“ zu bewerten, bedient sich die moderne Gewichtsforschung des BMIs. Der auch als *Quetelet- Index* bekannte **Body-Mass-Index** (Körpergewicht in kg / Körpergröße in m<sup>2</sup>) weist eine hohe Korrelation zum Körpergewicht und eine niedrige zur Körperlänge auf. Zur Erlangung für Geschlecht und Alter bereinigter Werte existieren **BMI-Altersperzentile**, die sich

für Deutschland aus anthropometrischen Daten der Nationalen Verzehrstudie (NVS) rekrutieren [Hammer et al.,1991; Hebebrand et al., 1994]. Die Altersperzentile sind hilfreich, um das Ausmaß an Untergewicht beurteilen zu können, indem das Gewicht der Patientinnen in Bezug zur Normalverteilung der entsprechenden Alterspopulation gesetzt wird. Auf diese Weise lässt sich das individuelle Gewicht anhand der Altersperzentile zu jedem Krankheitszeitpunkt epidemiologisch einordnen und realistische Zielgewichte im Rahmen der Behandlung planen. Das DSM-IV Gewichtskriterium entspricht für beide Geschlechter BMI-Werten zwischen der fünften und zehnten Altersperzentile [Hebebrand et al., 1996]. So können, ermöglicht durch das Perzentil, bessere Aussagen über das Zielgewicht und die Gewichtsprognose des Einzelnen gemacht werden. Studien zeigen, dass mehr chronische Krankheitsverläufe mit Todesfolge auftreten, je niedriger der Aufnahme-BMI-Wert ist. Offenbar verschlechtert sich die Gewichtsprognose bei BMI-Einlieferungs-Werten von unter **13 kg/m<sup>2</sup>** [Hebebrand et al., 1996].

Daten aus fünf Katamnesestudien unterstreichen eindrucksvoll die Bedeutung des Gewichtes im Rahmen der Anorexia nervosa, indem belegt wurde, dass systematische Zusammenhänge zwischen prämorbidem BMI, Akutstadium-BMI und Katamnese-BMI existieren [Hebebrand et al.,1996,1997; Coners et al., 1999]. Der Gewichtsverlauf mit seinen Schwankungen vor Aufnahme und im Verlauf der Essstörung ist somit nicht nur klinisch, sondern auch diagnostisch einer der wichtigsten Parameter für den Krankheitsverlauf der Anorexia Nervosa.

### **1.4. Epidemiologie**

Aus epidemiologischer Sicht ist die Anorexia eine Erkrankung des frühen Erwachsenenalters vor allem bei Frauen. Mit einer Prävalenz von 0,5-1% erkranken Frauen ca. 10-15 mal häufiger als Männer. Das Durchschnittsalter bei Krankheitsbeginn beträgt 14-15 Jahre, wobei auf zwei Inzidenzgipfel im 14. und 18. Lebensjahr hinzuweisen ist. Der Krankheitsverlauf ist individuell sehr unterschiedlich und muss im Kontext des Alters, des Gewichtes bzw. der gesamten psychosozialen Situation beurteilt werden. Im Durchschnitt findet sich eine Langzeitmortalität von ca. 10%. Familiäre Häufungen der Anorexia nervosa lassen auf genetische Einflüsse der Erkrankungsgenese schließen. [Herpetz-Dahlmann et al. 2001; Steinhausen, 2002].

## 2. Molekulargenetische Befunde der Anorexia nervosa

Die weitverbreitete Meinung, Magersucht wäre eine „psychosoziale Folge“ der modernen westlichen Industrienationen mit ihren Lebensgewohnheiten und ihren Schönheitsidealen, ist nach heutigem Wissen nicht mehr haltbar. So belegen historische Aufzeichnungen, dass bereits im Mittelalter Frauen existierten, die als sogenannte „**Fastenheilige**“ verehrt wurden, da sie die regelmäßige Nahrungsaufnahme verweigerten, und aus heutiger Sicht wahrscheinlich die meisten der Diagnosekriterien einer Anorexia nervosa erfüllen würden [Vanderedycken et al., 1990]. Desweiteren belegen Inzidenzstudien, dass das Auftreten der Anorexia nervosa nicht endemisch gehäuft oder gekoppelt an Ästhetikpräferenzen vorkommt [Hoeck et al., 1998]. Sowohl Zwillings- als auch Familienstudien legen die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entstehung einer Anorexia nervosa nahe [Hebebrand und Remschmidt, 1995; Hebebrand et al., 1996]. Laut Stunkard und Mitarbeitern [1990] liegt die Heritabilität für diese Essstörung bei ca. 0,7-0,8.

### 2.1. Zwillings- und Familienstudien

Adoptions- und Familienstudien, die unter dem Aspekt der Gewichtsextreme die Heritabilität des BMI untersuchten, sprechen für eine erhebliche Mitbeteiligung genetischer Faktoren an der Gewichtsentwicklung [Stunkard et al., 1986; Sorensen, 1989, 1992; Teasdale, 1990].

Die Tatsache, dass erstgradige Verwandte von Patientinnen mit AN im Vergleich zu Kontrollfamilien ein fünfmal höheres Erkrankungsrisiko aufweisen, ist ein Indiz für die genetische Disposition in der Krankheitsgenese [Strober et al., 1985]. Um annähernd auszuschließen, dass ähnliche Umwelteinflüsse und erlernte Lebensgewohnheiten zu dieser familiären Häufung führen, bieten sich Zwillingsstudien an.

Holland und Mitarbeiter untersuchten in diesem Zusammenhang Zwillingspaare, die, unabhängig ob mono- oder dizygot, in gleicher Umgebung aufwuchsen. Sie fanden höhere **Konkordanzraten** (beide Zwillinge eines Paares sind Krankheitsträger) bei den monozygoten (65%) als bei den dizygoten Paaren (5%), ein solcher Unterschied ließ sich am ehesten genetisch und nicht durch Umweltfaktoren erklären [Holland et al., 1984; Hewitt et al., 1991].

1990 analysierten Stunkard und Mitarbeiter den BMI einer großen Stichprobe von



getrennt und gemeinsam aufgewachsenen monozygoten Zwillingspaare aus Schweden. Die Zwillingspaare, die gemeinsam aufgewachsen und somit den gleichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren, ähnelten sich in der Gewichtsentwicklung nicht mehr als die bereits in früher Kindheit getrennt aufgewachsenen Paare. Stunkard ging von einer **Heritabilität** (Intrapaarkorrelation der getrennt aufgewachsenen Zwillingspaare) von 0.66 bei weiblichen Zwillingen bzw. von 0.7 bei männlichen Zwillingen aus. Das gemeinsame Aufwachsen hatte somit keinen größeren Einfluss auf den BMI bei monozygoten Zwillingspaaren, ebensowenig der Zeitabstand zwischen Geburt und Trennung der Zwillinge [Stunkard et al., 1990].

Die genetische Mitbeteiligung an der Krankheitsgenese der Anorexia nervosa ist aus wissenschaftlicher Sicht sehr wahrscheinlich. In welchem Ausmaß und auf welche Weise sie sich manifestiert, bleibt Gegenstand heutiger Forschung. Denkbar wäre eine genetische (familiäre) Disposition zu bestimmten Verhaltens-, Bewegungs- und Nahrungsgewohnheiten. Auch mono- oder polygene Variablen, die die Stoffwechselkonstellation und die Energiehomöostase unterschiedlich beeinflussen, scheinen plausibel.

Hintergrund dieser Arbeit ist deshalb der wissenschaftliche Ansatz, die Krankheit Magersucht als Abweichung von der „normalen“ Gewichtsregulation zu verstehen. Voraussetzungen hierfür sind die Zusammenhänge der Gewichtsregulation zu kennen und die bisherigen Erkenntnisse zu erweitern.

### 3. Regulation des Körpergewichtes

Das Körpergewicht als Resultierende aus Energieaufnahme, Sättigung, Thermogenese und körperlichem Aktivitätsniveau ist erstaunlich konstant reguliert. Obwohl ein gesunder Erwachsener pro Jahr etwa vier Gigajoule mit der Nahrung zu sich nimmt, resultiert im Schnitt lediglich eine Gewichtszunahme von 100 bis 400 Gramm [Hebebrand et al., 1996]. Das Körpergewicht wird dabei maßgeblich von Geschlecht, Alter und Körperlänge bestimmt. Selbst bei stark über- und untergewichtigen Personen scheint das Körpergewicht konstant reguliert zu werden. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass eine Art von individuellem **Sollwert (set-point)** für die Fettspeicher und damit ebenfalls für das Körpergewicht existieren müsse (**Lipostat-Theorie**). Unbestritten ist, dass Verhaltensweisen und Umwelteinflüsse ebenfalls das Körpergewicht beeinflussen. **Anorexia nervosa** Patientinnen sind scheinbar kraft ihres Willens in der Lage, einen Nährstoffmangel zu tolerieren, der zwingend in einer Gewichtsabnahme mündet. Demgegenüber steht die Erfahrung, dass dauerhafte Gewichtsänderungen, z.B. durch Diäten oder Verhaltensänderungen, in der Mehrzahl der Fälle mit frustrierenden Resultaten verbunden sind. Zum überwiegenden Teil pendelte sich nach drei bis vier Jahren das Ursprungsgewicht wieder ein [Gortmaker et al., 1987].

Diese Befunde machen die Komplexität der Körpergewichtsregulation deutlich und führen gleichzeitig zu der Forderung nach wissenschaftlich fundierten Erkenntnissen. Erst das Verständnis der physiologischen Mechanismen der Gewichtsregulation erlaubt die Beurteilung der Pathophysiologie. Formalgenetische Studien (siehe oben) unterstreichen die Bedeutung des Genotyps für die Gewichtsregulation. Grundsätzlich müssen **kurzfristige** von **langfristigen** und **periphere** von **zentralen** Regelkreisen zur Aufrechterhaltung der Gewichtshomöostase unterschieden werden.

**Monogen** bedingte Störungen der Gewichtsregulation bei Mäusen stießen in den siebziger Jahren die Forschung auf diesem Gebiet an. Heute wird mit modernen **molekularbiologischen**- und **gentechnologischen** Verfahren versucht, sich den Hintergründen der Gewichtsregulation und ihrer Pathologie zu nähern.

### 3.1. Mausmodelle

**Monogene Tiermodelle** haben in entschiedenem Maße zum pathogenetischen Verständnis von Gewichtsregulationsstörungen in den letzten Jahrzehnten beigetragen. Gewicht und Fettverteilung verschiedener Haustiere lassen sich durch kontrolliertes Züchten in erheblichem Umfang beeinflussen [Burniat et al.,1992].

Zusätzlich ist es in **Tierversuchen** möglich, bestimmte Gene von Tieren mittels ´gene targeting` auszuschalten und somit sogenannte „**Knock-out**“-Tiere heranzuzüchten. Hierfür werden in der modernen Gewichtsforschung vorzugsweise Ratten und Mäuse als Tiermodelle ausgewählt. Aufgrund der bekannten **Homologie** zwischen Mäusegenom und menschlichem Genom kann bei im Mäusegenom lokalisierten Genen auf die mutmaßliche Lokalisation des Gens im menschlichen Organismus geschlossen werden. Diese Regionen können dann im weiteren mit Hilfe verschiedener molekulargenetischer Methoden untersucht werden [Hebebrand et al., 1995].

### 3.2. Zentrale Mechanismen der Gewichtsregulation

Die Hypothalamusbasis kontrolliert die Aufrechterhaltung eines stabilen Körpergewichts. Mehrere Bereiche des Hypothalamus sind an Hunger und Sättigung beteiligt. Durch Tierversuche konnte gezeigt werden, dass der **Nucleus ventromedialis** an der Sättigung beteiligt ist und dass ein Hunger-Zentrum im **lateralen Hypothalamus** existiert [Brobeck et al.,1943; Anand et al., 1951].

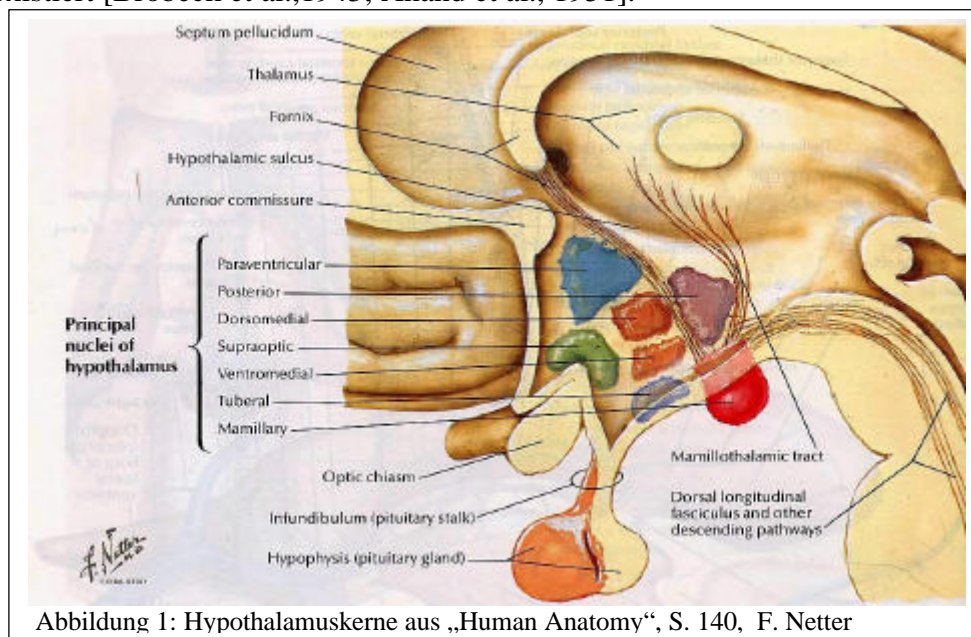


Abbildung 1: Hypothalamuskern aus „Human Anatomy“, S. 140, F. Netter

Eine hypothalamische Adipositas steht beim Menschen meist in Verbindung mit Veränderungen in der Umgebung des Nucleus ventromedialis; diese Art der Adipositas scheint die Festsetzung eines neuen Sollwertes zu umfassen (set-point Theorie). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene andere Hirnregionen, wie z. B. der **Nucleus arcuatus** (Bildungsort von Pro-opio-melanocortin) an der Gewichtsregulation beteiligt sind [Tartaglia et al., 1995]. Nicht alle Transmitter und organischen Strukturen, die miteinander interagieren, sind bis heute bekannt. So wird der **Appetit** von der  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), von Dopamin,  $\beta$ -Endorphin, Enkephalin und dem Neuropeptid Y stimuliert, andererseits durch Serotonin, Noradrenalin, Cholecystokinin, Neurotensin, Thyroxin releasing Hormon (TRH), Somatostatin und durch das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) gehemmt. Die exakten Regelkreise und Einflussgrößen sind nur zum Teil bekannt und Gegenstand heutiger Forschung.

In den vergangenen Jahren sind diese zentralen Mechanismen verstärkt ins Blickfeld der modernen Gewichtsforschung geraten. Relevante **Kandidatengene**, die ebenso teilweise peripher exprimiert werden, sollen nachfolgend vorgestellt werden.

### 3.2.1. Leptin

Bereits 1969 postulierten Coleman et al. auf der Basis von **Parabiose-Versuchen** mit adipösen Mäusen (Blutkreislaufkopplung zwischen gesunden und übergewichtigen Mäusen) die Existenz eines **löslichen Sättigungsfaktors**. Erst 26 Jahre später gelang mit der Klonierung und Charakterisierung des *obese*-Gens und seines Genproduktes **Leptin** (leptos: griech. dünn) die Identifizierung dieses Regulatormoleküls [Zhang et al., 1994; Halaas et al., 1995; Spitzweg et al., 1996]. Die Ergebnisse bestätigten die **Lipostat-Theorie**, in der von einem hormonellen Regelkreis zwischen Fettgewebe und Gehirn ausgegangen worden war [Hinney et al., 1997]. Die Höhe des im Serum enthaltenen Peptidhormons Leptin signalisiert dem zentralen Nervensystem den jeweiligen Füllungsgrad der Fettspeicher.

Seit seiner Klonierung hat sich Leptin schnell auf die vorderste Reihe als wichtiges Regulatorhormon zur Aufrechterhaltung der **Energiehomöostase** geschoben. Es schließt eine Rückkopplungsschleife vom Fettgewebe zum **hypothalamischen-neuronalen Schaltkreis**, der die Regelung von Energieaufnahme und -verbrauch durch die neuroendokrine-vegetative Efferenz steuert. Ansteigende zentrale Leptinspiegel signalisieren hypothalamischen Neuronen, die Corticotropin und Melanocortin

synthetisieren, die beiden Tropine zu sezernieren. Nachfolgend führen die leptinvermittelten anorexigenen und metabolischen Effekte zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme und Erhöhung der Thermogenese. Darüber hinaus führt Leptin im ZNS über eine **Aktivierung des sympathischen Nervensystems** (über neuropeptiderge efferente Bahnen) zu einer Lipolyse des peripheren Fettgewebes und u.a. zur Sättigung [Haynes et al.,1997].

### 3.2.2. Dopamin

Dem dopaminergen System wurde bereits 1976 eine Mitbeteiligung an der Entstehung einer Anorexia nervosa nahegelegt [Barry und Klawans et al., 1976].

Dopamin-defiziente (knock-out) Mäuse zeigten postpartal eine extreme Hypoaktivität und einen Stopp der Nahrungsaufnahme [Zhou und Palmiter, 1995]. Erfahrungen aus der Therapie mit Neuroleptika zeigten ebenfalls den Einfluss des dopaminergen Systems beim Menschen auf. Neuroleptika blockieren Dopaminrezeptoren und reduzieren die dopaminerge Überaktivität. Haloperidol blockiert vor allem D2- und D3-Rezeptoren (hohe Affinität) und D4-Rezeptoren (geringe Affinität) in mesokortikalen Regionen, was für den antipsychotischen Effekt verantwortlich ist. Clozapin hat eine Affinität für D4- und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren. Patienten, die Clozapin als antipsychotische Therapie erhielten, wiesen gehäuft eine Gewichtszunahme durch gesteigerte Nahrungszufuhr und damit verbunden ansteigende Leptinserumwerte auf [Bromel et al., 1998].

### 3.2.3. Neuropeptid Y

Im Regelkreis von Hunger und Sättigung spielt im Hypothalamus Neuropeptid Y eine zentrale Rolle. Als ein Bildungsort von Neuropeptid Y konnte der **Nucleus arcuatus** identifiziert werden, dessen Axone teilweise im Nucleus paraventricularis enden [O'Donohue et al., 1982; Gerald et al., 1996]. Applikationen von Neuropeptid Y in diesem Bereich, in dem die spezifischen Rezeptoren (Y1 und Y5) vorkommen, führen durch eine Reduzierung der Thermogenese, Erhöhung der Lipoprotein-Lipase und einer Stimulation der Insulin- und Glukokortikoid-Sekretion [Moltz et al., 1985; Albers et al., 1990] zu einer positiven Energiebilanz und einem **Anstieg der Fettspeicher** [Stanley et al., 1986]. Gruppen um Lewis und Smith (1993) konnten zeigen, dass an gesunden Probanden die Konzentration von NPY in Situationen des Gewichtverlustes, wie z. B.

beim Fasten, Stillen und körperlicher Anstrengung erhöht ist. Bei Gewichtsverlust oder fehlender Leptin-Produktion bei *ob/ob*-Mäusen ist die Leptin-Konzentration erniedrigt, was zu einer Aktivierung der NPY-Produktion im Nucleus arcuatus führt. Somit lässt sich ein **hormoneller Regelkreis** konstruieren, in dem periphere Hormone (z.B. Insulin und Leptin) dem zentralen Regler (Hypothalamus) den Ist-Wert über die Regelgröße (Körpergewicht) signalisieren und der Regler so mit Hilfe von Stellgliedern (z. B. NPY, CRH) korrigierend Einfluss nehmen kann, um den Soll-Wert zu erreichen. Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse, dass die NPY Expression durch einen negativen Feedback-Mechanismus von Leptin und Insulin inhibiert wird [Flier et al., 1997; Schwartz et al., 1997, 2000]. Es konnten Leptinrezeptoren auf der Oberfläche von NPY-produzierenden Neuronen im Hypothalamus nachgewiesen werden [Baskin et al., 1999]. Leptin hat dabei eine hemmende Wirkung auf die Synthese und Sekretion von NPY, womit die Reduzierung des Appetits, die gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems sowie der gesteigerte Energieumsatz erklärt werden [Stephens et al., 1995; Schwartz et al., 1997].

Diese Tatsache wird auch durch eine Studie an *knock-out* Mäusen gestützt, die zusätzlich NPY defizient waren (NPY<sup>-/-</sup>, *ob/ob*). Bei diesen Versuchstieren zeigte sich eine erheblich abgeschwächte Hyperphagie und Adipositas, obwohl kein Leptin produziert wurde [Erickson et al., 1996] .

#### **3.2.4. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)**

Kristensen et al. zeigten 1998, dass CART, ein im ZNS von Säugetieren lokalisiertes anorektisch wirkendes Peptid, eng mit Leptin korrespondiert. CART scheint bei Mäusen als ein leptinabhängiger Sättigungsfaktor zu fungieren. Rekombinantes Leptin peripher injiziert stimuliert die CART-mRNA Expression im Nucleus arcuatus [Thim et al. 1998]. Bei leptindefizienten Mäusen kann keine CART-mRNA im Hypothalamus nachgewiesen werden. Intracerebrovaskulär injiziertes CART Peptid führte sowohl bei fastenden (untergewichtigen) als auch bei normal ernährten Mäusen zu einem Nahrungsaufnahmestopp und zu einem Block des Hungermediators Neuropeptid Y.

### 3.2.5. Das Serotonerge System

**5-Hydroxytryptamin** (Serotonin) gehört zur Gruppe der biogenen Amine und beeinflusst als periphere (siehe 3.3.) und zentrale Mediatorsubstanz die Nahrungsaufnahme. Im ZNS nimmt Serotonin als Neurotransmitter durch komplexe Projektionen Einfluss auf Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus, respiratorische Aktivität, **Nahrungsaufnahme**, Schmerzwahrnehmung, Sexualtrieb und **Körpertemperatur**; ein Mangel wird als wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung von **Depression** diskutiert [e.g. Halford und Blundell, 2000]. Therapeutisch- pharmakologische Verwendung finden **serotoninagonistische** Substanzen als Antidepressiva (Serotoninwiederaufnahme-Hemmer), Anxiolytika (z.B. Buspiron®), bei Migräne (z.B. Sumatriptan®), als Prokinetika (z.B. Cisaprid®) und als **Appetitzügler** (z.B. Reductil®); **serotoninantagonistische** Wirkstoffe kommen zum Einsatz als Antiemetika (z.B. Ondansetron®) und bei Migräne (z.B. Methysergid®).

**Tierexperimentelle Studien** demonstrieren die Bedeutung von Serotonin bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. So konnten Haleem und Haider 1996 zeigen, dass 5-HT Mikroinjektionen in Hypothalamusregionen von Mäusen zu reduzierter Nahrungsaufnahme führen. Adipöse wiesen im **Liquor cerebrospinalis** erniedrigte Spiegel des Hauptmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure auf [Björntorp et al., 1984]. Umgekehrt zeigten Patientinnen mit AN deutlich erhöhte Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe [Kaye et al., 1990, 1991]. Aus der antidepressiven Therapie beim Menschen war bekannt, dass Serotoninwiederaufnahme-Hemmer und Agonisten einen Gewichtsverlust bewirken können [Ayuso-Gutierrez et al., 1994]. Zusammenfassend wurde bewiesen, dass Substanzen, die die postsynaptische Rezeptoraktivität erhöhen, zur Gewichtsabnahme führen und im Gegensatz hierzu eine Rezeptorblockade eine gesteigerte Nahrungsaufnahme nach sich zieht [Blundell et al., 1992].

Reguliert wird das serotonerge System durch die Tryptophan-Hydroxylase, Aminooxidasen, den 5-HT-Transporter und die verschiedenen Rezeptortypen. Gerade die Entdeckungen von zahlreichen **5-HT-Rezeptorsubtypen** und ihrer Expressionsloci haben die Forschung auf diesem Gebiet intensiviert. In jüngster Vergangenheit durchgeführte Studien beschrieben eine Assoziation zwischen dem -1438 A-Allel des G zu A Polymorphismus des Promoterbereichs des 5-HT<sub>2a</sub> Rezeptors und der Anorexia nervosa [Collier et al., 1997; Enoch et al., 1998]. Wiederum drei andere Untersuchungen konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen [Hinney et al., 1997, 1999].

### 3.2.6. Corticotropin Releasing Faktor und der CRF-Rezeptor

Das Neuropeptid Corticotropin-Releasing Faktor wird im Nucleus paraventricularis synthetisiert und stimuliert die Expression von **Pro-opiomelanocortin** [Dallmann et al., 1993]. Derivate des POMC sind neben Adrenocorticotropin,  $\beta$ -Endorphin, Lipotropinen auch verschiedene Melanocortine (siehe unten). CRF bewirkt im zentralen Nervensystem eine **Appetitminderung** und ist ebenso an physiologischen Reaktionen bei Stress und Krankheit beteiligt [Rothwell et al., 1996; Spina et al., 1996]. Bindung von CRF erfolgt an den G-Protein gekoppelten Rezeptoren CRF<sub>1R</sub> und CRF<sub>2R</sub>. Durch Leptingabe wird die CRH-Sekretion gesteigert, durch Glucocorticoidgabe verringert [Mercer et al., 1996; Schwartz et al., 1996; Seeley et al., 1996].

### 3.2.7. Das Pro-opiomelanocortin-System

Pro-opiomelanocortin [Chretien et al., 1980; Klonierung Chang et al., 1980] ist eine Vorstufe von Adrenocorticotropin und  **$\beta$ -Lipotropin** ( $\beta$ -LPH). Diese wiederum sind Vorstufen von  **$\alpha$ -Melanozyten stimulierendem Hormon**, Corticotropin-like intermediate lobe peptide (ACTH-Derivate),  $\gamma$ -LPH und  $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -LPH-Derivate).  $\beta$ -MSH geht als Spaltprodukt aus  $\gamma$ -LPH hervor. Naggert et al. (1985) zeigten, dass die **Carboxypeptidase E** und PC-1 maßgeblich an der Proteolyse von POMC beteiligt sind.

