Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters

der Philipps-Universität Marburg

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

Klinische Forschergruppe „Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation

unter besonderer Berücksichtigung von Essstörungen und Adipositas“

Ehemaliger Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

Analyse von sechs Polymorphismen und zwei Mikrosatelliten im Calpain-10-Gen bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, ihren adipösen Geschwistern und ihren Eltern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Benjamin Antwerpen

aus Freiburg

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 12. Oktober 2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Prof. Dr. J. Hebebrand
Korreferent:	Prof. Dr. J. Röper

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis **I**

Abbildungsverzeichnis **IV**

Tabellenverzeichnis **V**

1 Einleitung **1**

1.1 Das Körpergewicht 1

1.1.1 Regulation des Körpergewichts 1
1.1.2 Body-Mass-Index und Altersperzentile 3
1.1.3 Adipositas 4
1.1.4 Formalgenetische Aspekte des Körpergewichts 8
1.1.5 Molekulargenetische Aspekte der Adipositas bei der Maus und beim Menschen 9

1.2 Ansätze zur Identifizierung von Genen zur Gewichtsregulation beim Menschen 11

1.2.1 Genomscreen 11
1.2.2 Kandidatengenansatz 11

1.3 Spezielle Untersuchungen zum Calpain-10-Gen 12

1.3.1 Aufbau und physiologische Funktion von Calpainen 12
1.3.2 Vorbefunde zu Calpain-10 13
1.3.2.1 NIDDM 13
1.3.2.2 Calpain-10 und weitere Phänotypen 16
1.3.2.3 In-vivo-Analysen 17
1.3.2.4 Tiermodelle 19
1.3.3 Verknüpfung zwischen Calpain-10 und Adipositas 19

1.4 Ziel der Arbeit 21

2 Probandenkollektiv, Material und Methoden **23**

2.1 Probanden 23

2.2 Verwendete Materialien 24

2.2.1 Verwendete Chemikalien 24
2.2.2 Verwendete Enzyme 25
2.2.3 Verwendete Puffer 25
2.2.3.1 Puffer für die DNA-Extraktion 25
2.2.3.2 Puffer für die PCR 25
2.2.3.3 Puffer für die Restriktionsenzyme 25
2.2.3.4 Puffer für die Agarose-Gel-Elektrophorese 25
2.2.4 Oligonukleotide 26
2.2.5 Verwendete Großgeräte 27

2.3 DNA-Extraktion 28

2.3.1 Reagenzien und Lösungen 28
2.3.2 Durchführung 29
2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung 30
2.3.4 DNA-Verdünnung 30
2.3.5 Mikrotiterplatten 30
2.3.6 Anmerkung 30

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) 31
2.4.1 Reagenzien und Lösungen 32
2.4.1.1 Puffer und Magnesiumchlorid 32
2.4.1.2 Primer 32
2.4.1.3 dNTP´s und *Taq*-Polymerase 33
2.4.2 PCR-Optimierung 33
2.4.3 Durchführung 34
2.4.3.1 Trennung von Vor- und Nach-PCR-Bereich 34
2.4.3.2 PCR mit den Primern Cal-118-F und Cal-118-R 35
2.4.3.3 PCR mit den Primern Cal-43c-F, Cal-43d-R und Cal-43dvar-R (ARMS) 36
2.4.3.4 PCR mit den Primern Cal-19-F und Cal-19-R 37
2.4.3.5 PCR mit den Primern Cal-48-F und Cal-48-R 38
2.4.3.6 PCR mit den Primern Cal-63-F, Cal-63var-F und Cal-63-R (ARMS) 39
2.4.3.7 PCR mit den Primern Cal-38-F und Cal-38-R 40
2.4.3.8 PCR mit den Primern D2S125-F und D2S125-R sowie D2S2338-F und D2S2338-R 40

2.5 PCR - Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) 41
2.5.1 Reagenzien und Lösungen 41
2.5.1.1 Endonukleasen 41
2.5.1.2 Puffer für die Restriktion 42
2.5.2 Durchführung 42

2.6 Allelspezifische Amplifikation (ARMS) 44

2.7 Typisierung multiallelischer Mikrosatellitenmarker 45
2.7.1 Reagenzien und Lösungen 46
2.7.2 Optimierung 46
2.7.3 Durchführung 46