An der Gewichtsregulation scheint dem  $\alpha$ -MSH, welches vor allem im **Nucleus arcuatus** produziert wird, eine besondere Bedeutung zuzukommen [Kiss et al., 1984]. Das  $\alpha$ -MSH bindet unter anderem auch am Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R), der im Areal des **Nucleus paraventricularis** vornehmlich exprimiert wird [Fan et al., 1997]. Hier ist das Melanocortin an der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase beteiligt, indem es an den Empfängerrezeptor (MC4R) bindet und zur Sättigung bzw. reduzierten Nahrungsaufnahme beiträgt [Randey et al., 1997].

Genetische Defekte des MC4R führen zu Hyperphagie und Adipositas [Huszar et al., 1997, Hinney et al., 1999; Farouqi et al. 2001]. Ebenso verursacht das **Agouti**-Protein bei dessen ektopischer Expression eine pharmakologische Blockade des MC4R. Bei einer MC4R Knockout-Maus kommt es zu einer adulten Adipositas, die mit Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie einhergeht [Ollmann et al., 1997]. Jüngere Studien unterstreichen die Rolle des MC4R für die Gewichtsregulierung.



Kürzlich konnten drei verschiedene dominante Mutationen des MC4R identifiziert werden. In Folge dieser Mutation entwickelten die betroffenen Probanden eine Adipositas, zeigten jedoch keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten [Vaisse et al., 1998; Hinney et. al., 1999].

Der Einfluss des Melanocortin-Systems auf die Gewichtsregulation scheint im Gegensatz zu den Neuropeptid Y-Effekten zu stehen. Gewichtsabnahme durch Fasten führt zu reduzierten POMC-m-RNA-Konzentrationen im Nucleus Arcuatus [Schwartz et al., 1997]. Dies könnte die Konsequenz der erniedrigten Leptin-Werte sein, da auch bei *ob/ob*-Mäusen die POMC-mRNA-Konzentration erniedrigt ist und dieser Effekt bei Leptingabe verschwindet [Schwartz et al., 1997].

Der Arbeitsgruppe um Krude (1998) gelang die Entdeckung zweier Personen mit Mutationen im Pro-opiomelanocortin (POMC)- Gen. Die zwei Personen waren zuvor durch folgende phänotypische Merkmale aufgefallen: früh einsetzende Adipositas, Nebennierenrindeninsuffizienz und rote Haarpigmentation. Weitere Untersuchungen konnten eine Kopplung des POMC-Gens (Chromosom 2 des Menschen) zum Phänotyp Adipositas nachweisen [Hixson et. al., 1999]. Ebenso konnten Leptinrezeptoren auf Pro-opiomelanocortin (POMC) produzierenden Neuronen im Hypothalamus nachgewiesen werden [Cheung et al., 1997], so dass eine Interaktion zwischen Leptin und POMC bzw.  $\alpha$ -MSH wahrscheinlich ist.

### 3.2.8. Carboxypeptidase E Gen

Carboxypeptidase E gehört zu der Gruppe der Exopeptidasen, die Proteine vom C-terminalen Ende her spalten. 1995 beschrieben Naggert et al. eine Ser-202-Pro Mutation im CpE-Gen von *fat/fat* Mäusen, die die *in vitro* Aktivität des Fermentes praktisch ausschaltet. Fat/fat Mäuse weisen stark erhöhte Proinsulinspiegel auf und werden nach 8-12 Wochen übergewichtig. CpE ist an der Proteolyse verschiedener Prohormone beteiligt (z.B. Proinsulin). Dieser Befund zeigte erstmals, dass ein genetischer Defekt bei der zellulären Prozessierung bei der Entwicklung einer Gewichtsstörung eine Rolle spielt.

Neuroendokrine Zellen scheiden sekretorische Proteine fakultativ (reguliert) oder konstitutiv aus. Die regulierte Freisetzung setzt Bindung an einen Rezeptor des trans-Golgi Apparats voraus, gefolgt von Abschnürung und Granulabildung. Die membranassoziierte CpE konnte als ein solcher Rezeptor identifiziert werden [Cool et

al., 1997]. Es wurde gezeigt, dass POMC in *fat/fat* Mäusen nicht mehr geregelt, sondern konstitutiv sezerniert wird. In der Prohormonkaskade ist erst die PC-1 und dann die CpE aktiv.

### 3.2.9. Melanin-concentrating Hormon

Die RNA des Melanin-concentrating hormone wird im Hypothalamus von *ob/ob* Mäusen und fastenden Wildtyp (WT)-Mäusen überexprimiert [Qu et al., 1996]. Studien an Ratten zeigten eine dosisabhängige Stimulation der Nahrungsaufnahme nach akuter, nicht aber nach chronischer intraventrikulärer Gabe von MCH [Rossi et al., 1997]. Rovere et al. [1996] zeigten, dass die Prozessierung des Pro-MCH zu MCH bei *fat/fat* Mäusen, denen **CpE** fehlt, gestört ist. Damit wurde erstmalig nachgewiesen, dass CpE an der Prozessierung von Neuropeptiden beteiligt ist.

### 3.2.10. Agouti related Protein

Das Kennzeichen des genetischen Defektes der Agouti-Maus ist u.a. der beliebte Phänotyp (siehe auch 3.2.5.). Ursache ist die ektope Überexpression des physiologischerweise in melanotropin produzierenden Zellen vorkommenden Agouti Proteins. Das Protein fungiert als Antagonist am Melanocortin-4 Rezeptor.

Das agouti related protein (mAGRP) ist erhöht bei den übergewichtigen und hyperphagen *db/db* Mäusen. Das humane orthologe agouti related protein (**hAGRP**) ist auf Chromosom 6 lokalisiert [Kim et al., 2001; Brown et al., 2001].

Das zentral melanocortinerge System bahnt eine leptinsignalisierte Reduzierung der Nahrungsaufnahme und ein zunehmendes Sättigungsgefühl [Adan et al., 2001]. Eine Blockade der Gehirnmelanocortinrezeptoren führt zu erhöhter Nahrungsaufnahme und ansteigendem Körpergewicht. Eine Stimulierung des zentral melanocortinergen Systems verringert die Nahrungsaufnahme und aktiviert die hypothalamo-hypophysäre Achse. Anorexia nervosa ist durch verringertes Körpergewicht und reduzierte Nahrungsaufnahme gekennzeichnet, welche von Änderungen in den neuroendokrinen Systemen begleitet werden. Polymorphismen im Agouti-Gen könnten durch eine unzureichende Antagonisierung des MC-4 Rezeptors zu einer Anorexia nervosa prädisponieren. Hierdurch empfiehlt sich das Agouti-related-protein-Gen als Kandidatengen für die Anorexia nervosa [Vink et al., 2000; Adan et al., 2001]. Weitere **Studien am AN-Krankheitskollektiv** erweitern somit das Verständnis der

Gewichtsregulation und eröffnen Optionen in der pharmakologischen Therapie, wie z.B. die Entwicklung von synthetischen MC 4-Rezeptorantagonisten [Vink et al., 2001].

### 3.2.11. „Ciliary neurotrophic factor“ Rezeptor

Der Rezeptor des **Neurozytokins** ciliary neurotrophic factor besitzt Ähnlichkeit zum Leptinrezeptor und ist in hypothalamischen Kernen der Maus lokalisiert. Werden leptindefizienten (*ob/ob*) oder auch leptinrezeptordefizienten (*db/db*) Mäusen CNTF intraperitoneal injiziert, so verlieren sie an Gewicht, begleitet von einer Reduktion der Hyperphagie und der Hyperinsulinämie. Hierbei scheint ein **leptin-unabhängiger Mechanismus der Zytokin vermittelten Gewichtsregulation** zu existieren. Leptin selbst bindet nicht am CNTF Rezeptor [Gloaguen et al., 1997]. Stefanuto et al. identifizierte 1995 den regulativen Bereich des CNTF Gens in transgenen Mäusen.

### 3.3. Periphere Mechanismen der Gewichtsregulation

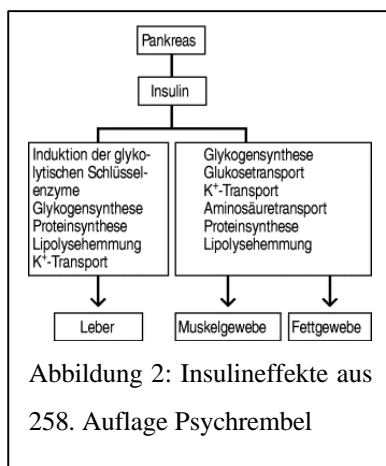
Wie bereits einleitend erwähnt, lassen sich periphere nicht immer scharf von zentralen Mechanismen trennen, denn zahlreiche Hormone werden peripher und zentral synthetisiert, und binden ebenfalls in beiden Strukturen an spezifische Rezeptoren. Allen an der Gewichtsregulation beteiligten hormonproduzierenden Zellen gemeinsam ist die phylogenetische Abstammung vom **neural programmierten Ektoderm**. Diese Zellen werden zum sogenannten **APUD-Zellsystem** (engl.: amin precursor uptake and decarboxylation) gerechnet und können neurokrin (direkt in eine Ganglienzelle), neuroendokrin (aus einem Axon in die Blutbahn), endokrin (direkt in die Blutbahn) und parakrin (in die unmittelbare Nachbarschaft) sezernieren. Zum APUD-Zellsystem gehören sowohl Zellen im **Hypothalamus**, Hypophyse, Pinealdrüse, Nebenschilddrüse, **Pankreasinselzellsystem**, die endokrinaktiven Zellen von Plazenta, **Magen-Darm-Trakt** und Lunge, die C-Zellen der Schilddrüse als auch Zellen des Nebennierenmarks, des Sympathikus und die Melanoblasten. In Folge werden die an der Nahrungsaufnahme beteiligten Hormone anhand ihrer jeweiligen Organsysteme kurz dargestellt.

Das periphere System reagiert in Form einer kaskadenartigen Ausschüttung gastrointestinaler Hormone als Antwort auf Nahrungsaufnahme. Nahrungsbestandteile werden je nach Konzentration und Qualität im Gastrointestinaltrakt registriert. Dieser

Identifikationprozeß stellt den Reiz für die Ausschüttung verschiedener Hormone dar, die die **Motilität** des Magen-Darm-Trakts direkt beeinflussen und dem Gehirn signalisieren, die Nahrungsaufnahme zu stoppen [Hirschberg et al., 1998].

Grundsätzlich müssen kurzfristige und langfristige Regulatoren in der hormonellen Steuerung der Nahrungsaufnahme und Sättigung unterschieden werden. Die Ausschüttung eines **kurzfristigen** Regulators wird durch Nahrungsaufnahme ausgelöst und steuert den Appetit während jeder einzelnen Mahlzeit. Ein kurzfristiger Regulator hat geringen oder gar keinen Einfluss auf das Körpergewicht. Die Sekretion der Sexualhormone oder Glukokortikoide als Beispiele eines **langfristigen** peripheren Regulators ist nicht notwendigerweise an die Nahrungsaufnahme gekoppelt. Sie beeinflussen nicht nur Appetit und Sättigung, sondern vermitteln auch fundamentale metabolische Effekte.

### 3.3.1. Pankreas



**Insulin:** Das von den B-Zellen der Langerhans-Inseln gebildete stark anabole Proteohormon beeinflusst den Glukosestoffwechsel und hierdurch den Appetit und die Nahrungsaufnahme in komplexer Weise. Symptome wie Heißhunger, Kopfschmerz, Nervosität und Mattigkeit treten gehäuft bei Patienten mit Anorexia nervosa im Rahmen einer Fastenhypoglykämie auf.

Plötzliche Insulin-Gabe führt zu Hypoglykämie und einer Steigerung der Nahrungsaufnahme. Diese Reaktion wird

über Mechanismen vermittelt, die sowohl in der Leber als auch im Zentralnervensystem stattfinden. Chronische Insulin-Applikation in niedrigen Dosen hingegen reduziert bei gleichzeitiger Normo- oder Hyperglykämie die Nahrungsaufnahme [Vanderweele et al., 1980]. Der **Insulin-Plasma-Spiegel** könnte ein **Fühler** des peripheren metabolischen Status darstellen [Woods et al., 1985]. Diese Vermutung wird durch die klinischen Erfahrungen einer positiven Korrelation von Insulin-Plasma-Spiegel und Grad der Adipositas erhärtet. Chronisch (langfristig) erhöhte Insulin-Plasma-Spiegel könnten somit ein Sättigungssignal für das **ZNS** darstellen, Nahrungsaufnahme und Körpergewicht zu reduzieren.

**Glukagon:** Glukagon wird in den A-Zellen des Inselapparates gebildet. Sekretionsreize sind Hypoglykämie, Anstieg freier Aminosäuren im Blut und verschiedene Hormone, wie z.B. Katecholamine, **Gastrin**, TRH und das **vasoaktive intestinale Polypeptid** (Hemmung der Magen-Darm Motilität). Gehemmt wird die Glukagonskretion durch Hyperglykämie und **Somatostatin**. Glukagon steigert den Blutzucker durch vermehrte Glykogenolyse, Förderung der Glukoneogenese und Hemmung der Glykolyse (**insulinantagonistische Wirkung**). Die Nahrungsaufnahme scheint durch Glukagon, über glukosensitive Zellen und vagale Efferenzen in der Leber vermittelt, verringert zu werden [Ritter et al., 1986; Geary et al., 1983]. Speziell die Aufnahme von Proteinen wird durch Glukagon gehemmt [Bray et al., 1992]. Daneben gibt es Anzeichen für einen Einfluss auf die Körpertemperatur mit damit verbundener Energieumsatzänderung [Billington et al., 1991].

**Somatostatin:** Als Syntheseorte von Somatostatin konnten die D-Zellen des Pankreas und der **Hypothalamus** identifiziert werden. Das Tetradekapeptid verringert die Nahrungsaufnahme, indem es die Sekretion von STH, TSH, ACTH, Insulin und Glukagon herabsetzt und indem es die **Hemmung der Magenentleerung** verzögert [Pirke et al., 1996].

### 3.3.2. Gastrointestinal Trakt

**Cholecystokinin:** Das von der duodenalen Mukosa gebildete Polypeptid Cholezystokinin (CCK) ist ein kurzfristiger Sättigungsfaktor. Periphere und zentrale Interaktionen konnten anhand dieses Hormons nachgewiesen werden. Lipid- und aminosäurereiche Mahlzeiten regen die Mukosa zur Sekretion von CCK an. Im Magen bindet das Hormon an **CCK-A-Rezeptoren** die eine Erregung über vagale Afferenzen zum **Traktus solitarius** im ZNS vermitteln. Von dort besteht über die parabrachialen Kerne eine Verbindung zum **ventromedialen Hypothalamus** und den **paraventriculären Kernen**. Eine Stimulation von CCK-A-Rezeptoren im Pylorus-Bereich des Magens führt zur Kontraktion des Sphinkters und verhindert so eine Magenentleerung. Bei einer Vagotomie oder Blockade der CCK-A-Rezeptoren fehlen sämtliche CCK-Effekte bezüglich der Nahrungsaufnahme [Smith et al., 1981; Moran et al., 1992]. Es wird vermutet, dass CCK ein verfrühtes Sättigungsgefühl auslöst und damit die Nahrungsaufnahme verkürzt [Gibbs et al., 1986]. Beim Menschen korreliert

die CCK-Sekretion nach Nahrungsaufnahme positiv mit einem **Sättigungs-** und negativ mit einem **Hungergefühl** [Geraciotti et al., 1988, Hirschberg et al., 1998]. Allerdings führt auch eine chronische CCK-Applikation nicht zu einem Gewichtsverlust, da sich zwar die Länge der einzelnen Mahlzeiten verkürzt, die Anzahl der Mahlzeiten jedoch proportional zunimmt. Im Fazit wird so die gleiche Menge an Kalorien aufgenommen [West et al., 1984]. Neben seiner Rolle an der Appetitregulation führt Cholecystokinin zu einer Kontraktion der Gallenblase und erhöht die exokrine Pankreassekretion [Mutt et al., 1988].

Vollständigerweise sollen in diesem Zusammenhang die kurzfristigen Regulatoren **Serotonin**, **Gastrin** und **VIP** genannt werden. Sie sind potentielle **Sekretogene** und können darüber hinaus die Magendarmpassage durch eine **Tonisierung**/Detonisierung der glatten Muskulatur beeinflussen [Friedmann et al., 1998].

### 3.3.3. Nebennieren

**Glukokortikoide:** Die Nebennierenrinde ist in der Lage, über 40 verschiedene Steroidderivate zu synthetisieren. Die in der **Zona fasciculata** gebildeten Glukokortikoide hemmen durch einen negativen `feedback-Mechanismus` die Ausschüttung des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) und potenzieren im Hypothalamus die durch Noradrenalin (permissiver Effekt) vermittelte Steigerung der Nahrungsaufnahme [Leibowitz et al., 1986]. Als physiologisches, stark kataboles „Stresshormon“ sorgt **Cortisol** für zahlreiche Einflüsse auf den Stoffwechsel und beeinflusst somit das Körpergewicht. Insgesamt scheinen die Einflüsse von Steroidhormonen auf die Gewichtsregulation hauptsächlich durch periphere metabolische Effekte im Fettgewebe und in der Leber vermittelt zu werden. Im Einzelnen führen diese Effekte zur Stimulation der Glukoneogenese und zur Lipolyse mit Aktivitätsmodulation der **Lipoprotein-Lipase** (LPL). Die LPL ist wiederum für die Triglyceridspeicherung im Fettgewebe verantwortlich. Ebenso wird eine indirekte Steigerung der Insulinsekretion [Xu et al., 1990] und eine Blockade der Zytokinbildung beobachtet. Überhöhte Kortikoidspiegel, z.B. durch **Autonomen** der einzelnen **Regulationsebenen**;

*(Hypothalamus/CRH@Hypophyse/POMC-ACTH@NNR/Cortisol);*

oder durch iatrogene Steroidtherapie, können zu dem klinischen Bild eines **Cushing-Syndroms** führen, dass mit stammbetonter Adipositas und Gewichtszunahme

einhergeht [Baxter et al., 1979].

#### **3.3.4. Gonaden-Sexualhormone**

Spezifischen Geschlechtsmerkmale entwickeln sich unter dem Einfluss der Sexualhormone, deren unterschiedliche Qualität und Konzentrationen das **phänotypische Geschlecht** determinieren. Hierdurch werden der prozentuale Fettanteil sowie die Fettverteilung beeinflusst. Mit Einsetzen der **Pubertät** finden sich deutliche Geschlechtsunterschiede. Bei Frauen kommt es zu einer erheblichen Zunahme des Fettgewebes. So unterscheiden sich im Alter von 18 Jahren Frauen (mit fast 25% Fettmasse) deutlich von Männern mit (ca. 17% Fettmasse), hinsichtlich ihres Anteils der Fettmasse am Gesamtkörpergewicht. Auch bei der Fettverteilung erkennt man die geschlechtsspezifischen Unterschiede. Bei Frauen dominiert die **gluteofemorale** Fettverteilung (gynoider Typ), während bei Männern eher von einer **stammbetonten** Fettverteilung gesprochen wird (androider Typ). Beiden Hauptvertretern der Geschlechtshormone gemeinsam ist die Sekretionssteuerung über die **hypothalamisch-hypophysäre Achse** mit ihren spezifischen Releasinghormonen und negativen Rückkopplungsmechanismen.

**Östrogen:** Neben seinen Einfluss auf die **Reproduktionsachse** und auf den **Menstruationszyklus** besitzt der Östrogenspiegel einen möglichen Effekt auf die Gewichtsregulation. Andererseits scheint ein Gewichtsminimum Voraussetzung für die Östrogenbildung, bzw. für die Fertilität zu sein. Starvationsähnliche Situationen bei Frauen führen zu einer sekundären **Amenorrhoe**. Auch im Rahmen einer **Anorexia nervosa** kommt es zu einer Amenorrhoe, die auf einen Rückgang und auf eine Verschiebung der pulsatilen Gonadotropinausschüttung in der Adenohypophyse zurückzuführen ist. Sekundär kommt es durch den Abfall von FSH und LH fast gänzlich zum Erlöschen der ovariellen Östrogenproduktion [Young et al., 1991; Hebebrand et al., 1995; v. Prittwitz et al. 1996].

Unter Gewichtszunahme erholt sich der Östrogenspiegel und nach einer Latenzphase setzt die Regelblutung wieder ein. Sexualhormonschwankungen werden oft von Gewichtsschwankungen begleitet und umgekehrt. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass Erstmanifestationen einer Anorexia nervosa häufig zeitlich gekoppelt mit dem Beginn der **Pubertät** sind. In dieser Phase könnten Veränderungen im

Sexualhormonhaushalt mit einem Anstieg der Östrogene bzw. einer Sensitivitätssteigerung der Östrogenrezeptoren im **Nucleus arcuatus** (NPY-Expressionsort) krankheitsbahnend sein [Young et al., 1991]. Eine beidseitige Ovariectomie im Tierversuch führt zu einer Hyperphagie und Gewichtszunahme andererseits setzt eine kontinuierliche **Östrogen-Gabe** die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht herab [Wade et al., 1979]. Es wird vermutet, dass das Östrogen die Aktivität des anorektisch wirkenden Corticotropin Releasing Hormons (CRH) im **Nucleus Paraventriculares** erhöht und gleichzeitig an gleicher Stelle Produktion und Ausschüttung von Neuropeptid Y unterdrückt [Bonavera et al., 1994; Rosenkranz et al., 1998].

**Testosteron:** Testosteron stimuliert die Nahrungsaufnahme und dämpft die Aktivität der **Lipoprotein-Lipase (LPL)** im viszeralen Fettgewebe mittels spezifischer Androgen Rezeptoren. Zudem wird durch Testosteron die Expression von **β-adrenergen-Rezeptoren** verstärkt, was eine Katecholamin induzierte Lipid-Mobilisation bewirkt [Rebuffe-Scrive et al., 1991]. Als Konsequenz der Testosteron-Wirkungen ist die bei Männern mit dem Alter ansteigende abdominale Fettmasse bei sinkenden Testosteron-Spiegeln zu sehen [Seidell et al., 1990]. Gegensätzlich dazu ist bei Frauen mit zunehmendem Alter ein Ansteigen des Testosteron-Spiegels und der abdominellen Fettmasse zu beobachten [Evans et al., 1983]. Dieser widersprüchliche Verlauf scheint aber in der bei älteren Frauen meist reduzierten Sekretion von Östrogen und Progesteron begründet zu sein [Laatikainen et al., 1980].

### 3.3.5. Schilddrüse

Aus klinischer Erfahrung weiß man, dass eine Hyperthyreose wie auch eine Hypothyreose mit Gewichtsänderungen einhergehen können. Physiopathologisch steht eine Störung des Körperenergieumsatzes mit einem Hyper- oder Hypo-Metabolismus im Vordergrund. So führt eine Hyperthyreose zu einer Gewichtsabnahme und eine Hypothyreose umgekehrt zu einer Gewichtszunahme. Physiologischerweise existiert auch bei diesen Hormonen ein Regelkreis mit negativer Rückkopplung:

*Hypothalamus/TRH @ Hypophyse/TSH @ Schilddrüse  $T_3/T_4$*

Interessanterweise gehen Hyper- und Hypothyreose gehäuft mit **psychopathologischen Auffälligkeiten** einher, vor allem mit **Depressionen** [König et al., 1999].



### 3.3.6. „Uncoupling protein“

Entkoppler der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) sind Moleküle, die in der inneren Mitochondrienmembran Kanäle bilden, die für Protonen durchgängig sind. Unter Umgehung der *ATP-Synthetase* verursachen sie einen Kurzschluss des Protonentransportes (Protonophoren). Die entkoppelte Atmungskette kann die freiwerdende Energie nicht wie üblicherweise in Adenosintriphosphat speichern, sondern gibt sie direkt als Wärmeenergie ab (Knallgasreaktion). Beispiele für eine physiologische Entkopplung sind winterschlafhaltende Species, die durch ein regulierbares Membranprotein (*Thermogenin*) zur Wärmegewinnung befähigt sind [Kreutzig et al., 1994]. Auch der Mensch besitzt solche Proteine, die nach Aufbau und Gewebelokalisation klassifiziert werden. Braunes Fettgewebe, in dem ausschließlich **uncoupling protein-1** lokalisiert ist, erlaubt Säuglingen die Wärmeerzeugung [Klaus et al., 1991]. Braunes Fettgewebe wird im Laufe der ersten Lebensjahre zunehmend vom weißen Fettgewebe ersetzt, welches diese Eigenschaft nicht besitzt. Jedoch werden **uncoupling Protein-2 und -3** in zahlreichen Geweben exprimiert [Gimeno et al., 1997; Boss et al., 2000].

Interessanterweise äußerten Campbell und seine Gruppe 1999 in einer Untersuchung die Vermutung, dass Mutationen im codierenden Bereich beider Proteine in Assoziation zur Anorexia nervosa stünden. Mäuse, die uncoupling protein-3 überexprimierten, zeigten eine **Hyperphagie** bei **niedrigerem Gewicht** als die Kontrolltiere [Clapham et al., 2000].

### 3.4. Kandidatengene

Die Regulation des Körpergewichts ist ein komplexer Vorgang, der durch viele verschiedene periphere und zentrale Prozesse gesteuert wird. Relevante Kandidatengene, die an der Gewichtsregulation beteiligt sind, wurden vorhergehend kurz dargestellt. Einen Überblick über Studienergebnisse der vorgestellten Gene und ihrer Polymorphismen an Patientinnen mit Anorexia nervosa gibt Tabelle 1.