2.8 Gel-Elektrophorese und Photographie 49
2.8.1 Reagenzien und Lösungen 49
2.8.1.1 50 x TAE-Puffer 49
2.8.1.2 1 x TAE-Puffer 50
2.8.1.3 Auftragspuffer 50
2.8.1.4 Agarose-Gel 50
2.8.1.5 Auftragspuffer 50
2.8.1.6 123-bp-Marker 51
2.8.2 Durchführung 51

2.9 Statistische Verfahren 52
2.9.1 Kopplung 52
2.9.2 Assoziation 53
2.9.2.1 Der modifizierte χ^2-Test 53
2.9.2.2 Der exakte Test nach Fisher 54
2.9.2.3 Der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT) 54
2.9.2.4 Der Pedigree-Disequilibrium-Test (PDT) 55
2.9.3 Die Bonferroni-Korrektur 55
2.9.4 Das Hardy-Weinberg-Disequilibrium 56
2.9.5 Bildung von Haplotypen 57

2.10 Anmerkung 58

3 Ergebnisse **59**

3.1 Auswertung der untersuchten Polymorphismen 59

3.2 Allelverteilung und Genotypfrequenzen 65

3.3 Kopplungsanalyse 68

3.4 PDT der SNPs -43, -19 und -63 69

3.5 Die Haplotypen aus den SNPs -43, -19 und -63 70

3.6 Die Diplotypen aus den SNPs -43, -19 und -63 72

3.7 TDT der Mikrosatellitenmarker D2S125 und D2S2338 76

4 Diskussion **77**

5 Zusammenfassung **82**

6 Anhang **83**

6.1 Beschreibung der untersuchten Polymorphismen 83

6.2 Genomische Umgebung des Calpain-10-Gens 83

6.3 Auszüge aus der genomischen Struktur der *CAPN10*-Region 84

6.3.1 Genomische Sequenz in der Umgebung von SNP-43 84

6.3.2 Genomische Sequenz in der Umgebung von SNP-48 85

6.4 Genomische Sequenz der Regionen um die Mikrosatellitenmarker D2S125 und D2S2338 86

6.4.1 Genomische Sequenz der Region um den Marker D2S125 86

6.4.2 Genomische Sequenz der Region um den Marker D2S2338 86

6.5 Abkürzungsverzeichnis 87

6.6 Literaturverzeichnis 88

6.7 Lebenslauf 98

6.8 Verzeichnis der akademischen Lehrer 99

6.9 Danksagung 100

6.10 Ehrenwörtliche Erklärung 101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Hardy-Weinberg-Disequilibrium 56
Abbildung 3.1: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-118-Polymorphismus im Calpain-10-Gen . 59
Abbildung 3.2: Gel-Elektrophorese des SNP-43-Polymorphismus in *CAPN10* mit nicht-variiertem Primerpaar zum Nachweis des G-Allels 60
Abbildung 3.3: Gel-Elektrophorese des SNP-43 in *CAPN10* mit variiertem Primerpaar zum Nachweis des A-Allels 60
Abbildung 3.4: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-19 im Calpain-10-Gen 61
Abbildung 3.5: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-48 im Calpain-10-Gen 62
Abbildung 3.6: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-63 im Calpain-10-Gen mit nicht-variiertem Primerpaar zum Nachweis des C-Allels 63
Abbildung 3.7: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-63 im Calpain-10-Gen mit variiertem Primerpaar zum Nachweis des T-Allels 63
Abbildung 3.8: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-38 im Calpain-10-Gen 64
Abbildung 6.1: Aufbau und Umgebung des *CAPN10*-Gens auf Chromosom 2 83
Abbildung 6.2: Genomische Sequenz in der Umgebung von SNP-43 84
Abbildung 6.3: Genomische Sequenz in der Umgebung von SNP-48 85
Abbildung 6.4: Genomische Sequenz der Region um den Marker D2S125 86
Abbildung 6.5: Genomische Sequenz der Region um den Marker D2S2338 86