Bei den untersuchten Genen wurden sowohl Mutationen / Polymorphismen mit **potentiell funktioneller Relevanz** (Aminosäureaustausch in kodierenden Bereichen, Promotermutationen) wie auch Mutationen / Polymorphismen ohne primäre funktionelle Relevanz untersucht. Letztere wurden im Hinblick auf ein mögliches Kopplungsungleichgewicht zwischen Mutation oder Polymorphismus und einer relevanten Veränderung im regulatorischen bzw. kodierenden Bereich des Gens untersucht.

Tabelle 1: Kandidatengenuntersuchungen mit bekannten intragenischen Polymorphismen zur Anorexia nervosa [Hinney et al., 2000]

Kandidatengene	Polymorphismus bzw. genetischer Marker	p-Werte für Assoziation bzw. TDT	Publikationen
<b>Leptin</b>	-1387 G/A (Promoter)	NS	Hinney et al., 1998
<b>Dopamin D3 Rezeptor</b>	<i>Bal I</i> Polymorphismus in Exon 1	NS	Bruin-Slot et al., 1998
<b>Dopamin D4 Rezeptor</b>	13 bp Deletion (Exon1)	NS	Hinney et al., 1999
<b>NPY Y<sub>5</sub> Rezeptor</b>	48 bp Repeat (Exon3)	NS	
	1333 G/A (still)	NS	Rosenkranz et al., 1998
<b>NPY Y<sub>1</sub> Rezeptor</b>	Intronischer <i>Pst I</i> Polymorphismus	NS	Rosenkranz et al., 1998
<b>5-HT<sub>1Dβ</sub> Rezeptor</b>	Phe-124-Cys (Intron1)	NS	Hinney et al., 1999
<b>5-HT<sub>2A</sub> Rezeptor</b>	-1438 A/G (Promoter)	Siehe 3.2.3. UE	Hinney et al., 1999
	Thr-25-Asn	NS	
	102 T/C (still)	NS	
	516 C/T	NS	
	His-452-Tyr	NS	
<b>5-HT<sub>2C</sub> Rezeptor</b>	Cys-23-Ser	NS	Hinney et al., 1997 Nacmias et al., 1999 Burnet et al., 1999 Hinney et al., 1997 Di Bella et al., 2000 Sundaramurthy et al., 00
<b>Serotonintransporter</b>	44 bp Del/Ins (Promoter) (Del <sup>-</sup> -1265-1221)	NS	Han et al., 1999 Hinney et al., 1998
<b>Tryptophanhydroxylase</b>	1095 T/C (stumm)	NS	
<b>Pro-opiomelanocortin</b>	Insertion von 9 bp zwischen Codon 73 and 74	NS	
<b>MC<sub>4</sub> Rezeptor</b>	Val-103-Ile	NS	Hinney et al., 1999
	Ile-251-Thr	NS	
<b>Östrogen β-Rezeptor</b>	1082 G/A (stumm)	0.04 nominal	Rosenkranz et al., 1998
	1730 A/G (still)	NS	
<b>β<sub>3</sub>-adreneger Rezeptor</b>	Trp-64-Arg	NS	Hinney et al., 1997
<b>Agouti-related protein (AGRP)</b>	2 Polymorphismen	0,015	Vink et al., 2001
<b>Uncoupling protein 2,3</b>	Flankierende Mikrosatelliten Marker	S für bestimmte Allele z.B. D11S911	Campbell et al., 1999

S: signifikant; NS: nicht signifikant; UE: uneinheitlich; TDT: transmission disequilibrium test;

#### 4. Identifizierung und Charakterisierung des *obese*-Kandidatengens (Leptingen)

Die Identifizierung und Klonierung des *obese*-Gens (Leptingen) [Zhang et al., 1994], eines dieser Kandidatengene, seines Produktes Leptin, sowie dessen Rezeptoren erbrachte zahlreiche neue Erkenntnisse über die Gewichtsregulation.

1995 wurde die exakte Position **7q32** mittels „fluoreszenz-in-situ-hybridisierung“ bestimmt [Geffroy et al., 1995]. Das menschliche *ob*-Gen besteht aus **3 Exons** und **2 Introns** und überspannt einen Bereich von 18 Kilobasen [Gong et al., 1996].

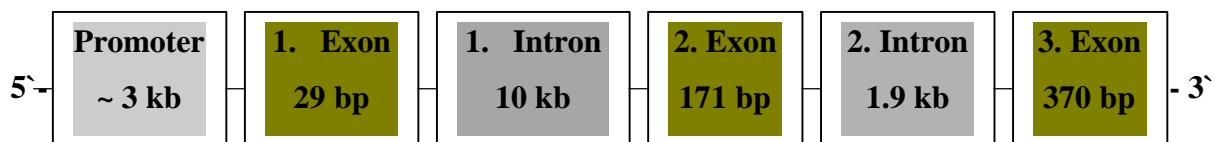


Abbildung 3: Aufbau des humanen Leptingens mit Größenangabe der jeweiligen Bereiche

Das *ob*-Gen wird vorwiegend in Adipozyten exprimiert und dient als Matrize für das **167 Aminosäuren** umfassende **Leptin**. Die Aminosäuresequenz des menschlichen Leptins entspricht zu 84 % der der Maus. Die *ob*-Boten-RNA (*ob*-mRNA) umfaßt bei der Maus wie auch beim Menschen eine Größe von 4,5 kb. Das *ob*-Gen der Maus befindet sich auf Chromosom 6 und ist an das MET-Onkogen gekoppelt. Dieses MET-Onkogen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 7 [Masuzaki et al. 1995]. Aufgrund verschiedener Marker, die das *ob*-Gen flankieren und Homologe zu den Markern des Maus- *ob*-Gens darstellen, vermutete Friedmann et al. 1991 die **Position 7q31** für das menschliche *ob*-Gen.

Das **erste Exon** enthält die **Transkriptionsstartstelle**. Das **2. und 3. Exon** kodieren das ***ob*-Protein** [Green et al., 1995; Isse et al., 1996].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der **Promoterbereich** des Leptingens, der für die Regulation der Genexpression zuständig ist, untersucht, da Allelvariationen im Promoter zu einer unterschiedlichen Transkriptionsrate führen könnten.

Aufwärts (in 5`-Richtung) der Transkriptionsstartstelle gelegen, stellt der Promoter einen spezifischen DNA-Bereich da, der als Erkennungs- und Bindestelle für die RNA-Polymerase dient. Darüberhinaus werden dem Promoter mit seinen unterschiedlichen regulativen Bereichen transkriptionssteuernde Eigenschaften zugeschrieben.

Im Einzelnen sind dies **generelle** Transkriptionselemente, die aus kurzen DNA-Sequenzen bestehen, die ubiquitär vorkommenden Proteinen (**Transkriptionsfaktoren**) als Bindungsstellen dienen. Sie legen beispielsweise die Initiationsstelle fest, die mit der RNA-Polymerase einen Bindungskomplex bildet, der den Startpunkt korrekt terminiert [Lewin, 1998]. Sequenzen solcher Art sind evolutionär konserviert, welches die Bedeutung für die Funktion der Gene unterstreicht.

Daneben existieren spezifische Erkennungssequenzen, die als genspezifische Transkriptionsfaktorenbindungsstellen zu verstehen sind, und zelltypische Funktionen initiieren.

**Tabelle 2: Promoteranalyse des humanen Leptingens**

<b>Erkennungselemente</b>	<b>DNA-Sequenzen</b>	<b>Transkriptionsfaktoren</b>	<b>Eigenschaften</b>
<b>TATA-BOX</b>	TATAAA	TFIID (transcription factor class II genes )	Ausrichtung der RNA-Polymerase an definierter Stelle für den Transkriptionsstart
<b>GC-BOX</b>	GGGCGG	SP-1	Transkriptionsstimulierung
<b>CAAT-BOX</b>	CCAAT	mehrere, z. B. C/EBP (CAT-enhancer binding protein)	Transkriptionskoordinierung und -verstärkung adipozyten-spezifischer Gene während der Adipozytendifferenzierung
<b>CRE</b>	GTGACG TA/CCA/G	CREB (cAMP response element)	Kofaktor in Genen, die durch cAMP aktiviert werden

[Cornelius et al., 1994; Passarge, 1994; Knippers, 1995; Strachan et al., 1996; Miller et al., 1996; Lewin, 1998]

#### **4.1. Das obese Gen-Produkt: Leptin**

Leptin besteht aus 167 Aminosäuren und zirkuliert sowohl gebunden, als auch ungebunden als Monomer im Plasma. Wie bei Mäusen, so enthält es auch beim Menschen eine funktionelle Signalsequenz, die mutmaßlich für die Sekretion des Proteins verantwortlich ist [Zhang et al., 1994].

Leptin wird posttranslational nicht mehr modifiziert [Cohen et al., 1996a], und die Analyse der Kristallstruktur weist es als Mitglied der Zytokin-Familie mit vier bis fünf helikalen Segmenten aus [Madej et al., 1995; Zhang et al., 1997]. Als Syntheseorte wurden vor allem das Fettgewebe, aber auch Placenta und Gehirn identifiziert, von wo

es anschließend in die Blutbahn sezerniert wird [Masuzaki et al., 1997; Elsner et al., 1998]. Die Sekretion erfolgt pulsatil [Licinio et al., 1997] und einer zirkadianen Rhythmik folgend, wobei nachts der Spiegelhöhepunkt erreicht wird [Sinha et al., 1996]. Im Blut erfolgt der Transport an verschiedenen Bindungsproteinen [Houseknecht et al., 1996]. Renal eliminiert wird Leptin über glomeruläre Filtration und nachfolgender Metabolisierung in den Nierentubuli [Cumin et al., 1997].

#### 4.2. Der Leptinrezeptor

Den **Wirkungsort** für Leptin bildet der **Leptin-Rezeptor**, dessen Gen (OB-R) 1995 von Tartaglia et al. zum erstenmal aus Mäuse-Choroid isoliert und cloniert wurde. Es handelt sich um ein Mitglied der **Zytokin-Rezeptor-Familie**, und es existieren mindestens fünf verschiedene Splicevarianten des Rezeptors, für die das OB-R-Gen kodieren. Eine der Spliceformen, OB-Rb, wird im hohen Maße im Hypothalamus und nur vereinzelt in anderen Geweben exprimiert [Ghilardi et al., 1996; Lee et al., 1996]. Diese Isoform des Rezeptors besitzt, im Gegensatz zu den anderen vier Formen, eine lange zytoplasmatische Region mit verschiedenen für die Signaltransduktion wichtigen Domänen [Tartaglia et al., 1995; Lee et al., 1996; White et al., 1997].

1998 wurde von Clement et al. eine Mutation im menschlichen Leptin-Rezeptor Gen identifiziert. Ein homozygoter **Guanin→Adenin Basenaustausch** in Exon 16 des **Leptin-Rezeptor-Gens** (ob-R) führte bei drei Schwestern im Alter von 13 und 19 Jahren zu einem verkürzten Leptin Rezeptor, dem die transmembrane und intrazelluläre Domäne fehlt. Die drei Probandinnen hatten ein normales Geburtsgewicht, entwickelten aber schon in den ersten Lebensmonaten eine Hyperphagie und weisen mittlerweile BMI's zwischen 52,5 und 71,5 kg/m<sup>2</sup> auf [Clement et al., 1998]. Zusätzlich zur früh einsetzenden Adipositas fehlt bei den Probandinnen das Einsetzen der Pubertät, und die Sekretion der Wachstumshormone und des Thyreotropins ist vermindert. Weitere Geschwister und die Eltern der Probandinnen zeigen als heterozygote Träger der Mutation eine normale Gewichts- und Pupertätsentwicklung. Dies lässt vermuten, dass nur das Fehlen beider funktionstüchtiger Allele die Gewichtsregulation phänotypisch beeinflusst.

### 4.3. Untersuchungen auf Kopplung und Assoziation von Anorexia

#### nervosa zum Leptingen

Im menschlichen Organismus besteht eine signifikant hohe Korrelation zwischen Körperfettmasse und dem **Plasma-Leptin-Spiegel**. Die Vermutung, dass die Höhe des Leptin-Plasma-Spiegels für das gewichtsregulatorische Zentrum das **Feedback-Signal** über die Körperfettmasse darstellt und damit den afferenten Schenkel im Regelkreis Körperfett→Hypothalamus→Nahrungsaufnahme bzw. Energieverbrauch bildet, wurde durch die Erkenntnisse erhärtet, die man aus den verschiedenen Mausmodellen gewann. Allerdings konnte die Mutation, die im Mäuse-ob-Gen zu einem Stop-Codon führt, im menschlichen ob-Gen nicht nachgewiesen werden. Im menschlichen ob-Gen wären zwei Nukleotid-Substitutionen notwendig, um das an Codon 105 produzierte Arginin in ein Stop-Codon zu verwandeln [Considine et al., 1995].

Bereits 1996 konnten verschiedene Gruppen **Kopplung extremer Adipositas zur menschlichen Leptingenregion** nachweisen [Reed et al., 1996; Clément et al., 1996].

Nachdem zunächst verschiedene signifikante Korrelationen zwischen Plasma-Leptin-Spiegel und Body-Mass-Index [Considine et al., 1995; Lonnqvist et al., 1995; Weigle et al., 1997] für eine Rolle des Leptins bei der Gewichtsregulation sprachen und gezeigt werden konnte, dass Patientinnen mit **Anorexia nervosa** gegenüber gewichtsgemachten Kontrollen stark erniedrigte Serumleptinspiegel aufwiesen [Hebebrand et al., 1995, 1997], genotypisierte die klinische Forschergruppe **58 Trios** bestehend aus einer Indexpatientin mit dieser Essstörung und ihren Eltern mit den Mikrosatellitenmarker D7S1875 und D7S504. Da hier nur vereinzelte Befunde anderer Gruppen vorlagen, wurde der häufigste in diesem Kollektiv vorkommende Haplotyp (145-214) für die Kopplungsanalyse benutzt. Es fand sich **kein** Hinweis auf ein Kopplungsungleichgewicht der beiden Mikrosatellitenmarker zur Anorexia nervosa.

Zeitlich parallel zu diesen ersten Kopplungsanalysen der Klinischen Forschergruppe zwischen Leptin und Anorexia nervosa wurden 1997 die ersten Mutationen im Leptingen beschrieben:

1. Die Arbeitsgruppe um Montague beschrieb zwei verwandte **extrem adipöse Kinder** mit extrem niedrigen Plasma-Leptin-Spiegeln, die beide homozygot für die **Deletion** einer **Guanin-Base in Codon 133** des ob-Gens sind, was schließlich zu einer Leserasterverschiebung (frame-shift) und einem Stop-Codon führte. Beide Kinder hatten ein normales Geburtsgewicht, entwickelten aber ab dem 3. Lebensmonat eine Hyperphagie und Adipositas. Das Mädchen wog im Alter von 9 Jahren 94,4 Kilogramm bei 59 % Fettmasse, ihr Cousin im Alter von 2 Jahren 29 Kilogramm bei 54 % Fettmasse. Die für die Mutation heterozygoten Eltern und Geschwister zeigten keine Anzeichen einer extremen Adipositas [Montague et al., 1997].

Die Arbeitsgruppe um Farooqi behandelte 1999 das Mädchen im Alter von neun Jahren mit rekombinanten Leptin subcutan über ein Jahr. In diesem Zeitraum verlor die Patientin 16,4 kg Gewicht und reduzierte ihren prozentualen Fettanteil auf 52%. Ermöglicht durch Appetitverlust konnten eine negative Energiebilanz, die Gewichtsreduktion und konsekutiv ein Mobilitätsgewinn erreicht werden. Darüberhinaus kam es zum Ende der Therapie zu einem frühpubertären pulsatilem Ausschüttungsmuster der Gonadotropine, welche für eine normale Ausbildung der Geschlechtsreife notwendig ist.

2. Strobel et al. fanden 1998 bei einem türkischen Patienten sehr niedrige Plasma-Leptin-Spiegel in Kombination mit einem Body-Mass-Index von  $55,8 \text{ kg/m}^2$ . Die molekulargenetische Untersuchung zeigte einen **Cytosin → Thymin Basenaustausch** der im Codon 105 des ob-Gens zu einem Aminosäureaustausch Arginin → Tryptophan führte. Der C → T Basenaustausch führte außerdem zu einer neuen Restriktionsschnittstelle, was es Strobel et al. ermöglichte, die gesamte Familie des Mutationsträger auf diese Mutation hin zu screenen. Es wurden zwei weitere homozygote Mutationsträger entdeckt, die beide relativ zu ihrem erhöhten BMI erniedrigte Plasma-Leptin-Spiegel und eine extreme Adipositas aufwiesen. Da zwei der drei Mutationsträger Erwachsene waren, konnten erstmals Rückschlüsse auf die **Reproduktionsfähigkeit** im Zusammenhang mit ob-Gen-Mutationen beim Menschen gezogen werden. Die weibliche erwachsene Mutationsträgerin zeigte eine primäre **Amenorrhoe**, und der männliche erwachsene Mutationsträger trat nie in die Pubertät ein, sondern zeigte die klinischen Merkmale eines **Hypogonadismus**: keinen Bart, spärliche Pubes- und Axillarbehaarung, Gynäkomastie, kleiner Penis und Hoden [Strobel et al., 1998].



Die gefundenen Mutationen sprachen für eine Beteiligung des Leptins an der **Gewichtsregulation**. Die 2. Mutation des Leptin-Gens und eine Mutation im Leptin-Rezeptor-Gen ließen zusätzlich eine Notwendigkeit des Vorhandenseins von Leptin zur Initiierung der menschlichen **Pubertät** vermuten.

#### 4.4. Leptin und Anorexia nervosa/ Stand der Forschung

Die Ergebnisse der Erforschung des *obese*-Genproduktes, die Bedeutung für eine Gewichtsstörung im Sinne einer Anorexie haben, sollen im Folgenden dargestellt werden.

- ◆ Bei Patientinnen mit Anorexia nervosa liegt im Akutstadium ein gegenüber Kontrollen deutlich erniedrigter Serumleptinspiegel vor. Die Kontrollen wurden für Alter, Geschlecht, BMI und/oder prozentualen Anteil der Fettmasse am Gesamtkörpergewicht gematcht [Hebebrand et al., 1995, 1997; Grinspoon et al., 1996].
- ◆ Unter der therapeutisch induzierten Gewichtszunahme kommt es zunächst zu einem langsamen Anstieg der Leptinsekretion. Nach diesem initialen Anstieg bedingen bereits kleine weitere Gewichtszunahmen deutliche Anstiege der Leptinspiegel. Nach Zunahme von ca. 10 kg innerhalb von ca. 100 Tagen bewegen sich die Serumleptinspiegel deutlich oberhalb des Referenzbereichs [Hebebrand et al., 1997; Ballauff et al., 1999].
- ◆ Bei Patientinnen mit Anorexia nervosa ist nach Kaye und Mitarbeitern (1986) die Energieaufnahme im Akutstadium im Verhältnis zur Körperfläche erniedrigt, nach kurzzeitiger Gewichtsnormalisierung erhöht und bei langfristiger Gewichtsstabilisierung ähnlich zu Kontrollen. Die Leptinsekretion im Verlauf einer Anorexie verläuft hierzu parallel ab [Hebebrand et al., 1997].
- ◆ Die exogene Applikation von Leptin führt bei fastenden Mäusen und Ratten zu einer Abschwächung der hormonellen Umstellung auf den Semistarvationszustand (Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-, -Schilddrüsen- und Nebennierenrinden-Achsen; Somatotropin-Achse) [Ahima et al., 1996]. Letztlich wird Cortisol hochreguliert, FSH, LH, T3 und T4 hingegen herabreguliert.
- ◆ Die Infertilität der weiblichen *ob/ob* Mäuse (Leptin-defizient) und die partielle Infertilität bei den Männchen kann erfolgreich durch exogene Applikation von

Leptin behoben werden [Chehab et al., 1996; Barash et al., 1996]. Es kommt unter der Behandlung zu einer Gewichtszunahme des Uterus, der Ovarien bzw. der Samenvesikel und zur Ausbildung eines normalen histologischen Befunds der vorgenannten Organe.

- ◆ Die Applikation von Leptin induziert bei Mäusen und Ratten die vorzeitige **Geschlechtsreife** [Chehab et al, 1997; Aubert et al., 1997]. Während die Befunde von Frisch und Mitarbeitern (1970), wonach es eine kritische Fettmasse für das Auftreten der Menarche gibt, von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden konnten [Hebebrand et al., 1996], scheint dem Leptin (und somit doch indirekt auch der Fettmasse) eine entscheidende Bedeutung für die Geschlechtsreifung zu zukommen.
- ◆ Erhöhte Leptinspiegel führen bei Mädchen zu einer vorgezogenen Menarche [Matkovic et al., 1997]. Demgegenüber ist bei anorektischen Patientinnen die auftretende primäre oder sekundäre Amenorrhö mit niedrigen Leptinspiegeln assoziiert. Zur Wiedererlangung einer Menses muss ein **Leptinschwellenwert** zeitlich begrenzt überschritten werden, um eine ausreichende Produktion des Luteinisierenden Hormons (LH) sicherzustellen [v. Prittwitz et al., 1997; Audi et al., 1998; Ballauff et al., 1999].
- ◆ Bei untergewichtigen Studentinnen ( $BMI \leq 15$ . Perzentile) sagt ein niedriger Leptinspiegel ( $< 1,85 \text{ } \mu\text{g/l}$ ) das Auftreten einer Amenorrhoe von mindestens dreimonatiger Dauer voraus [Köpp et al., 1997]. BMI und Prozent Fettmasse haben nicht diesen prädiktiven Wert.
- ◆ Bei Patientinnen mit Anorexia oder Bulimia nervosa trennt der Leptinspiegel von **1,85  $\mu\text{g/l}$**  weitgehend amenorrhoeische von nicht-amenorrhoeischen Patientinnen [Köpp et al., 1997]. Dies bedingt zugleich, dass dieser Spiegel weitgehend Patientinnen mit Anorexie von denen mit Bulimie trennt.
- ◆ Die über vier Wochen nach stationärer Aufnahme gemittelten Serumspiegel für FSH, LH, Progesteron und Östradiol zeigen einen Zusammenhang zu dem bereits vorgenannten Leptinspiegel von  $1,85 \text{ } \mu\text{g/l}$ : Mit Ausnahme des Progesterons korrelieren bei Patientinnen mit Anorexia nervosa alle über die initialen vier Wochen der stationären Therapie gemittelten Hormonwerte mit dem ebenfalls in den ersten vier Wochen gemittelten  $\log_{10}$  Leptinspiegel. Bei den essgestörten Patientinnen, die einen gemittelten  $\log_{10}$  Leptinspiegel  $> 1,85$  hatten, zeigte sich

keinerlei Zusammenhang zwischen den vorgenannten Hormonspiegeln und dem Leptinspiegel [Köpp et al., 1997].

- ◆ Fasten, bzw. eine vorübergehende Einschränkung der Energiezufuhr, bedingt im Tierversuch und beim Menschen einen raschen Abfall der Leptinsekretion [Sinha et al., 1996; Kolaczynski et al., 1996, Boden et al., 1996; Blum et al., 1997] und eine Aktivierung der Nebennierenrinde über erhöhte CRF und ACTH Freisetzung. Nach 24-stündigem Fasten beträgt der Serumleptinspiegel ca. 50 % des Ausgangswertes. Dieser Abfall der Leptinsekretion stellt sich ein, obwohl das Fasten über diesen Zeitraum nur einen minimalen Gewichtsabfall bedingt. Ein Zusammenhang mit Insulin erscheint wahrscheinlich [Blum et al., 1997].
- ◆ Eine eintägige **Überernährung** (100kcal/kg Körpergewicht) führt zu einem Anstieg des Serumleptinspiegels um ca. 40 % [Kolaczynski et al., 1996]. Diese erhöhte Leptinsekretion ist nicht auf eine Zunahme des Körpergewichts zurückzuführen. Bei einer Gewichtszunahme um 10 % innerhalb von fünf Wochen mit anschließendem Gewichthalten über weitere zwei Wochen ist der Leptinserumspiegel um ca. 300 bis 400 % höher als der Ausgangswert.
- ◆ Bei untergewichtigen Frauen lässt sich eine negative Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad des gezügelten Essverhaltens und dem Serumleptinspiegel feststellen [v. Prittwitz et al., 1997]. Der Punktwert der Subskala „Drive for Thinness“ vom Eating Disorders Inventory [Garner et al., 1983] korrelierte wiederum signifikant mit Leptinspiegeln untergewichtiger Studentinnen.
- ◆ Pima Indianer, die initial nach Korrektur für Prozentfettmasse und Geschlecht einen niedrigen Leptinspiegel zeigten nahmen in den drei darauffolgenden Jahren deutlich stärker zu als solche Probanden mit initial hohen Leptinspiegeln [Ravussin et al., 1997]
- ◆ An Hand einer Kasuistik konnte gezeigt werden, dass Essattacken und Erbrechen keinen Einfluss auf die Leptinsekretion bei einer Patientin mit Bulimia nervosa haben [Herpertz et al., 1997].
- ◆ Der **zirkadiane Rhythmus** der Leptinsekretion [Sinha et al., 1996] ist bei Patientinnen mit Anorexia nervosa im Akutstadium abgeschwächt [Herpertz et al., 1998] bzw. nicht nachweisbar.
- ◆ Die Leptinsekretion erfolgt **pulsatil**. Im Abstand von ca. 30 Minuten lässt sich im Serum ein Nadir nachweisen, wobei der Unterschied zum maximalen Wert ca. 80 %

beträgt [Licinio et al., 1997].

- ◆ Clopazin, ein atypisches Neuroleptikum, führt über die Erhöhung der Energiezufuhr zum Anstieg der Leptinspiegel [Brömel et al., 1998]. Es wird eine durch die Medikamenteneinnahme getriggerte Appetitsteigerung als Ursache vermutet.
- ◆ Im Blut gelöste Leptinrezeptoren haben bei Patientinnen mit Anorexia nervosa eine höhere Konzentration als bei gesunden Vergleichsprobandinnen. Die gelösten Rezeptoren entsprechen in ihrem Aufbau der extrazellulären Komponente der membrangebundenen Isotypen der Leptinrezeptoren. Sie fungieren mutmaßlich als **leptin-binding-proteins** im Plasma. Es konnte eine negative Korrelation zwischen der Rezeptorkonzentration und dem BMI nachgewiesen werden [Jiskra et al., 2000].
- ◆ Am Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass eine durch Semi-Starvation bedingte **Hyperaktivität** mit niedrigen Leptinspiegeln einhergeht. Wurde den Versuchstieren Leptin exogen appliziert, so sistierte die Hyperaktivität [Exner et al., 2000]. Ähnlich stuften ebenfalls Patientinnen mit Anorexia nervosa ihre oftmals empfundene motorische Hyperaktivität nach Gewichtsaufbau und damit gestiegenen Leptinserumwerten als deutlich reduziert ein. Somit könnte eine Hypoleptinämie die Hyperaktivität mitverursachen, die häufig als Symptom bei der Anorexia nervosa auftritt.
- ◆ Im Laufe einer **Schwangerschaft** steigen die Leptinspiegel im Blut der Mutter kontinuierlich an. Nach Geburt des Kindes fallen die Werte zügig ab [Schubring et al., 1998]. Bereits im Nabelschnurblut lassen sich Leptinspiegel messen, die mit dem Körpergewicht und der Fettmasse des Feten bzw. Neugeborenen assoziiert sind [Mantzoros et al., 1997]. Leptin wird dabei sowohl vom fetalen Gewebe als auch von der Placenta produziert [Masuzaki et al., 1997]. Während der Schwangerschaft wirkt Leptin stimulierend auf die Proliferation und Differenzierung von Dottersackzellen, fetalen Lebrzellen und hämatopoetischen Vorstufen [Ozata et al., 1999].

Eine Übersicht zu den neuroendokrinen Reaktionen auf Starvation und die Regulation des Körpergewichtes gibt Kapitel 3. Neben Leptin finden NPY, katabole hypothalamische Regelkreise z. B. Serotonin, Corticotropin-Releasing Factor, Melanocortin,  $\alpha$ -Melanozten stimulierendes Hormon und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achsen Beachtung. Hieraus ergibt sich, dass die

Adaptation an eine Semi-Starvation physiologisch komplex erfolgt. Gerade Patientinnen mit Essstörungen können helfen, die Bedeutung der relevanten Regelkreise zu erfassen.

#### 4.5. Ziel der Arbeit

Die Klonierung des *obese* Gens von Zhang et al. 1994 legte den Grundstein für eine Renaissance in der Erforschung der Gewichtsregulation; weltweit beschäftigen sich mittlerweile zahlreiche Gruppen mit physiologischen und pathophysiologischen Aspekten des Leptins. Bedingt durch den Ansatz, die Anorexia nervosa als eine Störung der Gewichtsregulation aufzufassen, interessierte sich die Klinische Forschergruppe bereits unmittelbar nach Klonierung des *obese* Gens für die Bedeutung des Genprodukts für die Anorexia nervosa.

Die Klinische Forschergruppe untersuchte zunächst den kodierenden Bereich des Leptingens [Hinney et al., 1998]. Hierbei wurden zwei neue Varianten entdeckt (Ser-91-Ser, Glu-126-Gln) sowie eine bereits zuvor detektierte (Val-110-Met) bestätigt.

Diese Polymorphismen erschienen jedoch ohne funktionelle Relevanz, so dass der Promoterbereich des Leptingens, welcher für die Regulation der Genexpression zuständig ist, in den Blickpunkt neuerlicher Untersuchungen rückte.

Die Sequenz des Promoterbereichs bis ca. 3 kB vor dem Leptingen war bereits zur Zeit der praktischen Durchführung dieser Arbeit bekannt (bis -2922 bp vor dem Start der Leptin mRNA). Diese Sequenz enthält mehrere **putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren**, u. a. für CCAAT/enhancer-binding protein, ein cAMP response element und ein Glukocorticoid responsives Element [Gong et al., 1996; Miller et al., 1996; Mason et al., 1998].

Allelvariationen im Promoter könnten zu einer unterschiedlichen Transkriptionsrate führen und daher für den individuellen Leptinspiegel mitverantwortlich sein. Somit könnten Allelvariationen mit dem Phänotyp der Anorexia nervosa assoziiert sein. Basierend auf dieser Grundlge wurde die Arbeitshypothese dieser Arbeit formuliert:

*„Polymorphismen im Promoterbereich führen zu einer Dysregulation der Leptinsekretion. Daher können einzelne Allele derartiger Polymorphismen mit dem Phänotyp der Anorexia nervosa assoziiert sein.“*

Ein Teil dieses erweiterten Promoters wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels **SSCA** untersucht. Dieser untersuchte Bereich liegt ca. 1,3 kB (-1231 – 1459) vom 5'-Ende des Leptingens entfernt. Es konnte ein **Polymorphismus detektiert werden (G-1387A)**, der mit einer hohen Frequenz (ca. 0,50) bei allen untersuchten Probanden (Adipöse, Untergewichtige und Patienten mit AN) zu finden ist [Hinney et al. 1998]. Ihm liegt ein Basenaustausch von **G zu A** zugrunde. Zusätzlich untersuchte die Klinische Forschergruppe einen **beschriebenen Promoter Polymorphismus (C-2549A)**, Frequenz: 0,44; Mammés et al., 1998) mittels **PCR-RFLP**. Ihm liegt ein Basenaustausch von **C→A** zugrunde. Dieser Basenaustausch liegt in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Hin 6.1*, welches das mutierte Allel nicht schneiden kann.

Ziel der Arbeit war es, nach Erarbeitung und Optimierung der Bedingungen für PCR, DNA-Digestion und SSCA, die Allelverteilungen beider Polymorphismen im Untersuchungs- und Vergleichskollektiv zu bestimmen.

Hiernach wurden die Ergebnisse mittels  $\chi^2$ -Test auf Assoziation zum Phänotyp der Anorexia nervosa untersucht. Darüberhinaus sollte ein etwaiges Kopplungsungleichgewicht mittels des **Transmissions disequilibrium tests (TDT)** nachgewiesen werden.

---

## MATERIAL UND METHODEN

### 1. Rekrutierung

#### Patientinnen mit Anorexia nervosa :

- DSM-IV Kriterien für Anorexia nervosa
- Rekrutierungseinrichtungen :
  - 1.) Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps- Universität Marburg : 27 Patientinnen
  - 2.) Arbeitsgemeinschaft „ Genetik in der Kinder- und Jugendpsychiatrie “ (Prof. Lehmkuhl , Prof. Poustka , Prof. Schmidt) , Kinder- und Jugendpsychiatrien der Universitätskliniken Köln, Frankfurt, Mannheim: 76 Patientinnen
  - 3.) Prof. Herpertz - Dahlmann: 34 Pat.
  - 4.) Innere Medizin , Heidelberg (PD Dr. Herzog): 10 Patientinnen

⇒ Insgesamt 147 Patientinnen mit Anorexia nervosa, von 66 Indexprobanden liegt auch die DNA beider Eltern vor (66 Trios).

#### Untergewichtige:

Die untergewichtigen Probanden mussten folgende Kriterien erfüllen, um in die Untersuchungsreihe aufgenommen zu werden:

1. Kriterien: Der BMI durfte das 15. Altersperzentil nicht überschreiten.
2. Es sollten keine somatischen Störungen vorliegen.
3. Der Zigarettenkonsum sollte nicht mehr als 10 Stück pro Tag betragen.

Die 160 Probanden rekrutierten sich aus der Studentenschaft der Universität Marburg.

Alle Probanden gaben vor Studienbeginn ihre schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an den Untersuchungen. Bei Minderjährigkeit wurde die Zustimmung durch die Erziehungsberechtigten erteilt.

## 2. Chemikalien

Auflistung der verwendeten Chemikalien und der jeweiligen Bezugsfirmen. Alle gebräuchlichen Chemikalien und nicht anders erwähnten Chemikalien wurden von den Firmen *Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma, Steinbach; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande; Riedel-de Haen, Seelze und Braun, Melsungen* bezogen.

**Tabelle 3: Spezielle Chemikalien und ihre Bezugsquellen**

Chemikalien	Firma, Ort, Land
Acrylamid plusone 40 % PAGE (Acryl)	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Acrylease	Statagene, Heidelberg, D
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, D
123 Bp DNA Ladder	GibcoBrL (Life Technologies),
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
dNTP-Mix	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Long Ranger 50 %	FMC, Rockland, USA
low DNA Mass Ladder	Gibco BRL, Eggenstein, D
Methylenebisacrylamid plusone 2 % (Bis)	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Polyethyleneglycol 600 (PEG 600)	Sigma, Deisenhofen, D
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, D
Sequenzierungskit	Amersham, Pharmacia, Biotech, Freiburg, D
Sodiumdodecylsulphat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinbach, D
TrisHCl	USB, Cleveland, USA
Urea plusone (Harnstoff)	Amersham, Pharmacia, Biotech, Freiburg, D
Xylenzyanol	Merck, Darmstadt, D



## 2.1. Puffer und Lösungen

Auflistung der verwendeten **Puffer**, ihrer Zusammensetzung und Konzentrationen.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (Bidest) angesetzt.

### 2.1.1. Puffer

**Tabelle 4: Red cell lysis buffer (RCLB), pH 7,6**

Reagenz	Stammkonzentration	g/1000 ml Bidest
TrisHCl	10 mM	1,21
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	1,02
NaCl	10 mM	0,58

**Tabelle 5: SE-Puffer (pH 8)**

Reagenz	Stammkonzentration	g/1000 ml Bidest
NaCl	75 mM	4,39
Na <sub>2</sub> EDTA	25 mM	8,41

**Tabelle 6: TE-Puffer (pH 8)**

Reagenz	Stammkonzentration	g/1000 ml Bidest
TrisHCl	10 mM	1,21
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM	0,34

**Tabelle 7: TAE-Puffer**

Reagenz	Konzentration
TrisHCl	0,04 M
Eisessig	0,114 %
EDTA	0,01 M

**Tabelle 8: 10 x TBE-Puffer (pH 8)**

Reagenz	Menge pro Liter
TrisHCl	154,5 g
Borat	26,2 g
Na <sub>2</sub> -EDTA	9 g
Bidest	810 g (einwiegen)

**Tabelle 9: Gel-Ladungspuffer****a) für Agarose-Gele**

Reagenz	Konzentration
Bromphenolblau	0,25 %
Xylenzyanolblau	0,25 %
Ficoll	15 %

**b) für SSCA-Gele**

Reagenz	Konzentration
EDTA (0,5 M)	40 %
Formamid, deionisiert	20 %
Glyzerin	10 %
Bromphenolblau	0,5 %
Xylenzyanolblau	0,5 %

**Tabelle 10: Puffer Violet**

Chemikalien	Konzentration
Tris HCl	0,01 M
MgCl <sub>2</sub>	0,005M
NaCl	0,1 M
DTT	0,001M
BSA	10%

Der Puffer Violet wurde gebrauchsfertig von der Firma *Eurogentec Bel S.A.*, Seraing, Belgien bezogen.

Tabelle 11: 10 x PCR-Puffer

Puffer-Nr.	TrisHCl (mM)	pH	MgCl <sub>2</sub> (mM)	KCl (mM)
1	100	8,3	15	250
2	100	8,3	15	750
3	100	8,3	35	250
4	100	8,3	35	750
5	100	8,8	15	250
6	100	8,8	15	750
7	100	8,8	35	250
8	100	8,8	35	750
9	100	9,2	15	250
10	100	9,2	15	750
11	100	9,2	35	250
12	100	9,2	35	750

Außerdem: TAQ-10 x Puffer, magnesiumfrei der Firma *MWG/Biotech*, Ebersberg

### 2.1.2. Sonstige Lösungen

Tabelle 12: Pronase-Reaktionsmix (DNA-Extraktion)

Reagenz	eingesetzte Menge
SE-Puffer	<b>5 ml</b>
Pronase E (10 mg/ml)	25 µl
SDS (10 %)	500 µl

Tabelle 13: Master-Mix

Reagenz	Konzentration
TrisHCl (pH 8)	20 mM
EDTA (pH 8)	250 nM

**Tabelle 14: 10 x Puffer für PCR-Optimierung**

Auflistung der verwendeten **Lösungen** und ihrer Konzentrationen:

Lösungen	Eigesetzte Menge pro 25 µl-Ansatz	Konzentration im PCR-Reaktionsmix
Formamid (100%)	1,25 µl	5 %
DMSO (100%)	1,25 µl	5 %
Glycerol (100%)	3,75 µl	15 %
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (375 mM)	1,0 µl	15 mM
BSA (20mg/ml)	1,5 µl	1,28 mg/ml

**Tabelle 15: Lösungen zum Färben**

a) der Agarose-Gele

Reagenz	Konzentration
Ethidiumbromid (1 %)	10 mg/ml

b) der SSCA-Gele

Reagenz	Konzentration
AgNO <sub>3</sub>	120 mM
NaCO <sub>3</sub>	1,4 M

## 2.2. Enzyme

Die DNA-Digestion wurde mit dem Restriktionsenzym *Hin 6.1* durchgeführt, welches über die Firma *Eurogentec Bel S.A.*, Seraing, Belgien bezogen wurde.

**Tabelle 16: Restriktionsenzym**

Name	Konzentration	Erkennungssequenz	Schnittstelle	Donor-Bakterium
<i>Hin</i> <b>6.1</b>	8-12 Units/ $\mu$ l	5`...G↓CGC...3` 3`...CGC↑G...5`	-2549 Leptingen- promotor, Wildtyp wird geschnitten	Haemophilus Influenza RFL 6

**Tabelle 17: Sonstige Enzyme**

Enzym	Konzentration	Hersteller
Taq-Polymerase	<b>4 U/<math>\mu</math>l</b>	MWG, Ebersberg, D
Pronase E	<b>10 mg/ml</b>	Sigma, Deisenhofen, D

## 2.3. Primer

Zur Herstellung der gewünschten DNA-Fragmente mittels PCR wurden folgende **Primer** ausgewählt und über die Firma *MWG/Biotech*, Ebersberg gebrauchsfertig bezogen.

**Tabelle 18: Oligonukleotid-Primer**

Name	Sequenz	Größe	Konzentration
<b>-1387 F</b> OB-pro-2F	5` CTTTTACAAATGTAGAAACC 3`	20-mer	50 pmol/ $\mu$ l
<b>-1387 R2</b> OB-pro-2R	5` AGGAGAATGGCTTGAACC 3`	18-mer	50 pmol/ $\mu$ l
<b>-2549 F</b>	5` AATGCAAATTTCTGTAATTTT 3`	22-mer	50 pmol/ $\mu$ l
<b>-2549-R</b>	5` ATGTTCAAAATTTATGTTTCCTC 3`	22-mer	50 pmol/ $\mu$ l

### 3. Geräte

Tabelle 19: Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
<b>DNA-Thermocycler</b>	Geneamp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
<b>DNA-Thermocycler</b>	Geneamp PCR-System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
<b>DNA-Thermocycler</b>	Touch Down	Hybaid
<b>Drehschieberpumpe</b>	RZ- 2	Vacuubrand, Gießen
<b>Horizontalelektrophorese</b>	GE-A2	AGS, Heidelberg
<b>Kamera</b>	GDS-System	Polaroid
<b>Kältefalle</b>	MC-2L	Uniequip, Frankreich
<b>Kühlzentrifuge</b>	Megafuge	Heraeus, Hanau
<b>Mikroliterspritze</b>	802, 25µl	Hamilton, USA
<b>Photometer</b>	Genequant II	Pharmacia/Biotech, Freiburg
<b>Pipetten</b>	Finn	Labsystem, Helsinki, Finnland
<b>Power Supply</b>	E 452	Consort, Turnhout, Belgien
<b>Schüttelwasserbad</b>	1083	GFL, Burgwedel
<b>UV-Lichtquelle Hoefel,</b>	Mighty Bright	San Francisco, USA
<b>Verticalelectrophorese</b>	SE 600	Hoefel, San Francisco, USA
<b>Vortex</b>	Minischüttler	IKA Works, Staufen
<b>Zentrifugen</b>	Biofuge 13/ Labofuge 400E	Heraeus, Hanau

## 4. Methoden

### 4.1. DNA-Extraktion

Um bestimmte **DNA-Fragmente** mittels PCR amplifizieren zu können, musste die DNA zunächst aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert werden. Dazu kann theoretisch jede Zelle verwendet werden, sofern sie einen Zellkern besitzt. In unserem Fall wurde die DNA aus den **Leukozyten** des Vollblutes (EDTA) gewonnen.

#### Durchführung der DNA-Extraktion

Die Durchführung erfolgte entsprechend einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988).

Dieses Protokoll ist für **10-25 ml Vollblut** geeignet. Zur DNA-Isolierung kann sowohl natives als auch tiefgefrorenes Vollblut verwendet werden. Eine höhere DNA Ausbeute ist jedoch mit nativem Blut zu erwarten.

In einem 50 ml Falcon-Tube wurden 10-20 ml Vollblut mit 30 ml eiskaltem Lysepuffer vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Leukozyten durch 10-minütige **Zentrifugation** bei 4°C und 4000 rpm (Ausschwingrotor #8155, Heraeus Megafuge 2.0 R) sedimentiert. Der Überstand wurde durch **Dekantieren** verworfen und das verbleibende Leukozytensediment mit 25 ml Lysepuffer gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Das Pellet wurde in 5,5 ml Aufnahmepuffer aufgelöst und über einen Zeitraum von 10-12 h bei 37°C schüttelnd im Wasserbad inkubiert. Um den proteolytischen Abbau weiter zu verstärken, schloss sich nach Zugabe von 5 ml Aufnahmepuffer eine weitere **Inkubation** für mindestens 10 min bei 55°C an. Die nun klare Lösung wurde mit 2,5 ml 5 M NaCl aufgefüllt und nach intensiver Durchmischung 15 min bei RT wie oben zentrifugiert. Der **Überstand** wurde in ein neues Falcon-Tube überführt und die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen abs. Ethanol gefällt. Die gefällte DNA konnte mit einem Glashaken aufgenommen und nach Schwenkung in 70 % Ethanol in TE-Puffer pH 8,0 bei 50° C 1 - 2 h im Wasserbad gelöst werden. Abschließend folgte eine **photometrische Konzentrationsbestimmung** der DNA im Spektralphotometer.

#### Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der im TE-Puffer gelösten DNA wurde photometrisch in

Quarzküvetten mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von **260 nm** bestimmt. Dazu wurde die DNA zunächst 1:200 verdünnt und die **Extinktion** dieser Lösung mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die DNA-Konzentration lässt sich dann nach folgender Formel berechnen:

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

Die DNA-Konzentration liegt üblicherweise zwischen 300 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  und der Quotient DNA / Protein sollte mindestens 1,5 betragen.

### **Verdünnungen und Lagerung**

Um die DNA in die PCR einsetzen zu können, mussten Verdünnungen hergestellt werden, so dass die DNA-Konzentration **100 ng/ $\mu\text{l}$**  betrug. Die Lagerung der DNA-Proben bei -20 bis -80° C machte eine Lagerung und Verwendung der Proben für mehrere Jahre möglich. Zur einfacheren Verarbeitung der Proben verteilte man die DNA-Verdünnungen auf **Mikrotiterplatten**. In jedes der 96 Wells einer Mikrotiterplatte wurden 6  $\mu\text{l}$  DNA-Verdünnung und 25 $\mu\text{l}$  aq injectabile pipettiert und bei -20°C tiefgefroren. Die Endkonzentration der DNA betrug in den Wells etwa 20 ng/ $\mu\text{l}$ .

## **4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

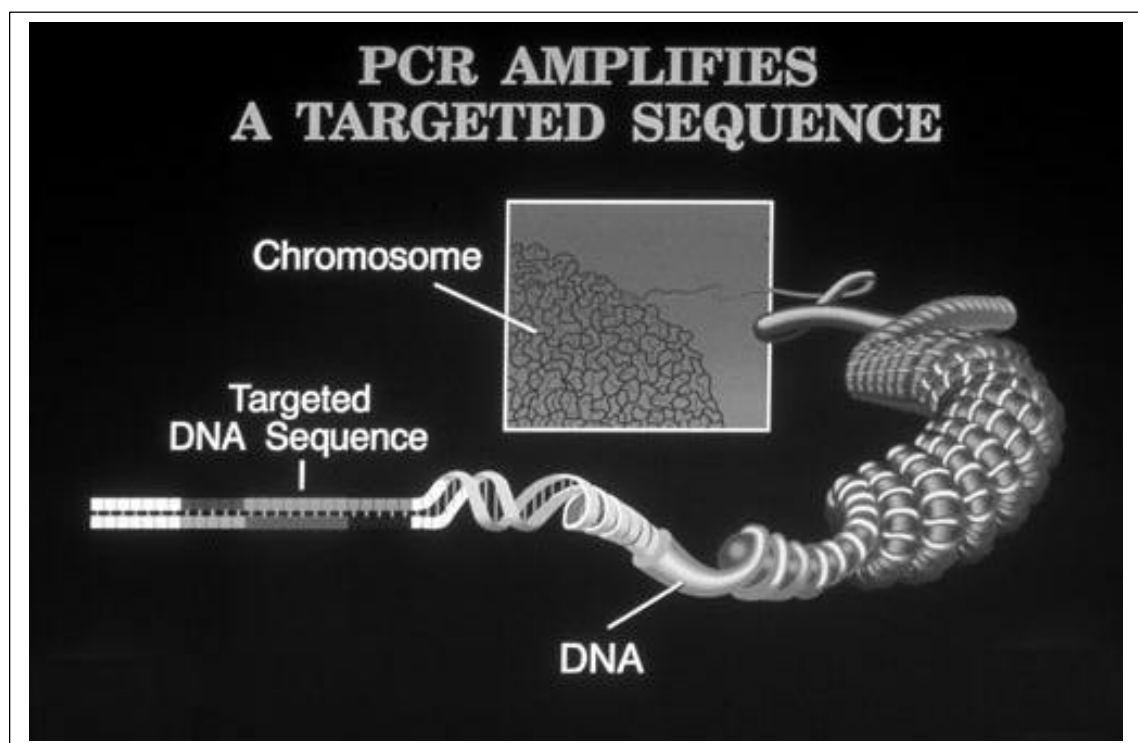
Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde 1983 von B. Mullis und seinen Mitarbeitern der Firma Cetus in Kalifornien entwickelt und wird seit 1987 kommerziell angeboten [Schimmel et al., 1990]. Das Verfahren der PCR erlaubt es definierte DNA-Sequenzen aus dem Genom zu amplifizieren. *In Vitro* war es möglich, ähnlich dem natürlichen zelleigenen DNA-Replikationsmechanismus selektiv Erbmaterial zu vervielfältigen [Strachan et al., 1996]. Dazu werden zunächst zwei kurze synthetische Oligonukleotide (Primer, Starter) konstruiert, die komplementär an jeweils ein Ende der Zielsequenz binden. Am jeweiligen 3'-OH-Ende dieser Primer kann im folgenden eine DNA-Polymerase den Kettenaufbau durch den Einbau von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) beginnen. Die zwischen den Primern liegende Zielsequenz wird somit kopiert [nach Schimmel, 1990].

Das Prinzip der DNA-Amplifikation mittels der PCR beruht auf der **zyklischen Wiederholung** (25-30 mal) von drei Phasen.



1. **Denaturierung** der DNA: Die beiden komplementären DNA-Doppelstränge werden durch Erhitzung auf 94°C thermisch getrennt [Volkenandt et al.,1990].
2. **Primer Annealing**: Anlagerung (Hybridisierung) von zwei zum jeweiligen Einzelstrang komplementären **Oligonukleotid-Primern** an die beiden Einzelstränge. Hierbei wird die Temperatur bis zu einer 'Annealing'-Temperatur gesenkt (ca. 50-60°C), die je nach Art und Länge des Primers spezifisch ist und so eine Bindung ermöglicht [Sambrook et al., 1989].
3. **DNA-Synthese**: Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, deren **Temperaturoptimum** bei etwa 72°C liegt, wird der DNA-Abschnitt zwischen den Primern entlang der Einzelstränge komplementär.

Abbildung 3: Polymerase Kettenreaktion (aus Immuno GmbH, 1991)



Nach Beendigung des **1. Zyklus** liegt somit die Kopie des DNA Doppelstranges im Bereich des gewählten Genbereiches vor. Diese Kopie und die Original-DNA dienen in den folgenden Zyklen, die entsprechend dem ersten Durchgang ablaufen, als **Matrize** zur weiteren DNA-Synthese. Somit vervielfältigt sich mit jedem Zyklus die ausgewählte Sequenz. Es findet bei n-Zyklen eine exponentielle Amplifikation auf das **2<sup>n</sup>-fache** der Start DNA-Menge statt. Das zyklische Erhitzen und Abkühlen

übernehmen computergesteuerte Thermostate. Die Dauer der Synthesephase richtet sich nach der Länge der Zielsequenz, da die *Taq*-Polymerase ~ 1 kb/min synthetisiert.

Zusätzlich zu DNA und Polymerase benötigt die Reaktion noch ein individuelles **Reaktionsmix**, in dem eine ausreichende Menge beider Primer, die vier Desoxynukleosidtriphosphate, Puffer (siehe Tab. 11) und die der jeweiligen PCR angepassten Zusätze (Tab. 14) enthalten sind.

**PCR-Optimierung:** Damit die Spezifität der PCR-Produkte und damit die erfolgreiche Durchführung nachfolgender Applikationen wie z.B. Mutationsdetektion oder Sequenzierung gewährleistet ist, müssen folgende Parameter beachtet werden:

1. Zur **Konstruktion der Primer:** Die **Größe** des Oligonukleotid-Primers sollte mindestens 19 Bp betragen, wobei tandemförmige Wiederholungen von einem oder mehreren Nukleotiden zu vermeiden sind. Ebenfalls sollten **komplementäre Sequenzen** zwischen dem Primerpaar und innerhalb des Primers vermieden werden, da anderenfalls Primerdimerbildung und Rückfaltung des Primers durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung gehäuft auftreten. Einen weiteren Punkt stellt der **G/C-Gehalt** des Oligonukleotid-Primers dar, der zur Optimierung zwischen 40 % und 60 % liegen sollte.