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Definition der Gewichtsklassen ... 3
Tabelle 1.2: BMI-Altersperzentile für verschiedene Gewichtsklassen ... 5
Tabelle 1.3: Risikofaktoren für die Entwicklung von Übergewicht bei Kindern und Jugendlichen ... 7
Tabelle 1.4: Monogene Tiermodelle der Adipositas und ihre Verknüpfung zur Adipositas beim Menschen ... 10
Tabelle 1.5: Monogene Formen der Adipositas beim Menschen ... 10
Tabelle 1.6: Übersicht über Assoziations- und Kopplungsstudien von SNP-43 -19 und- 63 in Bezug auf NIDDM ... 15
Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Studiengruppe ... 23
Tabelle 2.2: Geschlechterverteilung bei den Indexprobanden und den Geschwistern ... 23
Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller ... 24
Tabelle 2.4: Enzyme und ihre Bezugsquellen ... 25
Tabelle 2.5: Verwendete Primer und ihre Hersteller ... 26
Tabelle 2.6: Verwendete Großgeräte und ihre Hersteller ... 27
Tabelle 2.7: Bei der DNA-Extraktion verwendete Lösungen ... 28
Tabelle 2.8: Zusammensetzung des bei der DNA-Extraktion angewendeten *Pronase*-Reaktionsmixes ... 29
Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Puffer für die PCR ... 32
Tabelle 2.10: Verwendete Primer und ihre Sequenzen in 5' → 3'- Richtung ... 33
Tabelle 2.11: Ausgangs-Rezept für die PCR-Optimierung ... 34
Tabelle 2.12: Zusatzreagenzien für die PCR-Optimierung ... 34
Tabelle 2.13: Stoffkonzentration für den Cal-118-F/R Reaktionsmix ... 35
Tabelle 2.14: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-118-F/R ... 35
Tabelle 2.15: Stoffkonzentration für den Cal-43C-F/Cal-43D-R- bzw. Cal-43C-F/Cal-43Dvar-R- Reaktionsmix ... 36
Tabelle 2.16: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-43c-F/Cal-43d-R ... 36
Tabelle 2.17: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-43c-F/Cal-43dvar-R ... 36
Tabelle 2.18: Stoffkonzentration für den Cal-19-F/R Reaktionsmix ... 37
Tabelle 2.19: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-19-F/R ... 37
Tabelle 2.20: Stoffkonzentration für den Cal-48-F/R Reaktionsmix ... 38
Tabelle 2.21: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-48-F/R ... 38
Tabelle 2.22: Stoffkonzentration für den Cal-63-F/R Reaktionsmix ... 39
Tabelle 2.23: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-63-F/R ... 39
Tabelle 2.24: Stoffkonzentration für den Cal-63var-F/Cal-63-R Reaktionsmix ... 39
Tabelle 2.25: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-63var-F/Cal-63-R ... 40
Tabelle 2.26: Stoffkonzentration für den Cal-38-F/R Reaktionsmix ... 40
Tabelle 2.27: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-38-F/R ... 40
Tabelle 2.28: Angabe der verwendeten Enzyme, der Mikroorganismen, aus denen sie gewonnen wurden, sowie ihrer Erkennungssequenz und ihrer Konzentration ... 41
Tabelle 2.29: Bei der RFLP benutzte Puffer, ihre Bezugsquellen und ihre Zusammensetzung ... 42
Tabelle 2.30: Für Restriktionsverdau benutzte Enzyme und zugehörige Puffer ... 42
Tabelle 2.31: Reaktionsbedingungen für die Restriktionsverdaue ... 43
Tabelle 2.32: Design der ARMS-Primer zur Vermeidung von Fehlamplifikationen. ... 44
Tabelle 2.33: Verwendete Reagenzien mit den eingesetzten Mengen für die Gele zur Mikrosatelliten-Typisierung ... 46
Tabelle 2.34: Stoffkonzentrationen für den D2S125-F/D2S125-R-Reaktionsmix zur Herstellung der DNA-Fragmente, die mittels des Li-Cor typisiert werden sollen. ... 46
Tabelle 2.35: Stoffkonzentrationen für den D2S2338-F/D2S2338-R-Reaktionsmix zur Herstellung der DNA-Fragmente, die mittels des Li-Cor typisiert werden sollen. ... 47
Tabelle 2.36: Amplifikationsbedingungen für die PCR mit den Primern D2S125-F und D2S125-R ... 47