2. Die Konzentration der Primer ist sorgfältig zu testen, damit einerseits eine ausreichende Menge, andererseits eine ausreichende Spezifität des Amplifikats erreicht werden kann. Ersteres ist bei einer zu niedrigen Anfangskonzentration des Primers; zweiteres bei einer zu hohen Anfangskonzentration fragwürdig [Saiki et al.,1988].

3. Die DNA-Polymerase: Um die PCR automatisiert ablaufen lassen zu können, wird die hitzestabile *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72°C [Gelfand et al., 1990], daher sollte die Synthesephase bei dieser Temperatur ablaufen.

4. Die **Ionenkonzentration:** Die Denaturierung der DNA und die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotid-Primer (‘Annealing-Temperatur’) werden durch die Höhe der **Ionenkonzentration**, vor allem die der K<sup>+</sup>-und Mg<sup>2+</sup> - Ionen, und des pH-Wertes beeinflusst. Zusätzlich haben diese Faktoren einen Einfluss auf die

**enzymatische Aktivität** der Polymerase. Kationen schwächen durch Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyribose-Rückgrats die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen DNA-Strängen, so dass die Anlagerung des Primers an die Matrize verstärkt wird.

Zusätzlich stimuliert die **optimale K<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration** die Polymeraseaktivität und erhöht die Schmelztemperatur des DNA-Doppelstranges.

4. Zur Austestung des optimalen **Amplifikationspuffers** siehe Tabelle 14.

5. Variation der verschiedenen **Temperaturphasen**:

- **Denaturierung**: Bei hohem GC-Gehalt der Primersequenz sollte die Temperatur höher als unter Standardbedingungen gewählt werden.
- **Primer Annealing**: Je mehr Basenpaare der Primer enthält, desto höher wird die Temperatur gewählt. Für jeden Primer kann die charakteristische Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) mit der 2+4 Regel ermittelt werden. Im Idealfall sollte die 'annealing temperature' von Forward- und Reverse-Primer übereinstimmen.:

$$2 \times n_A + 2 \times n_T + 4 \times n_C + 4 \times n_G = T_M$$

n<sub>A</sub> Anzahl der A in einem Primer

n<sub>T</sub> Anzahl der T in einem Primer

n<sub>C</sub> Anzahl der C in einem Primer

n<sub>G</sub> Anzahl der G in einem Primer

- **Synthesephase**: Wie bereits erwähnt, synthetisiert die Taq-Polymerase mit der Geschwindigkeit von ~ 1 kb/min. Somit richtet sich die Dauer der Synthesephase nach der Länge der Zielsequenz.

Zur **Optimierung** kann die 'Annealing-Temperatur' in 1°C-Schritten reduziert werden und/oder die 'Annealing-Zeit' von 30 sek bis auf 15 sek so lange vermindert werden, bis man ein spezifisches PCR-Produkt erhält.

Die sich hieraus ergebenen **Standardbedingungen** für eine Reaktionslösung und einen Zyklusablauf sowie die Optimierungsergebnisse für die zu untersuchenden Genabschnitte **-2549** und **-1387** sind in den Tabellen 20 und 21 dargestellt.

**Tabelle 20 :** Zusammensetzung der Reaktionslösungen (50µl-Ansätze) für einen Standardansatz sowie für die Genabschnitte -2549 und -1387

Zusätze	Standardmenge	-2549	-1387
<b>DNA</b>	5 µl (Mikrotiterplatte)	5 µl (Mikrotiterplatte)	5 µl (Mikrotiterplatte)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	37,5 µl	37,5 µl	24 µl
<b>Puffer</b>	0,5 µl	0,5 µl	5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	---	0,5 µl	5 µl
<b>Master-Mix</b>	1 µl	---	---
<b>Primer F</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,56 µl
<b>Primer R</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,56 µl
<b>dNTP</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>Taq</b>	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
<b>Glycerol</b>	---	---	6,5 µl

**Tabelle 21:** Zyklusbedingungen für einen Standard abschnitt sowie für die Genabschnitte 2549 und -1387

Phase	Standard °C/t	-2549 °C/t	-1387 °C/t	Zyklen
<b>AD</b>	94-95 °C/3-5`	94 °C/5´	95 °C/5´	1
<b>D</b>	94-95 °C/30``	94 °C/30``	95 °C/30``	30
<b>A</b>	50-70 °C/30``	51 °C/30``	52 °C/30``	
<b>S</b>	72 °C/30``	72 °C/30``	72 °C/30``	
<b>ED</b>	4 °C/	4 °C/	4 °C/	1

Zeichenerklärung: AD: Anfangsdenaturierung, D: Denaturierung, A: Annealing, S: Synthese, ED: Endsynthese, : unendlich, °C: Grad Celsius, t: Zeit

Die Sequenz des Promoterbereichs bis ca. 3 kB vor dem Leptingen ist bekannt (bis – 2922 bp vor dem Start der Leptin mRNA; Gong et al., 1996). Diese Sequenz enthält mehrere **putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren**, u. a. für CCAAT/enhancer-binding protein, ein cAMP response element und ein Glukocorticoid responsives Element. Im Folgenden ist der Ausschnitt der Primärsequenz des Promoters des Leptingens dargestellt, in der die Primerbindungsstellen, die Gegenstand dieser Arbeit sind (**-2549 F**, **-2549 R** bzw. **Ob-pro-2 F (-1387 F)**, **Ob-pro-2 R2 (-1387 R2)**; s. Tab. 17) gesondert hervorgehoben sind. Darüberhinaus sind die untersuchten Polymorphismen (**-2549: C→A**, **-1387: G→A**) und Tanskriptionsfaktorbindungsstellen speziell markiert (**Sp-1**, **CREB**, **C/EBP**, **TATA**).

#### Ausschnitt der Primärsequenz des Leptingens (Promoter):

```

-2922 aagcttcttt aaggatggag aggccctagt ggaatgggga gattcttccgggagaagcga
-2862 tggatgcaca gttgggcatc cccacagacg gactggaaag aaaaaaggcctggaggaatc
-2802 aatgtgcaat gtatgtgtgt tccttggttc aagggtctggg aactttctctaaaggccag
-2742 gtagaaaaca ttttaggctt tctaagccaa ggcaaaattg aggatattacatgggtactt
-2682 atacaacaag aataaacaat ttacacaatt tttgttgac agaattcaaaactttataga
      [-2549 F]
-2622 cacagaaatg caaatttcct gtaattttcc cgtgagaact attcttcttttgttttgttt
      -2549 Mámme c-a      SP-1
-2562 tgcgacaggg ttgCctgat cctccgcct cagtctccct aagtgctgag atgttgacgg
      [-2549 R]
-2502 aagtcagggga ccccgaaacag agagatcggc tggagccgtg gcagaggaacataaattttg
-2442 aagatttcat tttaatatgg acacttatca gttcccaaataaacttttataatttttta
      CREB
-2382 tgcctgtctt tgctttaatc tcttaatcct gttatcttca taagctaaggatgtacgtca
      C/EBP
-2322 cctcaggacc actgtgataa ttgtgttaac tgtacagatt gattgcaaaacatgtgtgtt
-2262 tgaacaatat gaaatcagtg caccttgaaa aagagcagaa taacagcaattttttagggaa
-2202 caaggaaga caactataag gtctgactgc ctgctggggtc gggcaaaggagccatattt
-2142 ttcttcttgc agagagccta taaatagacc tgcaagtagg agagatattgctaatttctt
-2082 ttgctagcat ggaatattaa tattaacacc ctgggaaagg aatgcattcctggggggagg
-2022 tctataaatg gccgctctgg gaatgtctat cctacgcaac ggagataaggactgagatac
      SP-1
-1962 gccctggctc cctgcagtac cctcaggctt actagggtgg tgaaaaactccgccttggtta
-1902 aatttggtgt cagaccgtt ttctgctctc gaacactgtt ttctgttgtt taagatgttt
-1842 atcaagacaa tacgtgcaccgctgaacaca gacccttacc agtagttctc ctttttgccc

```



### 4.3. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle sind aufgrund negativer Ladungen der Phosphatgruppe jedes Nukleotids in der Summe negativ geladen. Deshalb wandert die DNA im elektrischen Feld auf die Anode zu. Bei der Agarosegelelektrophorese wird die negative Ladung der DNA-Fragmente benutzt, um PCR-Fragmente nach Größe (Basenpaaranzahl 200 bp - 50 Kb) zu trennen. Die Laufweite hängt von Art und Konzentration der Gelmatrix und ihrer Zusätze ab.

Die **Wanderungsgeschwindigkeit** hängt dabei von mehreren Faktoren ab:

1. **Molekülgröße:** Lineare doppelsträngige DNA wandert mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  der Anzahl der Basenpaare ist [Helling et al., 1974]. Folglich wandern kleinere Fragmente schneller als größere, und so erfolgt eine Auftrennung der PCR-Fragmente entsprechend ihrer jeweiligen Länge.
2. **Agarosekonzentration:** Zudem ändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle mit der Agarosekonzentration des Gels: je höher die Gelkonzentration, desto besser die Auftrennung der Fragmente.

Diese lineare Beziehung wird durch folgende Formel beschrieben:

$$\mathbf{Log \mu = log \mu_0 - Kr \gamma}$$

$\mu_0$  = frei elektrophoretische Beweglichkeit der DNA

Kr = Verzögerungskoeffizient

3. **Angelegte Spannung:** Schließlich ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente auch noch proportional zur angelegten Spannung. Da die Gelmatrix eine zufällige Diffusion der Moleküle verringert, bilden sich konkrete Banden aus den PCR-Fragmenten.
4. **Konformation (Tertiärstruktur) der DNA**
5. **Interkalierender Farbstoff:** Die Einlagerung von Ethidiumbromid als Farbstoff in die DNA reduziert die Wanderungsgeschwindigkeit um bis zu 15 %. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ermöglicht die DNA-Fragmente optisch sichtbar zu machen, indem er zwischen die Basen interkaliert, das UV-Licht bei 302nm absorbiert und als orange-rotes Licht der Wellenlänge 590nm emittiert [Sambrock et al., 1989].

**Vorbereitung und Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese:**

Zunächst wurde Agarose mit 1 x TAE mehrmals aufgeköcht bis sich die Agarose gelöst hatte. Diese Lösung wurde nach leichtem Abkühlen unter einem Laborabzug mit dem Farbstoff **Ethidiumbromid** versetzt. Nach erneutem Mischen wurde die Lösung in einen mit Kämmen und Seitenabdichtungen vorbereiteten Schlitten gegossen, wobei Lufteinschlüsse im Gel vermieden werden mussten. Durch die nach einigen Minuten erstarrende Agarose entstand eine **Matrix**, die in ihrer Dichte der jeweilig eingesetzten Agarosekonzentration entsprach (siehe Tab. 22). Das auspolimerisierte Agarose-Gel wurde nach Entfernen der Kämmen in einer mit **Elektrophoresepuffer** (1x TAE) gefüllten Kammer gelegt und beladen.

5-10 µl PCR-Produkt wurden dazu mit 5µl Ladungspuffer vermischt und mit einer Mikropipette in die Geltaschen gefüllt. Als **Längenkontrolle** ließ man 1,2 µl einer Verdünnung des 123-bp-Größenmarkers mitlaufen

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde ein 2,5 %-iges Agarosegel verwendet, während für die DNA-Digestion ein 3,5 %-iges Gel bessere Ergebnisse lieferte.

**Tabelle 22: Rezeptur der Agarosegelmatrix**

<b>Zusätze</b>	<b>Menge für 2,5 %</b>	<b>Menge für 3,5 %</b>
<b>Agarose</b>	5g	7g
<b>1 x TAE</b>	auf 200 ml auffüllen	auf 200 ml auffüllen
<b>Ethidiumbromid</b>	16 µl	16 µl



#### 4.4. Allgemeines Verfahren der Digestion

Diese Methode des Mutationsnachweises nutzt die Eigenschaft von Restriktionsenzymen die DNA an spezifischen Stellen zu erkennen (meist Palindrome), und durch Hydrolysierung einer Phosphodiesterbindung zu schneiden.

Bakterielle **Restriktionsenzyme**, die man zur Digestion von DNA verwendet, dienen ursprünglich Prokaryonten dazu, organismusfremde DNA-Fragmente zu erkennen und zu zerschneiden, um die Bakterien vor Infektionsfolgen durch fremdes Genmaterial (z.B. von Bakteriophagen) zu schützen. Das Wissen um die spezifischen Schnittstellen vieler Restriktionsenzyme ermöglicht es bei bekanntem Mutationsort eine Mutationsdetektion durchzuführen (**Restriktionslängen-polymorphismus**) [Strachan et al., 1996].

Durch eine Mutation in der DNA kann sowohl eine neue Schnittstelle generiert werden, oder eine bisher bekannte entfallen. Führt man im Anschluss einer Digestion zwischen Mutationsträger und Wildtypträger eine Trennung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese durch, so können unterschiedliche Fragmentlängen detektiert werden.

Zur **Durchführung** der DNA-Digestion: Zunächst werden Primer konstruiert, die die polymorphe Restriktionsschnittstelle einrahmen. Mittels PCR kann dann der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird mit einem Reaktionsmix gemischt und zusammen bei enzymespezifischer Temperatur und Zeitdauer inkubiert. Anschließend hieran werden die entstandenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt und sichtbar gemacht [Sambrook et al., 1989].

Tabelle 23: Reaktionsmix zur DNA-Digestion

Zusätze	Menge /DNA-Ansatz
H <sub>2</sub> O	11,8 µl
Puffer	3 µl
Enzym	0,2 µl
Summe	15 µl

#### 4.5. Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)

Die SSCA ist eine molekulargenetische Methode, um nach neuen und bereits beschriebenen Mutationen zu fahnden [Orita et al., 1989]. Intermolekulare Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindung, Van der Waal` Kräfte), bewirken, dass sich denaturierte DNA-Einzelstränge *polymorph* räumlich falten und dadurch zu unterscheiden sind. Setzt man eine Mutation voraus, so kann sich die Konformation dieses Einzelstranges ändern und durch ihre, vom Wildtyp abweichende, elektrophoretische Mobilität im Gel auffallen. Die einfache labortechnische Durchführbarkeit und die Möglichkeit große Kollektive relativ schnell und empfindlich auf Mutationen hin zu untersuchen, haben dieser Methode weitverbreitete Anwendung verschafft.

Für eine SSCA werden amplifizierte DNA-Proben denaturiert und auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. DNA-Stränge unterschiedlicher Basensequenz zeigen somit unterschiedliche Laufeigenschaften. Dies kann anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht werden [nach Pharmacia Biotechnology; Strachan et al., 1996].

Zur **Durchführung**: Gemäß Herstelleranleitung [Verticalelektrophorese SE 6, Hoefer] wird die Gießvorrichtung zusammengesetzt, nachdem die beiden sauberen Gießplatten mit wasserabweisender *Acrylease* (Stratagene, Heidelberg) präpariert worden sind. Entscheidend ist die Sauberkeit der Glasplatten, damit eine Luftblasenbildung beim Gießen verhindert wird. Aus diesem Grunde werden sie zunächst gründlich mit Seifenwasser gereinigt, intermittierend mit destilliertem Wasser gespült, mit Isopropanol weiterbehandelt, um abschließend erneut mit destilliertem Wasser gespült zu werden. Sorgfältig ist darauf zu achten, dass die Platten bündig in den Gießstand eingespannt werden, um ein Auslaufen zu verhindern.

Zur Erstellung des **Polyacrylamid-Gels** werden folgende Zusätze benötigt:

- Acrylamid (40%), Pharmacia
- Bisacrylamid (2%), Pharmacia
- 10 x TBE
- Bidestilliertes Wasser
- APS (10%)
- TEMED

Um optimale Ergebnisse zu erhalten, müssen Parameter der Methode wie Gelkonzentration, etwaige Zusätze und Temperaturverhältnisse dem jeweiligen DNA-Fragment angepasst werden. Für das in dieser Arbeit zu untersuchende Fragment, - **1387**, welches 228 bp groß ist, stellten sich nach umfangreichen Testungen folgende Bedingungen als optimal heraus:

- Polyacrylamid-Gel: 12%
- Zusatz: PEG
- Temperatur: Raumtemperatur und 4 °C

[nach Markoff et al., 1997]

Das Polyacrylamid-Gel setzt sich daher wie folgt zusammen:

**Tabelle 24: Rezept des 12%-igen Polyacrylamid-Gels**

Chemikalien	Menge/Gel	Endkonzentration
<b>Acrylamid (40%)</b>	9 ml	12 %
<b>Bisacrylamid (2%)</b>	3,6 ml	0,24 %
<b>10 x TBE</b>	1,5 ml	0,5 x TBE
<b>PEG</b>	0,3 ml	0,01%
<b>Bidestilliertes Wasser</b>	auf 30 ml	
<b>APS (10%)</b>	280 µl	
<b>TEMED</b>	18 µl	

Unter dem Abzug wird das 12%-ige Polyacrylamidgel gegossen und härtet nach Zugabe der Polymerisierungsstarter (*APS* & *TEMED*) ~3 Stunden aus. *APS* bewirkt eine Freisetzung freier Radikale, die durch *TEMED* stabilisiert werden. Die Radikale starten kettenreaktionsartig die Polymerbildung, indem sie die *Acrylamidmonomere* zu langen Ketten auspolymerisieren, die zeitgleich räumlich durch das *Bisacrylamid* vernetzt werden. Vor allem das Verhältnis der Acryl- und Bisacrylamidkonzentrationen zueinander bestimmt die spätere „Porengröße“ des auspolymerisierten Kunststoffgeles [Sambrock,1989].

Zur Beladung werden die Proben mit 3,5 µl destilliertem Wasser und 8 µl SSCA-Ladungspuffer (siehe Tab. 9 b) versetzt und für **5 Minuten bei 95°C** denaturiert. Im Anschluss daran werden die Proben sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der Einzelstränge zu vermeiden. Nun wird der Kamm aus dem Gel entfernt, die

entstandenen Taschen mit 0,5 x TBE gespült und hiernach mit 4-5 µl der Proben beladen. Das Gel kann jetzt in eine mit Laufpuffer (0,5 x TBE) gefüllte Kammer gehängt werden. Es läuft bei Raumtemperatur oder bei 4°C und 200 V über Nacht. Am nächsten Morgen folgt die Silberfärbung. Die Schrittabfolge der Färbung ist in Tabelle 24 dargestellt.

**Tabelle 25: Silberfärbung der SSCA-Gele**

Schritte	Chemikalien	Menge/Gel	Zeit/Min.	Funktion
1.	10 % Ethanol 0,5 % Eisessig Bidest	25 ml 1,25 ml Σ 250 ml	mind. 5	Lösung des Gels von den Platten, Fixierung
2.	1 % Salpetersäure (65 %) Bidest	4 ml Σ 250 ml	10	Oxidierung
3.	Bidest	250 ml	1	Spülen
4.	12 mM AgNO <sub>3</sub> (10x) Bidest	25 ml 225 ml	20-30	Färbung
5.	Bidest	250 ml	1	Spülen
6.	280 mM NaCO <sub>3</sub> (5 x) 0,019 % Formaldehyd (37%) Bidest	100 ml 255 µl Σ 500 ml	~ 20	Entwicklung der Bandenfärbung
7.	10 % Eisessig Bidest	25 ml 225 ml	5	Stoppen der Entwicklung
8.	Glycerol Bidest	~ 5 ml ~ 250 ml	mind. 5	Erhaltung der Färbung

Zeichenerklärung: Σ: Summe; mind.: mindestens

Anschließend wird das Gel auf einem Filterpapier mittels Drehschiebervakuumpumpe für 2-3 Stunden getrocknet.

## 5. Statistische Auswertungen

Die Begriffe **Kopplung** und **Assoziation** stehen für zwei unterschiedliche statistische Beschreibungen: „Kopplung ist eine Beziehung zwischen *Loci*, die Assoziation ist aber die Beziehung zwischen *Allelen*. Kopplung beschreibt also die Nachbarschaft von Loci und die daraus resultierende gemeinsame Segregation. Assoziation bedeutet, dass Personen in einer Population, die an einem Locus ein bestimmtes Allel haben, mit höherer Wahrscheinlichkeit als zufällig ein bestimmtes anderes Allel an einem weiteren Locus besitzen“ [Buselmaier et al., 1999, S. 246].

Assoziation zwischen einem Phänotyp und einem Allel kann man mit **Fall-Kontrollstudien** untersuchen. Dabei werden die Häufigkeiten eines bestimmten Allels in jeweils einer Anzahl von Patienten und nicht betroffenen Kontrollpersonen verglichen. Das Kopplungsungleichgewicht beschreibt die Verknüpfung eines bestimmten Allels mit einem gekoppelten Krankheitslocus in der Population. Ein Kopplungsungleichgewicht lässt sich im Hinblick auf eine Mutation z. B. finden, wenn viele der Patienten die chromosomale Region von einem gemeinsamen Vorfahren geerbt haben [Buselmaier et al., 1999].

Eine Assoziation eines Allels (A) zu einer Krankheit (D) kann verschiedene Ursachen haben:

1. Das Allel A verursacht direkt eine Anfälligkeit für D (d. h. der Besitz von A erhöht die Wahrscheinlichkeit, Krankheit D zu entwickeln).
2. Eine sehr enge Kopplung kann zu Allelassoziationen auf Populationsebene führen. Ist ein Kopplungsungleichgewicht die Ursache einer Assoziation, kann nahe dem A-Locus nach einem Gen gesucht werden, das bei erkrankten Menschen mutiert ist. Dieses spezielle Allel am A-Locus, das mit der Krankheit D assoziiert ist, kann dabei in unterschiedlichen Populationen jeweils ein anderes sein.
3. Menschen mit Krankheit und solche ohne können verschiedenen genetischen Untergruppen der Bevölkerung entstammen, die eine unterschiedliche Häufigkeit für das Allel A aufweisen (Populationsstratifikation oder –schichtung) [Strachan et al., 1996].

Die Berechnung der Assoziationstests erfolgte mit dem exakten Test nach Fischer (zur Herleitung siehe Rüger, 1996).

Probleme der Assoziationsstudien:

- Auswahl der Kontrollgruppe: Da es möglich ist, dass verschiedene genetische Untergruppen vorhanden sind, können Kopplungsungleichgewicht und Populationsschichtung oft schlecht voneinander unterschieden werden.
- Wird ein Locus auf verschiedene Fragestellungen hin getestet, können aufgrund der Anwendung ungeeigneter Korrekturmaßnahmen ungenaue statistische Analysen entstehen [Strachan et al., 1996].

Ein neueres statistisches Testverfahren ist der „**Transmission disequilibrium test**“ (TDT) [Spielmann et al., 1993]. Mit dem TDT kann ein Transmissionsungleichgewicht überprüft werden. Er weist Assoziation und Kopplung in einem Test nach.

**Theorie** des TDT: Eines der beiden Markerallele eines Elternteils wird an jeden betroffenen Nachkommen weitergegeben, eines nicht. Es werden die Häufigkeiten des Markerallels unter den weitergegebenen und den nicht weitergegebenen Allelen verglichen. Dies kann mit Hilfe einer Vier-Felder-Tafel ausgewertet werden (siehe Tabelle 32).

**Tabelle 26: Vier-Felder-Tafel zur Bestimmung der Häufigkeit weitergebener und nicht weitergebener Allele beim TDT.**

	nicht transmittiert	
	WT	MT
transmittiert	WT	a      b
	MT	c      d

Zeichenerklärung: WT: Wildtypallel, MT: Allel mit Mutation

Informativ sind dabei nur Familien, in denen mindestens ein Elternteil am Markerlocus für das mutmaßlich mit der Krankheit assoziierte Markerallel heterozygot ist. Das

Problem der Populationsschichtung wird in diesem Testverfahren umgangen, indem nur Trios (der Proband und seine Eltern) untersucht werden. Die elterlichen nicht transmittierten Allele dienen dabei als „interne Kontrollen“.

Ob eine signifikante Assoziation vorliegt, kann dann mit dem  $\chi^2$ -Test überprüft werden:

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

**Nachteile** des TDT:

- Auch beim TDT können Assoziationen, die durch Kopplungsungleichgewichte verursacht werden, nicht von solchen unterschieden werden, bei denen der Marker selbst funktionelle Relevanz hat (ein „Anfälligkeitsfaktor“ ist).
- Der Test ist arbeitsaufwendiger als die üblichen Fall-Kontroll-Studien, da aus jeder Familie drei Mitglieder typisiert werden müssen (statt Patient und Kontrolle).
- Die Eltern des Probanden müssen zur Verfügung stehen; dies kann besonders bei Krankheiten, die erst spät auftreten, ein Problem sein.

Da jeder durchgeführte Test ein eigenes Risiko für ein falsch positives Ergebnis in sich birgt, ist bei der Testung eines Genlocus auf verschiedene Fragestellungen hin eine angemessene Korrektur für ein aussagekräftiges statistisches Ergebnis notwendig. Dazu eignet sich das **Bonferroni-Korrekturverfahren** [Kidd et al., 1984]. Während üblicherweise der Grenzwert für ein signifikantes Ergebnis mit  $p \leq 0,05$  angegeben wird, gilt hiernach  $p \geq 0,05/n$  ( $n$  = Zahl der unabhängigen möglichen Assoziationen, die geprüft werden) [Spielmann et al., 1998; Strachan et al., 1996].

## 6. Ethikantrag

Die molekulargenetischen Arbeiten sind durch die *Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg* genehmigt worden.