Tabelle 2.37: Amplifikationsbedingungen für die PCR mit den Primern D2S2338-F und D2S2338-R 47
Tabelle 2.38: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers 49
Tabelle 2.39: Zusammensetzung des 1xTAE-Puffers 50
Tabelle 2.40: Zusammensetzung des Auftragspuffers 50
Tabelle 2.41: Vierfeldertafel für den modifizierten χ^2-Test 53
Tabelle 2.42: Vierfeldertafel für den TDT 55
Tabelle 3.1: Allelfrequenzen im Teilkollektiv 66
Tabelle 3.2: Allelfrequenzen im Gesamtkollektiv 67
Tabelle 3.3: Genotypfrequenzen von SNP-43, -19 und -63 67
Tabelle 3.4: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen der adipösen Patienten dieser Untersuchung mit Kontrollen und an NIDDM erkrankten Patienten der Untersuchung von Horikawa und Mitarbeitern (2000). 68
Tabelle 3.5: Berechnung der Werte des Two-Point-LOD der Marker D2S125 und D2S2338 sowie der SNPs -118, -43, -19, -63 ,-48, -38. 68
Tabelle 3.6: PDT von SNP-43, SNP-19 und SNP-63 von 166 Indexprobanden, deren Eltern und Geschwistern. 69
Tabelle 3.7: Haplotypfrequenzen 70
Tabelle 3.8: PDT der Haplotypen der 3 interessanten SNPs -43, -19 und -63 von 166 Indexprobanden. 71
Tabelle 3.9: Verteilung der Diplotypen im Teilkollektiv (n=96 Familien) bei den Eltern und die daraus errechnete zu erwartende und die wirklich beobachtete Verteilung bei deren Kindern. 73
Tabelle 3.10: Verteilung der Diplotypen im gesamten Kollektiv (n=166 Familien) bei den Eltern und die daraus errechnete zu erwartende und die wirklich beobachtete Verteilung bei deren Kindern. 74
Tabelle 3.11: Die 50 Kinder, die den „high-risk“-Diplotyp erben können, aufgelistet nach den Diplotypen der Eltern. 75
Tabelle 3.12: TDT der 10 Allele des Markers D2S125 auf Chromosom 2 in der Umgebung des Calpain-10-Gens. 76
Tabelle 3.13: TDT der 6 Allele des Markers D2S2338 auf Chromosom 2, flankierend zu *CAPN10*. 76
Tabelle 4.1: Allelverteilung der SNPs, die den „high-risk“-Diplotyp definieren, in verschiedenen Populationen 77
Tabelle 4.2: Verteilung der Haplotypen, die aus SNP-43, SNP-19 und SNP-63 gebildet werden, in verschiedenen Populationen 78
Tabelle 6.1: Beschreibung der untersuchten Polymorphismen im Calpain-10-Gen 83

1 EINLEITUNG

1.1 DAS KÖRPERGEWICHT

1.1.1 REGULATION DES KÖRPERGEWICHTS

Das Körpergewicht muss als ein von vielen Einflussgrößen regulierter Phänotyp aufgefasst werden. Kulturelle, sozioökonomische, metabolische und psychosoziale Aspekte sind bei der Betrachtung des Einzelnen mit einzubeziehen. Es findet eine Interaktion zwischen erblichen Voraussetzungen (Veranlagung) und Umwelteinflüssen (hochkalorische, fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel) statt [Hebebrand und Remschmidt, 1995a]. Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien sowie tierexperimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle spielen [Hebebrand und Remschmidt, 1995b; Bouchard und Pérusse, 1993]. Es wurde nachgewiesen, dass genetische Faktoren an der Ausprägung des Körpergewichts einen Anteil von 40-70% haben [Farooqi und O´Rahilly, 2005; Barsh et al., 2000; Maes et al., 1997]. Schätzungen gehen davon aus, dass der Einfluss genetischer Faktoren, die dazu führen, dass die mit Adipositas verknüpften Merkmale ausgebildet werden, gerade bei Jugendlichen bei 50% und höher liegt [Comuzzie et al., 2001; Pietilainen et al., 1999; Wauters et al., 1998]. Erschwert wird die Suche nach genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation dadurch, dass nur in seltenen Fällen (z.B. bei kongenitaler Leptindefizienz [Montague et al., 1997]) ein klassischer Mendelscher Erbgang vorliegt und dass es sich selten um monogene Störungen handelt. Man muss davon ausgehen, dass Veränderungen in vielen verschiedenen Genen mit jeweils geringem Einfluss auf das Körpergewicht im Zusammenspiel zu weit reichenden Veränderungen am Phänotyp Körpergewicht beitragen. Es handelt sich also um einen polygenetischen Phänotyp. Zudem liegt eine genetische Heterogenität vor, d.h. Mutationen bzw. Varianten in verschiedenen einzelnen Genen können zum gleichen Phänotyp führen [Hebebrand und Remschmidt, 1995a+b; Bouchard und Pérusse, 1993].