---

## ERGEBNISSE

Es wurden zwei Polymorphismen im erweiterten Promoterbereich des Leptingens (Position **-2549 (C/A)** und **-1387 (G/A)**) mittels unterschiedlicher Untersuchungsmethoden (**DNA-Digestion, SSCA**) auf eine Assoziation mit dem Phänotyp der Anorexia nervosa untersucht. Dazu wurden die Allelfrequenzen in einem ausgesuchten Extremkollektiv und normal- bzw. untergewichtigen Kontrollgruppen bestimmt und die Allelweitergabe von Eltern an ihre Kinder mittels TDT ermittelt. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsschritte werden im folgenden dargestellt.

### 1. Untersuchung des Polymorphismus der Position **-2549** mittels **DNA-Digestion**

#### 1.1. PCR-Optimierung

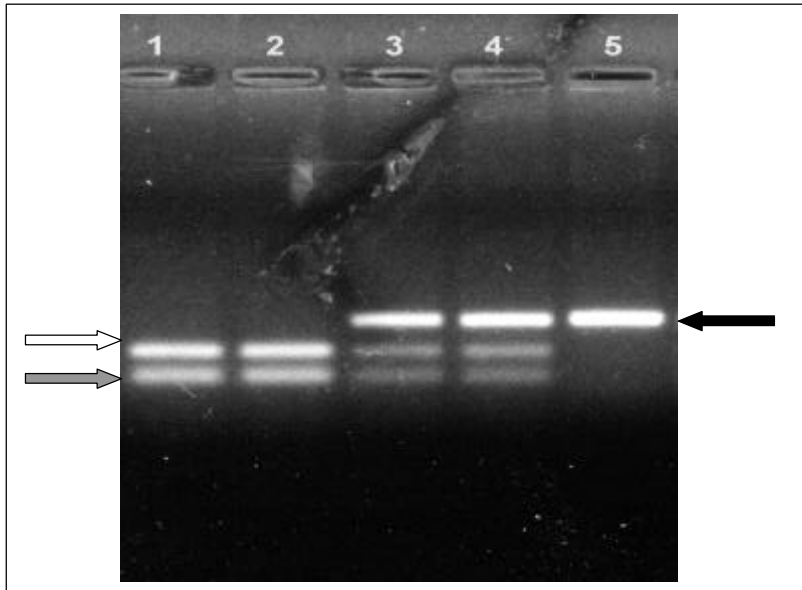
Die Ergebnisse der PCR-Optimierung für den Genabschnitt **-2549** sind in den Tabellen 20 und 21 dargestellt.

Die Überprüfung der PCR-Reaktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.3.), wobei ein **2,5 %-iges** Agarosegel (siehe Tabelle 22) gute Ergebnisse lieferte.

#### 1.2. DNA- Digestion

Zur DNA-Digestion wurde das Restriktionsenzym **Hin 6.1** (siehe Tabelle 16) eingesetzt, da der Basenaustausch an der Position **-2549** in der Erkennungssequenz dieses Enzyms liegt. **Hin 6.1** kann das mutierte Allel nicht schneiden. Wohl aber das wildtypische. Um optimale Bedingungen für das Enzym zu schaffen, wurde der Puffer Violett (siehe Tabelle 10) eingesetzt und die Mixtur bei **37°C** für mindestens 3 Stunden inkubiert [Eurogentec]. Für die Darstellung der aufgetrennten DNA-Fragmente erwies sich ein **3,5 %-iges** Agarosegel (siehe Tabelle 22) als optimal. Abbildung 2 zeigt die mittels Agarosegelelektrophorese getrennten und mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente des Polymorphismus der Position **-2549** im Promoter des Leptingens.





**Abbildung 4:** DNA-Digestion des Polymorphismus der Position  $-2549$  (C/A) im Promoterbereich des Leptingens. Insgesamt hat das Fragment eine Größe von 181 bp, das Enzym schneidet das Wildtypallel (C) in zwei Fragmente der Größe 110 bp und 71 bp. Das mutierte Allel (A) wird dagegen nicht geschnitten. Der weiße Pfeil zeigt auf die 110 bp-Fragmente, der graue auf die 71 bp-Fragmente und der schwarze auf die 181 bp-Fragmente. Spalten 1 und 2: homozygot für das Wildtypallel, Spalten 3 und 4 : heterozygote Träger, Spalte 5: homozygote Träger

### 1.3. Genotyp und Allelfrequenzen

Tabelle 27 zeigt die prozentualen Genotyp- und Allelverteilungen in der untersuchten Probandengruppe.

**Tabelle 27:** Genotyp- und Allel-Frequenzen des Polymorphismus der Position  $-2549$  (C/A) im Promoter des Leptingens bei Patientinnen mit Anorexia nervosa und untergewichtigen Studenten

Studienkollektiv	Genotyp-Frequenzen			Allel-Frequenzen	
	C/C (%)	C/A (%)	A/A (%)	C (%)	A (%)
<b>Patientinnen mit Anorexia nervosa (n = 55)</b>	9 (16,36)	32 (58,18)	14 (25,45)	50 (45,45)	60 (54,55)
<b>Untergewichtige Studenten (n = 131)</b>	39 (29,77)	65 (49,62)	27 (20,61)	143 (54,58)	119 (45,42)

Der  $\chi^2$ -Test (Anorexia versus Untergewicht der Allelfrequenzen) ergibt einen nominellen **p-Wert** von **0,14**. Um den beobachteten Unterschied in den Allelfrequenzen besser beurteilen zu können, sollte eine weitere unabhängige Studie durchgeführt werden. Damit der vorliegende Unterschied in den Allelfrequenzen mit einer Power von 90% bei einem einseitigen Test zum 5% Niveau entdeckt werden kann, werden für eine solche Studie je **256** Anorexie-Patientinnen und Kontrollen benötigt. Trotz der deutlichen Differenzen in den Allelfrequenzen kann bei den vorliegenden Fallzahlen eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus der Position –2549 und dem Phänotyp Anorexie nicht statistisch abgesichert werden.

#### 1.4. Transmission disequilibrium test (TDT)

Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse des TDT, der in diesem Fall die Transmissionsrate des C-Allels des Polymorphismus der Position –2549 (C/A) heterozygoter Eltern auf ihr Kind untersucht. Ausgewertet wurden 61 Trios (Patientinnen mit Anorexia nervosa und deren Eltern).

**Tabelle 28:** TDT für das A-Allel des Polymorphismus der Position –2549 (C/A) im Promoter des Leptingens, untersucht in Trios, die aus einer Patientin mit Anorexia nervosa und deren Eltern bestehen (Gesamtfallzahl  $n = 106$ ; effektive Fallzahl  $n = 61$ ).

Kollektivgruppe	Transmittiert/ nicht transmittiert	Transmissions- Rate	Nominaler p-Wert
Trios aus Patientinnen mit Anorexia nervosa (Indexpatientinnen) und deren Eltern ( $n = 61$ )	<b>58/48</b>	<b>54,72%</b>	<b>0,71</b>

Der  $\chi^2$ -Test ergibt hier einen p-Wert von **0,71**. Die beobachtete, leicht erhöhte Transmissionsrate für das A-Allel kann also wegen der geringen Fallzahl nicht als statistisch signifikant eingestuft werden. Der TDT zeigt somit ein ähnliches Ergebnis wie der Assoziationstest.

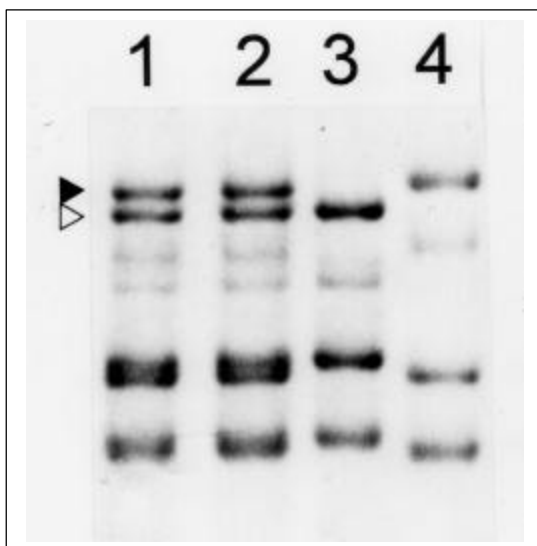
## 2. Untersuchung des Polymorphismus der Position -1387 mittels SSCA

### 2.1. PCR-Optimierung

Die Ergebnisse der PCR-Optimierung sind wiederum in den Tabellen 20 und 21 dargestellt. Auch hier ließ sich die PCR-Reaktion mittels Agarosegelelektrophorese (2,5 %-iges Gel) gut überprüfen.

### 2.2. SSCA-Optimierung

Um optimale Ergebnisse zu bekommen, ist eine Anpassung der Bedingungen, wie z. B. der Gelkonzentration, der Zusätze und der Temperatur an das jeweilige DNA-Fragment wichtig. Die für das 228 bp große Fragment der Position -1387 im Promoter des Leptingens optimalen Bedingungen sind in Abschnitt 4.5. und Tabelle 24 dargestellt. Abbildung 5 zeigt die mittels SSCA aufgetrennten Fragmente des Polymorphismus G/A der Position -1387 im Promoter des Leptingens:



**Abbildung 5:** Mittels SSCA im 12 %-igen Polyacrylamid-Gel bei Raumtemperatur aufgetrennte und mittels Silberfärbung sichtbar gemachte DNA-Fragmente (228 bp) des Polymorphismus (G/A) der Position -1387 im Promoter des Leptingens. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Basensequenzen ergeben sich verschiedene Faltungsformen. Diese bewegen sich im elektrischen Feld unterschiedlich schnell. Der schwarze Pfeil zeigt auf das G-Allel, der weiße auf das A-Allel. Spalte 1 und 2: Heterozygot (G/A), Spalte 3: Homozygot (A/A), Spalte 4: Homozygot Wildtyp (G/G).

### 2.3. Genotyp- und Allelfrequenzen

Tabelle 29 zeigt die prozentualen Genotyp- und Allelverteilungen in dem untersuchten Kollektiv.

**Tabelle 29:** Genotyp- und Allel-Frequenzen des Polymorphismus (G/A) der Position -1387 im Promoter des Leptingens, bei Patientinnen mit Anorexia nervosa, untergewichtigen Studenten und normalgewichtigen Kontrollen.

Studienkollektiv	Genotyp-Frequenzen			Allel-Frequenzen	
	G/G (%)	G/A (%)	A/A (%)	G (%)	A (%)
<b>Patientinnen mit Anorexia nervosa (n=115)</b>	26 (22,61)	59 (51,30)	30 (26,09)	111 (48,26)	119 (51,74)
<b>Untergewichtige Studenten (n = 141)</b>	34 (24,11)	63 (44,68)	44 (31,21)	131 (46,45)	151 (53,55)
<b>normalgewichtige Kontrollen (n = 50)</b>	16 (32,0)	21 (42,0)	13 (26,0)	53 (53)	47 (47)

Der  $\chi^2$ -Test auf Assoziation zwischen dem Polymorphismus an Stelle -1378 verglichen zu den Allelfrequenzen zwischen 115 Anorexia nervosa Patientinnen, 141 untergewichtigen und 50 normalgewichtigen Probanden ergab keinerlei Hinweis auf Assoziation. Ein signifikantes Testergebnis liegt bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  vor. Bei p-Werten  $> 0,61$  konnte ausgeschlossen werden, dass der Polymorphismus der Position -1387 zu einer der untersuchten Gewichtsklassen assoziiert ist.

## 2.4. Transmission disequilibrium test (TDT)

Tabelle 30 zeigt die Transmissionsrate des G-Allels des Polymorphismus (G/A) der Position -1387 (im Promoter des Leptingens) heterozygoter Eltern auf ihr Kind. Ausgewertet wurden dabei 61 Trios, bestehend aus einer Patientin mit Anorexia nervosa und deren Eltern. Die Arbeitsgruppe um Comings (1996) beschrieb zuvor eine signifikante Korrelation, zwischen Allelen eines Mikrosatellitenmarkers, der das Leptingen flankiert und dem BMI. Es zeigte sich bei den weiblichen Probanden eine etwas stärkere Korrelation, als bei den männlichen [Comings et al., 1996].

**Tabelle 30:** TDT des A-Allels des Polymorphismus (G/A) der Position -1387 im Promoter des Leptingens bei 54 Trios (effektive Fallzahl  $n$ ), bestehend aus Patientinnen mit Anorexia nervosa und ihren Eltern (Gesamtfallzahl  $n = 104$ ).

Kollektivgruppe	Transmittiert/ nicht transmittiert	Transmissions- Rate	Nominaler p-Wert
Trios von weiblichen Kindern und Jugendlichen mit Anorexia nervosa und deren Eltern ( $n = 54$ )	<b>24/30</b>	<b>44,4%</b>	<b>0,41</b>

Da der p-Wert  $> 0,05$  ist, gibt es bei 54 Trios, bestehend aus einer Patientin mit Anorexia nervosa und deren Eltern, keinen Beweis für ein Ungleichgewicht in der Allelverteilung. Die Variante an Position -1387 zeigt kein Transmissionsungleichgewicht bei AN.

---

## DISKUSSION

### 1. Zusammenfassende Darstellung der bisherigen Erkenntnisse

Anorexia nervosa ist ein Syndrom unbekannter Ätiologie, welches durch extremen Gewichtsverlust, Körperschemastörung, psychopathologische Auffälligkeiten und gravierende endokrine Imbalancen gekennzeichnet ist. Der entwicklungsgeschichtliche Hintergrund dieser Essstörung wird in einer Kombination von biologischen, kulturellen, familiären und intrapsychischen Faktoren gesehen. Die Anorexia nervosa ist neben der Toxikomanie mit der höchsten Letalität aller psychiatrischen Störungen verbunden [Herpetz et al., 2001]. Daneben komplizieren schwerwiegende psychopathologische Auffälligkeiten wie Depression, Suchtanfälligkeit und zwanghafte Verhaltensmuster oft chronische Krankheitsverläufe.

Der Hypothalamus stellt die zentrale Ziel- und Schaltebene dar, welche vom übrigen Zentralnervensystem und aus der Peripherie Hunger- und Sättigungssignale erhält und verarbeitet. Der Körper reagiert physiologischerweise auf anhaltende Semi-Starvation mit multiplen endokrin-metabolischen Umstellungen mit dem Ziel der Beibehaltung der Energiehomöostase durch Konservierung der Energievalenzen (siehe Kapitel 3.2.). Ein Beispiel hierfür liefert die hypothalamische Amenorrhö, die zwar ein Diagnosekriterium der Anorexia nervosa ist, aber ebenso physiologischerweise auftritt und auf einem Abfall der Gonadotropine LH und FSH basiert. Es handelt sich somit um eine Adaptation, also um einen sekundären Vorgang, der durch äußere Umstände (keine Nahrungsverfügbarkeit) vorgegeben ist. Hierbei zeichnen sich erhebliche Unterschiede zur Anorexia nervosa ab, denn bei dieser Krankheit scheint die Nahrungsrestriktion einem „**Inneren Zwang**“ zu folgen.

Der **Kandidatengenansatz** hat sich zur Erforschung der Gewichtsregulation bewährt. Monogene Formen der Adipositas beim Menschen, und Beobachtungen aus transgenen Tiermodellen mit syndromaler Adipositas haben gezeigt, dass bestimmte Gene an der Gewichtsregulation beteiligt sind.

Bei sehr hoher Plausibilität eines Kandidatengens ist ein **direktes Mutationsscreening** erfolgversprechend. Insbesondere, wenn spezifische biochemische Anomalien bei Einzelpersonen gefunden werden (z. B. hohe Proinsulinspiegel bei Mutationen im Carboxypeptidase E Gen). Derartige Befundkonstellationen sind bei der Anorexia nervosa nach heutigen Erkenntnissen bislang nicht detektiert worden.

Die Entdeckung des *obese*-Gens und seines Genproduktes Leptin stellte die Identifizierung eines Kandidatengenes dar. Schnell wurde es Gegenstand intensiver Erforschung von Gewichtsregulation und Energiehomöostase [Zhang et al., 1994]. Das Proteohormon schließt eine Rückkopplungsschleife vom peripheren Fettgewebe zur hypothalamisch-hypophysären- neuroendokrinen Achse.

Ansteigende zentrale Leptinspiegel signalisieren ein Sättigungsgefühl und führen zu einer verminderten Nahrungsaufnahme. Daneben hat Leptin weitere bemerkenswerte metabolisch-anorexigene Eigenschaften, indem es einen erhöhten Energieverbrauch beispielsweise durch Stimulation von Lipolyse, Sympathikus und Thermogenese, induziert. Hypothalamische Neuronen, die Corticotropin und Melanocortin synthetisieren und sezernieren, sind wahrscheinlich die ausführenden Bahnen (Efferenzen).

Wie bereits erwähnt (siehe Einleitung 4.4.), weisen Patientinnen mit Anorexia nervosa erniedrigte Leptinspiegel auf. Dementsprechend müssten sie ein starkes Hungergefühl verspüren, welches jedoch nicht angegeben wird. Möglicher pathologischer Hintergrund könnte eine Leptinrezeptorüberempfindlichkeit sein. Dies wäre eine singuläre und damit einfache Erklärung. Viel wahrscheinlicher erscheinen Defekte bzw. „Imbalancen“ in nachgeschalteten Regelkreisen, die das Leptinsignal unnatürlich verstärken, bzw. ungenügend abschwächen. Ebenso könnte ein Übermaß an Nahrungsaufnahmestimulierenden (**orexigenen**) und Nahrungsaufnahme-inhibierenden (**anorexigenen**) Effekten gleichzeitig zu einem Versagen des Regulierungsprozesses zwischen Hunger und Sättigung führen. Möglicherweise ist die eigentliche Störung übergeordneter Natur. So könnten Kortikale Prozesse die hypothalamische Regulation des Körpergewichts übersteuern.

**Kopplungsbefunde** zum Leptingen [Reed et al., 1996; Clément et al., 1996] und zum Leptinrezeptorgen [Chagnon et al., 1998] begründeten den Verdacht auf Mutationen, die mit dem Phänotyp der Adipositas assoziiert sein könnten. Kopplungsanalysen der Klinischen Forschergruppe [Roth et al., 1997], die auf einem zuvor von Reed et al. (1996) identifizierten Haplotyp basierten, ergaben ein Transmissionsungleichgewicht (Transmissionsrate: 65,7 %). Dieser Haplotyp wird demnach von heterozygoten Eltern häufiger an ihr extrem adipöses Kind weitergegeben als es der Zufall erklären könnte.

Ein wissenschaftlicher Ansatz ist es, die Anorexia nervosa als **entgegengesetztes Gewichtsextrem** zur Adipositas zu betrachten. Wie bei der Adipositas bereits belegt [Montague et al., 1997], könnten ebenfalls bei diesem Krankheitsbild Mutationen im

Leptingen seinem Promoter oder Rezeptor zu dem anorektischem Phänotyp mit beitragen.

## 2. Darstellung der untersuchten Genabschnitte

Ein Bereich des Leptingens, der zur Klärung der Untersuchungsergebnisse von Roth et al. [1997] wichtig war, ist der **Promoter** des Leptingens. Dieser Bereich liegt stromaufwärts der kodierenden Sequenz des Leptingens. Er enthält verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die den Transkriptionsvorgang initiieren und regulieren (siehe Kap.4.) und somit für die Proteinsynthese (in diesem Fall von Leptin) verantwortlich sind. Wie die Analyse von Mutationen im Promoterbereich gezeigt hat, haben sie zum Teil nur eine geringe Auswirkung auf die Kontrolle der Transkription, sie können jedoch auch zu erheblichen Veränderungen bei der Genproduktsynthese führen [Passarge, 1994]. Untersuchungen von Miller et al. (1996) und Mason et al. (1998) zeigen, dass z. B. TATA-Bereiche und C/EBP-Bindungsstellen des Leptin-Promoters von funktioneller Relevanz für die Expression des Leptingens in Adipozyten sind. Demnach heben künstlich hervorgerufene Mutationen in diesen Bereichen die Induktion der Leptingen-Expression auf [Miller et al., 1996; Mason et al., 1998]. Mutationen in Bereichen wichtiger Erkennungselemente für Transkriptionsfaktoren des Leptin-Promoters könnten die Leptinsynthese beeinflussen und somit letztendlich mit dem Phänotyp der Anorexia nervosa assoziiert sein.

In der Klinischen Forschergruppe wurde der Promoter des Leptingens untersucht. Dabei wurden zwei Polymorphismen identifiziert und untersucht:

1. Der Polymorphismus der Position -2549 wurde zuvor bereits beschrieben [Mammès et al., 1998]. Bei ihren Untersuchungen fanden Mammès et al. (1998) eine Assoziation des Allels A zu erhöhten Leptinspiegeln vor einer Diät, unabhängig vom BMI. Auch nach einer Diätphase ließen sich diese unterschiedlichen Leptinspiegel bezogen auf die jeweiligen Genotypen nachweisen. Mammès et al. (1998) postulierten daraufhin, dass dieser Polymorphismus entweder in einer bisher unbekanntem Regulationsstelle für Leptin lokalisiert ist, oder im Kopplungsungleichgewicht mit einer Mutation steht, die weiter stromauf- oder abwärts lokalisiert ist.



2. Der Polymorphismus der Position –1387 wurde erstmalig von der Klinischen Forschergruppe beschrieben [Hinney et al., 1998]. Er liegt zwei Nukleotide aufwärts einer potentiellen Bindungsstelle für CREB und könnte insofern die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors beeinflussen.

Polymorphismus bedeutet, dass, bezogen auf eine Population, an diesem Genlocus mindestens zwei Allele vorkommen. Ein Genlocus wird als polymorph bezeichnet, wenn das seltene Allel eine Häufigkeit von mindestens 1% in der „Normalpopulation“ hat und demzufolge Heterozygote für dieses Allel mit einer Häufigkeit von mehr als 2 % vorkommen [Passarge, 1994]. Bei den oben erwähnten Polymorphismen im Leptin-Promoter stellt sich das folgendermaßen dar:

1. Polymorphismus an der Position –1387: G/A
2. Polymorphismus an der Position –2549: C/A

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Allelverteilungen dieser beiden Polymorphismen bei Patientinnen mit AN und den Kontrollen zu bestimmen. Um eine Aussage darüber machen zu können, ob eines der jeweiligen Allele mit dem Phänotyp der Anorexia nervosa assoziiert ist, wurde die Allelverteilung in einem Kollektiv von Patientinnen mit Anorexia nervosa verglichen mit einem Kontrollkollektiv, welches aus untergewichtigen Probanden bestand. Darüberhinaus wurde ein TDT für beide Polymorphismen durchgeführt, um zu untersuchen, ob eines der jeweiligen Allele von heterozygoten Eltern öfter an ihre Kinder mit AN weitergegeben wurde als das jeweilig andere. Ein signifikantes Ungleichgewicht in der Vererbung der Allele könnte dabei auf eine funktionelle Relevanz des öfter vererbten Allels für den Phänotyp der Anorexia nervosa hinweisen.

### 3. Ergebnisdiskussion

Für die vorangestellte Hypothese (siehe Einleitung 4.5.) lässt sich aufgrund der Untersuchungsergebnisse folgende Aussage treffen:

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Assoziationen von Allelen zweier Polymorphismen im Promoterbereich des Leptingens zum Phänotyp der Anorexia nervosa gefunden werden.

Die Klinische Forschergruppe hatte zuvor zusätzlich den kodierenden Bereich des Leptingens untersucht [Hinney et al., 1998]. Dazu stand ein Kollektiv von 49 Patientinnen mit Anorexia nervosa und 315 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen zur Verfügung, wobei dieses Kollektiv die zuvor untersuchten Familien der Klinischen Forschergruppe [Roth et al., 1997] enthielt. Es konnten zwei neue Sequenzvariationen identifiziert werden:

1. Bei der ersten liegt ein Basenaustausch im Kodon 91 vor (TCC→TCT), der jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch führt (Ser-91-Ser). Gefunden wurde diese Sequenzvariation bei einer Patientin mit Anorexia nervosa (heterozygot). Da die Mutation zu keinem Aminosäureaustausch führt, ist es unwahrscheinlich, dass sie eine Rolle für die Ätiologie der Anorexia nervosa spielt.
2. Die zweite Sequenzvariation führt zu einem Aminosäureaustausch (Glu-126-Gln). Sie wurde bei einem extrem adipösen Jungen (heterozygot), aber auch bei dessen normalgewichtiger Mutter und seinem normalgewichtigen Bruder gefunden (ebenfalls heterozygot). Da diese Variation demnach bei verschiedenen Gewichtsklassen vorkommt, ist es unwahrscheinlich, dass sie eine Bedeutung für die Ätiologie der Adipositas hat [Hinney et al., 1998].

Außerdem konnte eine Mutation bei einem adipösen Probanden identifiziert werden [Hinney et al., 1998], die zuvor bereits bei einer normalgewichtigen Person beschrieben wurde [Echwald et al., 1997], so dass auch hier eine funktionelle Relevanz in Bezug auf die Regulation des Körpergewichtes unwahrscheinlich ist.

Für die vorliegenden Ergebnisse gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- Im allgemeinen kann die Auswirkung einer Mutation, also ob es sich um eine neutrale Mutation handelt, oder sie zu einer Funktionseinschränkung oder sogar zu einem Funktionsverlust führt, nicht ohne weiteres vorhergesagt werden. Nur wenn es z. B. infolge einer Deletion oder einer Insertion zu einer Rasterverschiebung kommt oder das ganze Gen verloren geht, sind einigermaßen gesicherte Aussagen möglich [Strachan et al., 1996].
- Bei dem Polymorphismus der Position -1387 liegt der p-Wert beim TDT bei insgesamt 54 Trios (bestehend aus jeweils einer Patientin mit Anorexia nervosa und ihren Eltern) bei 0,41. Für Assoziationsstudien gilt allgemein, dass bei einem anzunehmenden geringen Einfluss des Polymorphismus die Fallzahl sehr hoch sein muss, um den Effekt signifikant nachweisen zu können. Es ist somit nicht auszuschließen, dass bei Heranziehung eines extrem großen Kollektivs der TDT signifikant ausgefallen wäre. Ein Fehler 2. Art (falsch negativ) kann hier also nicht ausgeschlossen werden. (Dieses Problem betrifft auch die Assoziationsstudie zum Polymorphismus der Position -2549).
- Während der Untersuchungen können Fehler aufgetreten sein, die die Ergebnisse verfälscht haben. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da, wie vorangehend schon erläutert, sehr sorgfältig und sauber gearbeitet wurde und alle Auswertungen stets von mindestens zwei Personen unabhängig voneinander überprüft wurden.

## 4. Methodendiskussion

### 4.1. PCR

Eine Grundlage der medizinischen und biologischen Analytik ist der Nachweis geringster Mengen genetischen Materials. Mit der Entwicklung der PCR gelang es 1985 Kary Mullis, eine relativ einfach und schnell zu handhabene Methode zu entwickeln, für die er 1993 den Nobelpreis erhielt. Neben Schnelligkeit und Spezifität durch Automatisierung ist vor allem die große Menge des gewonnenen Amplifikats als Vorteil gegenüber anderen Methoden zu nennen. Nachteilig kann sich jedoch die Empfindlichkeit der Methode auswirken. Erfordert sie doch penibel sauberes Arbeiten, um eine Kontamination mit fremder DNA (z.B. Haut- und Haarpartikel) zu verhindern. Fehler der Methode gehen generell auf Fehleinbau (besonders T/C-Transitionen) durch die *Taq-Polymerase*. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die Fehlereinbaurrate bei über 30 Zyklen 0,25% beträgt, also 1:400 [Strachan et al., 1996].

Um mögliche Fehlerquellen zu minimieren, wurden soweit wie möglich die Materialien im Autoklaven sterilisiert. Reagentien wie Puffer und dNTPs wurden auf Vorrat zubereitet und in kleinen Mengen (Aliquots) aufbewahrt, um das Kontaminationsrisiko möglichst gering zu halten. Aus dem gleichen Grunde wurde bei der Zubereitung eines PCR-Ansatzes immer erst im letzten Arbeitsgang die DNA hinzugefügt. Darüber hinaus wurden die Arbeitsbereiche vor und nach der Amplifizierung räumlich getrennt. Zusätzlich wurde bei jedem Reaktionsansatz eine H<sub>2</sub>O-Probe als Negativkontrolle eingesetzt. Diese Probe durfte kein Amplifikat erzeugen.

### 4.2. DNA-Digestion

Der Polymorphismus an Position -2549 wurde mittels **Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus** (RFLP) untersucht. Ihm liegt ein Basenaustausch von C A zugrunde. Dieser Basenaustausch liegt in der Erkennungssequenz des *Hin 6.1.*, welches somit zwar das Wildtypallel (C=110 bp und 71 bp), nicht aber das mutierte Allel (A=181 bp) schneidet. Nach Durchführung der PCR zur Amplifizierung des 181 bp langen Genabschnittes wurde die Digestion mit dem Restriktionsenzym angeschlossen. Je nach Allelverteilung erhielt man ein mutiertes „unverdautes- nicht geschnittenes“ Fragment entsprechend der ursprünglichen Länge von 181 Basenpaaren, oder zwei „verdaute-geschnittene“ Fragmente der Länge von 110 und 71 Basenpaaren. Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge laufen im elektrischen Feld der

Gelelektrophorese entsprechend ihrer Basenpaarlänge spezifisch weit und können somit voneinander differenziert werden.

*Hin* 6.1 schneidet wie die meisten Restriktionsenzyme an „palindromischen Sequenzen“, d. h. die Schnittstelle liegt asymmetrisch um eine Achse, an der spiegelbildlich komplementäre einzelsträngige DNA-Abschnitte liegen. Diese stimmen mit der des gegenüberliegenden Strangs in Gegenrichtung überein [Passarge, 1994]. *Hin* 6.1 schneidet nur seine spezifische Erkennungssequenz. Somit handelt es sich bei der DNA-Digestion um eine sehr **präzise Methode zur Genotyp-Diagnose**. Hierfür wird vorausgesetzt, dass die komplette Sequenz des zu untersuchenden DNA-Fragmentes bekannt ist. Daneben muss die Lokalisation der Mutation im vorherig sequenzierten Fragment exakt bekannt sein [Hinney et al., 1998]. Darüberhinaus muss sichergestellt werden, dass in dem zu untersuchenden Genabschnitt die Schnittstelle bzw. spezifische Erkennungssequenz des Enzyms nur einmal vorkommt. Bei dem zu untersuchenden Polymorphismus der Position -2549 des Leptin-Promoters wurden die Primer für das DNA-Fragment daher so ausgesucht, dass die Erkennungssequenz von *Hin* 6.1 nur im Bereich der Mutation einmal auftritt. Zur Erkennung der Fragmentgröße (Basenpaarlänge) lief in einer Spur der Gelelektrophorese immer ein Basenpaar-Marker mit. Auswertungsfehler in der Gelelektrophorese wurden dadurch minimiert, dass diese stets von zwei Personen, unabhängig voneinander, beurteilt wurde. Ebenso wurde die spätere Dateneingabe in den Computer immer von zwei Personen überprüft. Unstimmigkeiten in der Auswertung führten dabei dazu, dass die jeweiligen Proben erneut untersucht wurden.

#### 4.3. SSCA

Der Polymorphismus der Position -1387 verändert weder die Schnittstelle eines Restriktionsenzym noch kreiert er eine neue. Daher war in diesem Falle eine Allelbestimmung mittels DNA-Digestion nicht möglich. Die Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) ist eine sehr empfindliche Methode, um Genvariationen sichtbar zu machen. Hierbei kommt es aufgrund eines Basenunterschiedes zu einer Konformationsänderung des zu Einzelsträngen denaturierten DNA-Abschnittes. Dieser Konformationsunterschied führt zu einer veränderten Laufeigenschaft im Polyacrylamidgel. Wie sich nach einigen Optimierungsversuchen gezeigt hat, lässt sich der Polymorphismus der Position -1387 mittels dieser Methode sehr gut darstellen. Um diese Methode als Screening-Verfahren für ein großes Kollektiv anwenden zu können,

müssen zuvor homozygote Träger der jeweiligen Allele (hier G/G und A/A) als Kontrollproben bekannt sein. Dies wurde für die hier beschriebene Untersuchung zuvor mittels Sequenzierung erreicht [Hinney et al., 1998]. Diese Kontrollproben liefen bei den Untersuchungen in jedem Gel zum Vergleich mit. Insgesamt ist bei dieser Methode sorgfältiges Arbeiten sehr wichtig, da nur die zuvor als optimal erarbeiteten Bedingungen auch auswertbare Gele lieferten. Wie bei der DNA-Digestion wurden auch die Polyacrylamidgele immer von zwei Personen separat ausgewertet. Ebenso wurde die Dateneingabe in den Computer von zwei unabhängigen Personen überprüft, um die Fehlerquote zu minimieren. Bei Unstimmigkeiten wurden auch hier die jeweiligen Proben nochmals untersucht.

## **5. Statistische Auswertung**

Um eine mögliche Assoziation der Polymorphismen zum Phänotyp der Anorexia nervosa feststellen zu können, wurden die Allelverteilungen der Patientengruppe und der untergewichtigen Probandengruppen miteinander verglichen (Fall-Kontrollstudie). Dabei zeigten sich jedoch für beide Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede in den Allelverteilungen. Folgendes Problem dieser Untersuchungsmethode muss an dieser Stelle bedacht werden: Die Probanden mit dem Phänotyp der Anorexia nervosa könnten einer anderen genetischen Untergruppe der Bevölkerung entstammen als die gesunden untergewichtigen Probanden. Diese unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen könnten an sich schon eine unterschiedliche Häufigkeit für die jeweiligen Allele aufweisen (Populationsstratifikation oder –schichtung). Zwar ist dies bei den hier verwendeten Kollektiven eher unwahrscheinlich, da das „Extremkollektiv“ Probanden aus verschiedenen Teilen Deutschlands enthält und auch die untergewichtigen Studenten der Universität Marburg aus verschiedenen Teilen Deutschlands stammen. Signifikante Milieuunterschiede in Alter, sozialer Herkunft und Bildung (nur Studenten) sind jedoch wahrscheinlich, so dass Stratifikationsprobleme nicht gänzlich auszuschließen sind.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde für beide Polymorphismen zusätzlich ein „Transmission disequilibrium test“ (TDT) durchgeführt. Wie beschrieben, wird dabei das Problem der Populationsschichtung umgangen, indem nur Trios (betroffener Proband und seine Eltern) untersucht werden. Informativ sind dabei nur Elternteile, die für das zu testende Allel heterozygot sind. Es wird bestimmt, wie oft das bestimmte Allel von den Eltern an das adipöse Kind weitergegeben wird. Wird das bestimmte Allel

dabei häufiger (oder seltener) weitergegeben als es der Zufall erklären könnte, liegt ein Transmissionsungleichgewicht vor. Dies wiederum würde bedeuten, dass das Allel mit dem Phänotyp der betroffenen Probanden (in unserem Fall Anorexia nervosa) gleichzeitig gekoppelt und assoziiert ist und es möglicherweise sogar einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Allel und der Entstehung dieser Krankheit gibt. Für unsere Untersuchungen ergab der TDT jedoch in beiden Fällen kein Transmissionsungleichgewicht und bestätigte somit die negativen Ergebnisse der Assoziationsuntersuchungen.

## 6. Anorexia nervosa ein genetisch determiniertes Gewichtsextrem?

In der vorgelegten Arbeit wurde der Bogen von klinischen Aspekten der Anorexia nervosa bis zu molekulargenetischen Befunden gespannt. Dies geschah, indem die Essstörung von dem Standpunkt einer gestörten Gewichtsregulierung aus betrachtet wurde. Es wurde versucht die bisherigen Erkenntnisse über die Regelkreise der Gewichtsregulation und die beteiligten Kandidatengene darzustellen. Ganz offensichtlich haben molekulargenetische Studien an gewichtsextremen Kollektiven das Verständnis der physiologischen Gewichtsregulierung erweitert. Die Verknüpfung von klinischen Fragestellungen mit biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungsansätzen ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Forschung zum Verständnis von Essstörungen.

Bezüglich des wissenschaftlichen Ansatzes, die Anorexia nervosa als **entgegengesetztes Gewichtsextrem** zur Adipositas anzusehen, sollten mehrere Überlegungen kritisch angemerkt werden.

- Es existieren im Vergleich zur Adipositas keine monogenen Mutationen, die zum Phänotyp der Anorexia nervosa führen. Darüberhinaus gibt es nur wenig signifikante Hinweise auf Kopplung zwischen (z.B. hAGRP; [Kink et al., 2001]) funktionellen Kandidatengen- Polymorphismen und dem Phänotyp dieser Essstörung (siehe 3.4.).
- Sind Versuchsabläufe und Studien, die für das Kollektiv der Adipositas geplant und anschließend durchgeführt wurden, übertragbar auf das Kollektiv der Patientinnen mit Anorexia nervosa? Beide Kollektive divergieren erheblich in ihren psychopathologischen Eigenschaften und Krankheitsverläufen.

- Es bleibt zu klären, ob die reduzierte Nahrungsaufnahme und Appetitlosigkeit als ursächlich oder (sekundär) als psychopathologische Folge dieser Krankheit anzusehen sind.

Es wird deutlich, dass das Krankheitsbild der Anorexia nervosa von zahlreichen Variablen (multifaktoriell) beeinflusst und geprägt wird. Biologische Pathomechanismen in der Gewichtsregulation scheinen in Gestalt von genetischen Prädispositionen an dem Auftreten und der Ausprägung beteiligt zu sein. Bekannte und bisher unbekannte Neurotransmitter könnten im Wechselspiel zwischen Hunger und Sättigung eine pathologische Gewichtsregulation verursachen. Eine Konstellation von psychopathologischen Verhaltensmustern, genetischer Disposition und endokrinologischen Veränderungen (wie z.B. in der Pubertät) könnte den Krankheitsausbruch triggern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der wissenschaftliche Ansatz die Anorexia nervosa auch als fehlerhafte adaptive Gewichtsregulation zu verstehen, sich bislang auf molekulargenetischer Ebene als nicht fruchtbar erwiesen hat. Dennoch ist zu wünschen, dass zukünftige molekulargenetische Studien durch ihre Ergebnisse das Verständnis der komplexen Regulation des Körpergewichtes erweitern. Hierdurch könnten sich für Patienten mit Essstörungen neue klinische Therapiekonzepte eröffnen.



---

## LITERATURVERZEICHNIS

1. *Adan RA, Vink T*: Drug target discovery by pharmacogenetics: mutations in the melanocortin system and eating disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* (2001); 11: 483-90
2. *Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS*: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* (1996); 382:250-252
3. *Albers HE, Ottenweller JE, Liou SY, Lumpkin MD, Anderson ER*: Neuropeptide Y in the hypothalamus: effect on corticosterone and single-unit activity. *Am J Physiol* (1990); 258: R376-82
4. *American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV), Washington, DC: APA 1994 Brotman, A.W., Herzog, D.W., Hamburg, P.* (1988):. *J Clin Psychiatry*. 49, 157-160
5. *Anand BK, Brobeck JR*: Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* (1951); 24: 123-40
6. *Anders H, Rosenbauer J, Matiaske B*: Repräsentative Verzehrstudie in der Bundesrepublik Deutschland inkl. West-Berlin. Schriftenreihe der AGEV, Bd. 8. Umschau Verlag, Frankfurt (1990).
7. *Audi L, Mantzoros CS, Vidal-Puig A, Vargas D, Gussinye M, Carrascosa A*: Leptin in relation to resumption of menses in women with anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. (1998); 3: 544-7.
8. *Ayuso Gutierrez JL*: Serotonergic function and aggressive-impulsive behavior. *Acta Psiquiatr Psicol Am Lat.* (1994); 40: 56-62. .
9. *Ballauff A, Ziegler A, Emons G, Sturm G, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J*: Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain. *Mol Psychiatry*. (1999); 4: 71-5.
10. *Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA*: Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. (1996); 137: 3144-7.
11. *Barry VC, Klawans HL.*: On the role of dopamine in the pathophysiology of anorexia nervosa. *J Neural Transm.* (1976); 38: 107-22.
12. *Baxter JD, Rousseau GG*: Glucocorticoid hormone action: an overview. *Monogr Endocrinol* (1979); 12: 1-24
13. *Bertagna X, Girard F, Seurin D, et al.*: Evidence for a peptide similar to 16 K fragment in man. Its relationship to ACTH. *J Clin Endocrinol Metab.* (1980); 51: 182-184
14. *Billington CJ, Briggs JE, Link JG, Levine AS*: Glucagon in physiological concentrations stimulates brown fat thermogenesis in vivo. *Am J Physiol* (1991); 261: R501-7.
15. *Blum WF*: Leptin: the voice of the adipose tissue. *Horm Res.* (1997); 48 Suppl 4: 2-8.
16. *Blundell JE*: Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr.* (1992); 55: 155S-159S.
17. *Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I*: Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* (1996); 81: 3419-23
18. *Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP*: Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* (1994); 134: 2367-70

19. *Boss O, Hagen T, Lowell BB*: Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes*. (2000); 49: 143-56
20. *Bouchard C, Savard R, Després JP, Tremblay A, Leblanc C*: Body composition in adopted and biological siblings. *Hum Biol* (1985); 57: 61-75
21. *Bray GA* : Classification an evaluation of the obesities. *Med Clin N Am* (1989); 73: 161-184
22. *Bray GA*: Peptides affect the intake of specific nutrients and the sympathetic nervous system. *Am J Clin Nutr* (1992); 55: 265S-71S
23. *Bray GA*: Coherent, preventive and management strategies for obesity. *Ciba Found Symp* (1996); 201: 228-46; discussion 246-54
24. *Brobeck JR, Tepperman J, Long CNH*: Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *Yale J Biol Med* (1943); 15: 831-53
25. *Bromel T, Blum WF, Ziegler A, Schulz E, Bender M, Fleischhaker C, Remschmidt H, Krieg JC, Hebebrand J*: Serum leptin levels increase rapidly after initiation of clozapine therapy. *Mol Psychiatry*. (1998); 3: 76-80
26. *Brown AM, Mayfield DK, Volaufova J, Argyropoulos G*: The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. *Gene* (2001); 277(1-2): 231-8
27. *Bultmann SJ, Michaud EJ, Woychik RP*: Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* (1992); 71: 1195-1204
28. *Burniat WM*: The genetic of childhood obesity. In: *Giorgi PL, Suskind RM, Catassi C* (eds.): *The obese child. Pediat Adolesc Med 2*. Karger, Basel (1992): 21-31
29. *Buselmaier W, Tariverdian G*: *Humangenetik* (2. Auflage), Springer Verlag, Berlin, Tokio, (1999): 246, 387
30. *Chang AC, Cochet M, Cohen SN*: Structural organization of human genomic DNA encoding the proopiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980); 77: 4890-4
31. *Chagnon YC, Perusse L, Bouchard C*: The human obesity gene map: the 1997 update. *Obes Res*. (1998); 6: 76-92
32. *Chehab FF, Lim ME, Lu R*: Correction of the sterility defect in homozygous *obese* female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* (1996); 12: 318-320
33. *Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf FA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP*: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* (1996); 84: 491-495
34. *Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA*: Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*. (1997); 138: 4489-92
35. *Chretien M, Benjannet S, Gossard F, Gianoulakis C, Crine P, Lis M, Seidah NG*: From beta-lipotropin to beta-endorphin an 'pro-opio-melanocortin'. *Canad. J. Biochem.* (1979); 57: 1111-1121.
36. *Chung WK, Powerkehoe L; Chua M et al.*: Mapping of the OB receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. *Genom Research* (1996); 6: 431-438
37. *Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A*: Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*. (2000) 27; 406: 415-8
38. *Clément K, Garner C, Hager J, Philippi A, LeDuc C, Carey A, Harris TJ, Jury C, Cardon LR, Basdevant A, Demenais F, Guy-Grand B, North M, Froguel P*:

- Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes*. (1996); 45: 687-90
39. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* (1998); 392: 398-401
  40. Cohen SL, Hlalaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D, Hecht R, Collins F: Human leptin characterization. *Nature* (1996a); 382: 589
  41. Comings DE, Gade R, MacMurray JP, Muhleman D, Peters WR: Genetic variants of the human obesity (OB) gene: association with body mass index in young women, psychiatric symptoms, and interaction with the dopamine D2 receptor (DRD2) gene. *Mol Psychiatry*. (1996); 1: 325-35
  42. Coleman DL, Hummel KP.: Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol* 1969 Nov;217:1298-304
  43. Coleman DL: Obese and Diabetes: Two mutant genes causing diabetes obesity syndromes in mice. *Diabetologia* (1978); 14: 141-148
  44. Coleman DL, Eicher EM: Fat (fat) and Tubby (tub), Two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered* (1990); 81: 424-427
  45. Collier DA, Arranz MJ, Li T, Mupita D, Brown N, Treasure J: Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. *Lancet*. (1997) 9; 350
  46. Coners H, Remschmidt H, Hebebrand J. The relationship between premorbid body weight, weight loss, and weight at referral in adolescent patients with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*. 1999; 26: 171-8.
  47. Considine R V, Considine E L, Williams C J, Nyce M R, Magosin S A, Bauer T L, Rosato E L, Colberg J, Caro J F: Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity *J Clin Invest* (1995); 95: 2986-2988
  48. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* (1996b); 334: 324-325
  49. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF: The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* (1996a); 45: 992-994
  50. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD: Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr*. (1994); 14: 99-129
  51. Cumin F, Baum HP, Levens N: Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol*. (1997); 155: 577-85
  52. Dallmann MF: *Trends Endocrinol Metab* (1993); 4: 62
  53. *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.*: Ernährungsbericht. Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. im Auftr. des Bundesministers für Gesundheit und des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Frankfurt a. M. (1992)
  54. De Vos P, Saladin R, Auwerx J, et al.: Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* (1995); 270: 15958-15961
  55. Dickie MM: A new viable yellow mutation in the house mouse. *J Hered* (1962); 53: 4-86
  56. Duhl DML, Vrieling H, Miller KA: Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nature Genetics* (1994); 8: 58-65
  57. Echwald SM, Rasmussen SB, Sorensen TI, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen

- JO, Hansen L, Hansen T, Pedersen O*: Identification of two novel missense mutations in the human OB gene. *Int J Obes Relat Metab Disord.* (1997); 21: 321-6
58. *Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O*: Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* (1999); 23: 293-8
59. *Echwald SM*: Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *J Intern Med* (1999); 245: 653-66
60. *Eipper BA, Mains RE*: Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin-endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* (1980); 1: 1-27
61. *Enoch MA, Greenberg BD, Murphy DL, Goldman D*: Sexually dimorphic relationship of a 5-HT<sub>2A</sub> promoter polymorphism with obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry.* (2001); 49: 385-8
62. *Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD*: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science.* (1996) 6; 274: 1704-7
63. *Evans DJ, Hoffmann RG, Kalkhoff RK, Kissebah AH*: Relationship of androgenic activity to body fat topography, fat cell morphology, and metabolic aberrations in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* (1983); 57: 304-10
64. *Exner C, Hebebrand J, Remschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, Schweiger U, Blum WF, Preibisch G, Heldmaier G, Klingenspor M*: Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* (2000); 5: 476-81
65. *Fabsitz RR, Garrison RJ, Feinleib M, Hjortland M*: A twin analysis of dietary intake: Evidence for a need to control for possible environmental difference in MZ and DZ twins. *Beh Genet* (1978); 8: 15-25
66. *Fan W, Boston B, Kesterson R, Hruby V, Cone R*: Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* (1997); 385: 165
67. *Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S*: Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med.* (1999) 16; 341: 879-84
68. *Fauci AS*: New and reemerging diseases: the importance of biomedical research. *Emerg Infect Dis.* (1998); 4: 374-8.
69. *Feder J, Gurling HM, Darby J, Cavalli-Sforza LL*: DNA restriction fragment analysis of the proopiomelanocortin gene in schizophrenia and bipolar disorders. *Am J Hum Genet* (1985); 37: 286-94
70. *Flier JS, Marantos-Flier E*: Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* (1992); 92: 437
71. *Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N*: Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* (1991); 11: 1054-1062
72. *Friedman JM, Halaas JL*: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* (1998); 395: 763-770
73. *Garner DM, Olmstead MP, Polivy J*: Development and validation of multidimensional eating disorder inventory for anorexia nervosa and bulimia. *Int. J. Eat. Disord.* (1983) 2: 15-35
74. *Geary N, Smith GP*: Selective hepatic vagotomy blocks pancreatic glucagon's satiety effect. *Physiol Behav* (1983); 31: 391-4
75. *Geffroy S, De Vos P, Staels B, Duban B, Auwerx J, de Martinville B*: Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* (1995); 28: 603-604
76. *Gelfand D, White T*: Thermostable DNA Polymerases. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds.): *PCR-Protocols*, Academic Press, San Diego (1990): 129-141

77. *Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL*: A receptor subtype involved in neuropeptide-Y induced food intake. *Nature*. (1996) 11; 382: 168-71.
78. *Geraciotti TD Jr, Liddle RA*: Impaired cholecystokinin secretion in bulimia nervosa. *N Engl J Med* (1988); 319: 683-8
79. *Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda R*: Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996); 93: 6231-6235
80. *Gibbs J, Smith GP*: Satiety: the roles of peptides from the stomach and the intestine. *Fed Proc* (1986); 45: 1391-5
81. *Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA*: Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes*. (1997); 46: 900-6
82. *Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, Paonessa G, Chen F, Rosenblum CI, Van der Ploeg LH, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R*: Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1997) 10; 94: 6456-61
83. *Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD*: Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* (1996);271: 3971-3974
84. *Gortmaker SL, Dietz WH Jr, Sobol AM, Wehler CA*.: Increasing pediatric obesity in the United States. *Am J Dis Child*. (1987); 141: 535-40
85. *Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC Jr, Leibel RL, Weissbach J, Friedman JM*: The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res*. (1995); 5: 5-12
86. *Grinspoon S, Gulick T, Askari H, Landt M, Lee K, Anderson E, Ma Z, Vignati L, Bowsher R, Herzog D, Klibanski A*: Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. (1996); 81: 3861-3.
87. *Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM*: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* (1995); 269: 543-546
88. *Haleem DJ, Haider S*: Food restriction decreases serotonin and its synthesis rate in the hypothalamus. *Neuroreport*. (1996); 7: 1153-6.
89. *Halford JC, Blundell JE*: Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. *Ann Med*. (2000);32: 222-32. .
90. *Haluzik M, Papezova M, Nedvidkova J, Kabrt J*: Serum leptin levels in patients with anorexia nervosa before and after partial refeeding, relationships to serum lipids and biochemical nutritional parameters. *Physiol Res* (1999); 48: 197-202
91. *Hammer LD, Kraemer HC, Wilson DM, Ritter PL, Dornbusch SM*: Standardized percentile curves of body-mass index for children and adolescents. *AJDC* (1991); 145: 259-263
92. *Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL*.: Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension*. (1997) ;30: 619-23.
93. *Hebebrand J, Heseker H, Himmelmann W, Schäfer H, Remschmidt H*: Altersperzentilen für den Body-Mass-Index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren. *Akt Ernähr-Med* (1994); 19: 259-265
94. *Hebebrand J, Remschmidt H*.: Body weight under genetic control. *Med Klin*. (1995) 15;90: 403-10. . German

95. *Hebebrand J, Himmelmann GW, Hesecker H, Schafer H, Remschmidt H*: Use of percentiles for the body mass index in anorexia nervosa: diagnostic, epidemiological, and therapeutic considerations. *Int J Eat Disord.* (1996);19: 359-69.
96. *Hebebrand J, Himmelmann GW, Wewetzer C, Gutenbrunner C, Hesecker H, Schafer H, Remschmidt H*: Body weight in acute anorexia nervosa and at follow-up assessed with percentiles for the body mass index: implications of a low body weight at referral. *Int J Eat Disord.* (1996); 19: 347-57
97. *Hebebrand J, Blum WF, Barth N, Coners H, Englaro P, Juul A, Ziegler A, Warnke A, Rascher W, Remschmidt H*: Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Mol Psychiatry.* (1997); 2: 330-4.
98. *Helling RB, Goodman HM, Boyer HW*: Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* (1974); 14: 1235-44
99. *Herpertz S, Schweiger U*: Psychobiological aspects of anorexia nervosa. *Psychosom Med Psychother* (2001); 47: 179-204
100. *Herpertz-Dahlmann B, Muller B, Herpertz S, Heussen N, Hebebrand J, Remschmidt H*: Prospective 10-year follow-up in adolescent anorexia nervosa-course, outcome, psychiatric comorbidity, and psychosocial adaptation. *J Child Psychol Psychiatry* (2001); 42: 603-12
101. *Hewitt JK, Stunkard AJ, Carroll D, Sims J, Turner JR.*: A twin study approach towards understanding genetic contributions to body size and metabolic rate. *Acta Genet Med Gemellol (Roma).* (1991) ; 40: 133-46.
102. *Hinney A, Rosenkranz K, Roth H, Hebebrand J*: Gene in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. *Adipositas* (1997); 13: 6-12
103. *Hinney A, Barth N, Ziegler A, von Prittwitz S, Hamann A, Hennighausen K, Pirke KM, Heils A, Rosenkranz K, Roth H, Coners H, Mayer H, Herzog W, Siegfried A, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Schafer H, Grzeschik KH, Lesch KP, Lentjes KU, Remschmidt H, Hebebrand J*: Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distributions in relationship to body weight and in anorexia nervosa. *Life Sci.* (1997); 61: PL 295-303
104. *Hinney A, Becker I, Heibült O, Nottebom K, Schmidt A, Ziegler A, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J*: 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* (1998); 83: 3737-41.
105. *Hinney A, Bornscheuer A, Depenbusch M, Mierke B, Tolle A, Middeke K, Ziegler A, Roth H, Gerber G, Zamzow K, Ballauff A, Hamann A, Mayer H, Siegfried W, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Hermann H, Herpertz-Dahlmann BM, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J* No evidence for involvement of the leptin gene in anorexia nervosa, bulimia nervosa, underweight or early onset extreme obesity: identification of two novel mutations in the coding sequence and a novel polymorphism in the leptin gene linked upstream region. *Mol Psychiatry.* (1998);3: 539-43
106. *Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J*: 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* (1999); 84: 1483-86
107. *Hinney A, Herrmann H, Lohr T, Rosenkranz K, Ziegler A, Lehmkuhl G, Poustka F,*

- Schmidt MH, Mayer H, Siegfried W, Remschmidt H, Hebebrand J*: No evidence for an involvement of alleles of polymorphisms in the serotonin1Dbeta and 7 receptor genes in obesity, underweight or anorexia nervosa. *Int J Obes Relat Metab Disord.* (1999); 23: 760-3.
- 108.*Hinney A, Remschmidt H, Hebebrand J*: Candidate gene polymorphisms in eating disorders.. *Eur J Pharmacol* (2000) 27; 410: 147-159
- 109.*Hirschberg AL*: Hormonal regulation of appetite and food intake. *Ann Med* (1998); 30: 7-20
- 110.*Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S, Mitchell BD, Mahaney MC, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG*: Normal variation in leptin levels in associated with polymorphisms in the proopiomelanocortin gene, POMC.*J Clin Endocrinol Metab.* (1999); 84: 3187-91
- 111.*Holland AJ, Hall A, Murray R, Russell GF, Crisp AH*: Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. *Br J Psychiatry.* (1984); 145:414-9.
- 112.*Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB*: Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes.* (1996); 45: 1638-43.
- 113.*Hudson JI, Pope HG Jr, Jonas JM, Yurgelun-Todd D*:Family history study of anorexia nervosa and bulimia..*Br J Psychiatry.* 1983 Feb;142:133-8.
- 114.*Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campficid LA, Burn P, Lee F*: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* (1997); 88: 131-141
- 115.*Inui A*: Eating behavior in anorexia nervosa-an excess of both orexigenic and anorexigenic signalling? *Mol Psychiatry* (2001) Nov; 6: 620-4
- 116.*Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, et al*: Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem.* (1995) 17; 270(46): 27728-33
- 117.*Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al.*: Obesity and impaired prohormone convertase processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* (1997); 16: 303-306
- 118.*Jiskra J, Haluzik M, Svobodova J, Haluzikova D, Nedvidkova J, Parizkova J, Kotrlíkova E*: Serum leptin levels and soluble leptin receptors in female patients with anorexia nervosa. *Cas Lek Cesk* (2000); 139: 660-3
- 119.*Kaye WH, Weltzin TE*: Serotonin activity in anorexia and bulimia nervosa: relationship to the modulation of feeding and mood.*J Clin Psychiatry.* (1991);52 Suppl: 41-8
- 120.*Kidd KK, OttJ*: Cytogenet. *Cell Genet.*(1984); 37: 10
- 121.*Kim KS, Rothschild MF*: Mapping of the porcine agouti-related protein (AGRP) gene to chromosome 6. *Anim Genet* (2001); 32: 325-6
- 122.*Kiss JZ, Cassell MD, Palkovits M*: Analysis of the ACTH/beta-End/alpha-MSH-immunoreactive afferent input to the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *Brain Res* (1984); 324: 91
- 123.*Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D*: The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem.* (1991);23:791-801
- 124.*Kleyn PW, Fan W, Kovatas SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y; Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Carlson GA, Duyk GM, Moore KJ*: Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: A member of a novel gene

- family. *Cell* (1996); 85: 281-290
125. *Knippers R*: Molekulare Genetik 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1995), 49-51, 320, 432
126. *Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF*: Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 4162-5.
127. *Konig F, von Hippel C, Petersdorff T, Kaschka W*: Thyroid autoantibodies in depressive disorders. *Acta Med Austriaca* (1999); 26: 126-8
128. *Kopp W, Blum WF, von Prittwitz S, Ziegler A, Lubbert H, Emons G, Herzog W, Herpertz S, Deter HC, Remschmidt H, Hebebrand J*: Low leptin levels predict amenorrhea in underweight and eating disordered females. *Mol Psychiatry.* (1997); 2: 335-40
129. *Kreutzig T*: Biochemie. Jungjohann, 8. Auflage (1994), S. 211
130. *Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A*: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genet* (1998); 19: 155-157
131. *Kyllo JH, Collins MM, Vetter KL, Cuttler L, Rosenfield RL, Donohoue PA*: Linkage of congenital isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency to the corticotropin releasing hormone locus using simple sequence repeat polymorphisms. *Am J Med Genet* (1996); 62: 262-7
132. *Laatikainen TJ, Apter DL, Paavonen JA, Wahlström TR*: Steroids in ovarian and peripheral venous blood in polycystik ovarian disease. *Clin Endocrinol* (1980); 13: 125-34
133. *Lee G-H, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM* Abnormal splicing of the leptin receptor in *diabetic* mice. *Nature* (1996); 379: 632-635
134. *Leibowitz SF*: Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed Proc* (1986); 45: 1396-403
135. *Levinson G, Gutman GA*: Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* (1987); 4: 203-21
136. *Lewin G*: Molekularbiologie der Gene, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg (1998): 231, 243-244
137. *Lewis DE, Shellard L, Koeslag DG, Boer DE, McCarthy HD, McKibbin PE, Russell JC, Williams G*: Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *Am J Physiol* (1993); 264: E279
138. *Licinio J*: Leptin in anorexia nervosa and amenorrhea. *Mol Psychiatry.* (1997); 2: 267-9.
139. *Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS, Gold PW*: Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med.* (1997); 3: 575-9
140. *Linden Hirschberg A, Lindholm C, Carlström K, von Schoultz B*: Reduced serum cholecystokinin response to food intake in female athletes. *Metabolism* (1994); 43: 217-22
141. *Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M*: Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Med* (1995); 1: 950-953
142. *Lu D, Willard D, Patel IR*: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte stimulating-hormone receptor. *Nature* (1994); 371: 799-802
143. *Madej T, Boguski MS, Bryant SH*: Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* (1995); 373: 13-18
144. *Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM*: Leptin levels in human and



- rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* (1995b); 1: 1155-1161
145. *Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Giraud V, Tuzet S, Petiet A, Colas-Linhart N, Fumeron F*: Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes*. (1998); 47: 487-9.
146. *Mammes O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F*: Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet.* (2000); 64: 391-4
147. *Mantzoros CS, Varvarigou A, Kaklamani VG, Beratis NG, Flier JS*: Effect of birth weight and maternal smoking on cord blood leptin concentrations of full-term and preterm newborns. *J Clin Endocrinol Metab.* (1997); 82: 2856-61
148. *Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M*: Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology.* (1998); 139: 1013-22
149. *Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh n Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, Jingami H, Kawadaa T, Nakao K*: Human obese gene expression: adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* (1995); 44: 855-858
150. *Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K*: Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* (1997); 3: 1029-33
151. *Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, Badenhop NE, Goel P, Clairmont A, Klisovic D, Nahhas RW, Landoll JD*: Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab.* (1997); 82: 3239-45.
152. *Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P*: Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* (1996); 387: 113-6
153. *Micozzi MS, Albanes D, Jones DY, Chumlea WC*: Correlations of body mass indices with weight, and body composition in men and women in NHANES I and II. *Am.J Clin Nutr* (1986); 44: 725-731
154. *Miller SA, Dykes DD, Polesky HF*: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* (1988); 16: 1215
155. *Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, Briggs MR, Auwerx J*: The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1996) 28; 93: 5507-11
156. *Moltz JH, McDonald JK*: Neuropeptide Y: direct and indirect action on insulin secretion in the rat. *Peptides* (1985); 6: 1155-9
157. *Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S*: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* (1997); 387: 903-908
158. *Moran TH, Ameglio PJ, Schwartz GJ, McHugh PR*: Blockade of tyoe A, but not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK. *Am J Physiol* (1992); 262: R46-50
159. *Morris JC, Bertram CE, Lowry PJ, Savva D*: Cryptic trinucleotide repeat polymorphism in the POMC gene. *Hum Mol Genet* (1994); 3: 2080
160. *Mountjoy K, Mortrud M, Low M, Simerly R, Cone R*: Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* (1994); 8: 1298
161. *Mullis KB, Faloona FA*: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-

- catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* (1987); 155: 335-50
162. *Mutt V*: Secretin and Cholecystokinin. In: *Mutt V*. ed. *Advances in Metabolic disorders. II. Gastrointestinal Hormones*. San Diego, CA: Academic Press (1988); 11: 270-320
163. *Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH*: Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.* (1995); 10: 135-142
164. *O'Donohue TL, Dorsa DM*: The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine systems. *Peptides* (1982); 3: 353-395
165. *Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS*: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. (1997) 10/3;2 78(5335): 135-8.
166. *Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T*: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* (1989); 86: 2766-2770
167. *Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J*: Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab.* (1999); 84: 3686-95
168. *Passarge E*: *Taschenatlas der Genetik*, Goerg Thieme Verlag Stuttgart, New York, (1994): 202-208
169. *Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F*: Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* (1995); 269: 540-543
170. *Phillipp E, Pirke KM, Kellner MB, Krieg JC*: Disturbed cholecystokinin secretion in patients with eating disorders. *Life Sci* (1991); 48: 2443-50
171. *Pirke KM, Friess E, Kellner MB, Krieg JC, Fichter MM*: Somatostatin in eating disorders. *Int J Eat Disord* (1994); 15: 99-102
172. *Pschyrembel* : *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag; 256. Auflage: S.512
173. *Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E*. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. (1996) 21; 380(6571): 243-7
174. *Rebuffe-Scrive M, Marin P, Bjorntorp P*: Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men. *Int J Obes* (1991); 15: 791-5.
175. *Reed DR, Ding Y, Xu W, Cather C, Green ED, Price RA*: Extreme obesity may be linked to markers flanking the human *OB* gene. *Diabetes*. (1996); 45: 691-4.
176. *Rink T J*: In search of a satiety factor *Nature* (1994); 372: 408-409
177. *Ritter S, Weatherford SC, Stone SL*: Glucagon-induced inhibition of feedings is impaired by hepatic portal alloxan injection. *AM J Physiol* (1986); 250: R682-90
178. *Rolland-Cachera M. F., T. J. Cole, M. Sempé*: Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* (1991); 45: 13-21
179. *Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, Siegfried W, Young JK, Remschmidt H, Hebebrand J*: Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab.* (1998); 83: 4524-7
180. *Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR*: Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*. (1997); 138: 351-5

181. Roth H, Hinney A, Ziegler A, Barth N, Gerber G, Stein K, Bromel T, Mayer H, Siegfried W, Schafer H, Remschmidt H, Grzeschik KH, Hebebrand J: Further support for linkage of extreme obesity to the obese gene in a study group of obese children and adolescents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. (1997); 105: 341-4
182. Rothwell N: Central effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neurosci Biobehav* (1990); 14: 263
183. Rovere C, Viale A, Nahon J, Kitabgi P: Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin-concentrating hormone in obese fat/fat mice. *Endocrinology*. (1996); 137: 2954-8.
184. Sachs, L: *Angewandte Statistik*. (1979); 5. Auflage: 288-290
185. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. (1985) 20; 230: 1350-4
186. Sambrook J, Gething MJ: Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* (1989); 342: 224-5
187. Satoh M, Mori S: Subregional assignment of the proopiomelanocortin gene (POMC) to human chromosome band 2p23.3 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell Genet* (1997); 76: 221-222
188. Schimmel P: Hazards and their exploitation in the applications of molecular biology to structure-function relationships. *Biochemistry* (1990); 29(41): 9495-502
189. Schimmel P, Musier-Forsyth K: 'Distorted' RNA helix recognition. *Nature* (1996); 384: 422
190. Schubring C, Englaro P, Siebler T, Blum WF, Demirakca T, Kratzsch J, Kiess W: Longitudinal analysis of maternal serum leptin levels during pregnancy, at birth and up to six weeks after birth: relation to body mass index, skinfolds, sex steroids and umbilical cord blood leptin levels. *Horm Res*. (1998); 50: 276-83
191. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DJ: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* (1996); 98: 1101
192. Schwartz MW, Brunzell JD: Regulation of body adiposity and the problem of obesity. *Arterioscl Throm Vasc Biol* (1997a); 17: 233-238
193. Schwartz MW, Seeley RJ: Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* (1997); 336: 1802
194. Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, Bell SM, Baskin DG, Woods SC, Schwartz MW: Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* (1996); 28: 664
195. Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R: Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism* (1990); 39: 897-901
196. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J: Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* (1973); 12: 3055-63
197. Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J, Magosin S, Stephens T, Heiman ML, Polonsky KS, Caro JF: Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. (1996) 21; 228: 733-8
198. Sinha MK, Ohannesian JP, Heimann ML: Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* (1996); 97: 1344-1347
199. Siracusa LD: The agouti gene: turned on to yellow. *TIG* (1994); 10: 423-428
200. Smith GP, Jerome C, Cushman BJ, Eterno R, Simansky KJ: Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in rat. *Science* (1981); 213: 1036-7

201. *Smith MS*: Lactation alters neuropeptide-Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat. *Endocrinology* (1993); 133: 1258
202. *Sørensen TIA, Price RA, Stunkard AJ, Schulsinger F*: Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *Brit Med J* (1989); 298: 87-90
203. *Sørensen TIA, Holst C, Stunkard AJ, Skovgaard LT*: Correlations of body mass index of adult adoptees and their biological and adoptive relatives. *Int J Obes* (1992); 16: 227-236
204. *Spielman RS, Ewens WJ*: TDT clarification. *Am J Hum Genet.* (1999); 64: 668
205. *Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF*: Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* (1996); 273: 1561
206. *Spitzweg C, Hofbauer LC, Landgraf R, Heufelder AE.*: The molecular pathogenesis of obesity. The physiological and pathophysiological role of leptin. *Dtsch Med Wochenschr.* (1996) 13; 121: 1134-8.
207. *Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF*: Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* (1986); 7: 1189-92
208. *Steinhausen HC*: The outcome of anorexia nervosa in the 20th century. *Am J Psychiatry* (2002);159: 1284-93
209. *Stephens TW, Basinski M, Bristow PK*: The role of neuropeptide Y in the antiobese action of the obese gene product. *Nature* (1995); 377: 530-532
210. *Stoving RK, Hangaard J, Hansen-Nord M, Hagen C*: A of endocrine changes in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res.* 1999; 33:139-52. .
211. *Stoving RK, Vinten J, Handberg A, Ebbesen EN, Hangaard J, Hansen-Nord M, Kristiansen J, Hagen C*: Diurnal variation of the serum leptin concentration in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1998) Jun; 48: 761-8
212. *Strachan T, Read A*: Molekulare Humangenetik, Akad. Verl., Heidelberg, (1996): 14-15, 190-191, 153-160, 469, 477, 480, 498, 514
213. *Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg A D*: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity (Letter) *Nature Genet* (1998); 18: 213-215
214. *Stunkard AJ, Sørensen TIA, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull W J, Schulsinger F*: An adoption study of human obesity. *N Engl Med* (1986); 314: 193-198
215. *Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE*: The body mass-index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* (1990); 332: 1483-1487
216. *Takahashi H, Hakamata Y, Watanabe Y, Kikuno R, Miyata T, Numa S*: Complete nucleotid sequenz of human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene. *Nucleic Acids Res* (1983); 11: 6847-6858
217. *Tartaglia LA, Dembski M, Werng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI*: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* (1995); 83: 1263-1271
218. *Teasdale TW, Sørensen TIA, Stunkard AJ*: Genetic and early enviromental components in sociodemographic influences on adult body fatness. *Brit Med J* (1990); 300: 1615-1618
219. *Thim L, Kristensen P, Larsen PJ, Wulff BS*: CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol.* (1998) ; 30: 1281-4.
220. *Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P*: A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* (1998); 20: 113-4
221. *Vanderweele DA, Xavier Pi-Sunyer F, Novin D, Bush MJ*: Chronic insulin infusion

- suppresses food ingestion and body weight gain in rats. *Brain Res Bull* (1980); 5: 5-11
222. *Vandereycken W, van Deth R.*: A tribute to Lasegue's description of anorexia nervosa, with completion of its English translation. *Br J Psychiatry* (1990); 157: 902-8
223. *van Dijk G.*: The role of leptin in the regulation of energy balance and adiposity. *J Neuroendocrinol* (2001); 13: 913-21
224. *Volkenandt M, Lohr M, Dicker AP.*: Gene amplification by the polymerase chain reaction. *Dtsch Med Wochenschr.* (1990) 27; 115: 670-6
225. *von Prittwitz S, Blum WF, Ziegler A, Scharmann S, Remschmidt H, Hebebrand J.*: Restrained eating is associated with low leptin levels in underweight females. *Mol Psychiatry.* (1997); 2: 420-2
226. *Vink T, Hinney A, van Elburg AA, van Goozen SH, Sandkuijl LA, Sinke RJ, Herpertz-Dahlmann BM, Hebebrand J, Remschmidt H, van Engeland H, Adan RA.*: Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* (2001); 6: 325-8
227. *Wabitsch M, Ballauff A, Holl R, Blum WF, Heinze E, Remschmidt H, Hebebrand J.*: Serum leptin, gonadotropin, and testosterone concentrations in male patients with anorexia nervosa during weight gain. *Clin Endocrinol Metab* (2001); 86: 2982-8
228. *Wade GN, Gray JM.*: Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* (1979); 22: 583-93
229. *Weigle DS, Ganter SL, Kuijper JL, Leonetti DL, Boyko EJ, Fujimoto WY.*: Effect of regional fat distribution and Prader-Willi syndrome on plasma leptin levels. *J Clin Endocr Metab* (1997); 82: 566-570
230. *West DB, Fey D, Woods SC.*: Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol* (1984); 246: R776-87
231. *Woods SC, Porte D Jr, Bobbioni E, Ionescu E, Sauter JF, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B.*: Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight. *Am J Clin Nutr* (1985); 42(5 Suppl): 1063-71
232. *World Health Organisation.*: The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disorders—Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. WHO, Geneva (1992)
233. *Xu XF, Bjorntorp P.*: Effects of dexamethasone on multiplication and differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res* (1990); 189: 247-52
234. *Young JK.*: Estrogen and the etiology of anorexia nervosa. *Neurosci Biobehav Rev.* (1991); 15: 327-31.
235. *Zabel BU, Nayler SL, Sakaguchi AY, Bell GI, Shows TB.*: High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. *Proc Nat Acad Sci* (1983); 80: 6932-6936
236. *Zhang FM, Basinski MB, Beals JM, Brigs SL, Churger LM, Clawson DK, Dimarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Schmith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW.*: Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* (1997); 387: 206-209
237. *Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al.*: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* (1994); 372: 425-432
238. *Zhou QY, Palmiter RD.*: Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell.* (1995) 29;83: 1197-209

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Bert Mierke  
geb. am 14.05.73 in Osnabrück  
evangelisch-lutherisch  
verheiratet mit  
Hebamme Birgit Mierke  
einen Sohn Finn Mierke



### Schulbildung

Mai 1992 Abitur am  
Ratsgymnasium zu Osnabrück

### Studium

SS 93- SS 99 Philipps-Universität Marburg  
WS 98- SS 99 Universität Hamburg  
SS 99 Medizinische Hochschule Hannover

### Praktisches Jahr

1. Tertial Innere Medizin Universitätsklinikum Marburg bei Prof. Dr. v. Wichert
2. Tertial Chirurgie AK Wandsbek bei Prof. Dr. Kußmann
3. Tertial Gynäkologie Marienhospital Osnabrück bei Prof. Dr. Butterwegge

### Ärztl. Tätigkeit

Februar - Mai 2000 AiP Universitätsfrauenklinik Köln  
Mai 2000 - Juli 2001 AiP Marienhospital Osnabrück  
seit August 2001 Weiterbildung zum Facharzt für  
Gynäkologie und Geburtshilfe am Marienhospital in  
Osnabrück

### Promotionsarbeit

Experimentelle Tätigkeit von April bis Oktober 1997 in der Klinischen Forschergruppe der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg, Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

### Veröffentlichungen:

Mol Psychiatry. (1998); 3: 539-43  
Int J Obes Relat Metab Disord (1997); 21: 1190

---

## Verzeichniss der akademischen Lehrer

Die folgende Liste führt meine akademischen Lehrer auf, denen ich an dieser Stelle führen Ihren Beitrag zu meiner Ausbildung herzlich danken möchte.

Arnold, R.	Holzberger, P.	Seifart, K-H.
Aumüller, G.	Huffmann, G.	Seitz, J.
Aurich, H.-G.	Joseph, K.	Seyberth, H.
Basler, H.-D.	Kälble, T.	Slenczka, W.
Baum, E.	Kalbfleisch, H.	Steininger, B.
Beato, M.	Karlson, P.	Stinner, B.
Bennet, M.-A.	Kern, H.-F.	Sturm, G.
Bien, S.	Kleine, T.-O.	Thomas, C.
Birmes, B.	Klenk, H.-D.	Thumfart, W.-F.
Bohra, S.	Klose, K.-J.	Töllner, U.
Butterwegge, M.	Koolman, J.	Vohland, H.-W.
Christiansen, A.	Kraus, P.	Voigt, K.
Dapunt, O.	Kretschmer, V.	Wellstein, A.
Daut, J.	Krieg, J.-C.	Wesemann, W.
Eschenbach, C.	Kroll, P.	Westermann, R.
Feuser, B.	Kummer, W.	Wichert, P. v.
Flohr, K.	Kußmann, J.	
Fritsch, P.	Lang, R.-E.	
Fuhrmann, G.-F.	Lennartz, H.	
Ganz, H.	Maisch, B.	
Geus, A.	Mannherz, H.-G.	
Göke, B.	Mennel, H.-D.	
Göttinger, W.	Moosdorf, R.	
Gotzen, L.	Nölling, P.	
Gressner, A. M..	Oertel, W.	
Griss, P.	Perst, H.	
Grzeschik, K.-H.	Ransmayr, D.	
Habermehl, A.	Rem Schmid, H.	
Happle, R.	Rothmund, M.	
Hasilik, A.	Schäfer, H.	
Havemann, K.	Schachtschabel, D.	
Hebebrand, J.	Schulz, K.-D.	
Hinney, A.	Schwarz, R.	

---

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt und Herrn Prof. Dr. J. Hebebrand danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Arbeit, sowie für ihre hilfreiche Unterstützung.

An dieser Stelle soll auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft gedankt werden, durch deren finanzielle Zuwendungen unsere Projekte ermöglicht wurden.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anke Hinney, die mir ohne Ausnahme zur Seite stand, und die durch ihre menschliche und fachliche Kompetenz zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beitrug.

Frau G. Gerber danke ich für ihre warmherzige und freundliche Einweisung in unser Tätigkeitsfeld.

Den Herren Dr. F. Geller und Prof. Dr. A. Ziegler danke ich für die statistische Unterstützung und die Lehrstunden in Biomathematik.

Für die kollegiale Atmosphäre und gute Teamarbeit danke ich meinen Mitdoktorandinnen. Besonders hervorgehoben werden muss hierbei Frau Dr. Marion Depenbusch, ohne Ihre wissenschaftliche Denkweise und langjährige Geduld wäre ich sicherlich verzweifelt.

Ein grossen Dank für die fortwährende Unterstützung und den Ansporn spreche ich meiner gesamten Familie aus. Meiner lieben Frau Birgit für Geduld, Glaube und Hilfe aller Art. Insbesondere meiner Mutter Frau Bärbel Gänslers für Korrektur und logistische Stütze, sowie meinem Stiefbruder Andreas Gänslers für den technischen Support.

Und nicht zuletzt gilt mein Dank allen Patienten, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



---

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Molekulargenetische Mutationsanalyse im Promoterbereich des *obese*-Gens bei Patientinnen mit Anorexia nervosa**

in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters, Klinische Forschergruppe unter Leitung von Prof. Dr. J. Hebebrand mit Unterstützung durch Dr. A. Hinney ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden größtenteils in folgenden Publikationsorgan veröffentlicht: **Molecular Psychiatry (1998) 3: 539-543.**

Marburg, den