Das Körpergewicht wird vom Verhältnis von Energieaufnahme in Form von Nahrung zu Energieverbrauch in Form von Muskelarbeit, Stoffwechselprozessen und Wärmeproduktion bestimmt. Erstaunlich ist, dass das Körpergewicht eines Erwachsenen bei kurzfristigen Schwankungen zwischen Energieaufnahme und -verbrauch relativ konstant bleibt und dass bei einer jährlichen Gesamtenergiezufuhr von etwa 800 000 kcal nur ein geringer Teil in zusätzliche Fettmasse umgesetzt wird. Hieraus resultiert eine Gewichtszunahme von nur etwa 100 bis 300 g pro Jahr [Hebebrand und Remschmidt, 1995a]. Erst wenn ein Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und -verbrauch über längere Zeit besteht, ändert sich das Körpergewicht merklich. Die Gegenregulierungsmechanismen wie Erhöhung der fettfreien Masse und damit

Erhöhung des Energieverbrauchs bei Überernährung oder die Einschränkung der Bewegung bei Unterernährung können das Missverhältnis nicht mehr auffangen. Es kommt zu Übergewicht bzw. Adipositas oder im entgegengesetzten Fall zu Untergewicht bzw. Anorexia nervosa [Hebebrand und Remschmidt, 1995 a].

Die Regulation des Körpergewichts ist ein komplexer Vorgang, der durch viele verschiedene periphere und zentrale Prozesse, gesteuert wird. Die Art und Häufigkeit sowie die Dauer der Nahrungsaufnahme wird neben verschiedenen Faktoren wie Tageszeit, sozialen Faktoren und Gewohnheiten vor allem durch das Zentrale Nervensystem (ZNS) gesteuert. Hierbei kommen dem Hypothalamus als zentralem Regulator und dem Nucleus arcuatus als Teil des Hypothalamus entscheidende Rollen zu. Im Nucleus arcuatus sind zwei neuronale Kerngebiete für die Gewichtsregulation maßgeblich. Im einen Gebiet werden AGRP (agouti-related protein) und NPY (Neuropeptid Y) gebildet, im anderen POMC (Proopiomelanocortin) und CART (cocaine- and amphetamine-related transcript). Die ersten beiden wirken als Verstärker der Nahrungsaufnahme und Verminderer des Energieverbrauchs, die letzten beiden wirken gegenteilig. Kommt es in diesen Regelkreisen zu Veränderungen oder wird gar eins der Gebiete im Nucleus arcuatus zerstört, so hat dies Auswirkungen auf das Körpergewicht. Die beteiligten Regelkreise erhalten Informationen durch zirkulierende Hormone und Metaboliten (z.B. Insulin, Glukose), aus den Fettdepots (Leptin), sowie über nervale Reflexe über den Nervus Vagus und über den Nucleus solitarius, der im Hirnstamm gelegen ist und Nervensignale aus dem Gastrointestinal-Trakt, dem Bauchraum und der Mundhöhle vereint. Hierbei handelt es sich um eine stark vereinfachte Darstellung. [Übersicht in Bell et al., 2005; Schwartz et al., 2000; Klinke und Silbernagel, 1994].

Forschungen der letzten Jahre haben ein genaueres Bild des Zusammenspiels der Signalmoleküle geliefert. So hat z.B. Leptin, das in den Adipozyten ausschließlich des weißen Fettgewebes gebildet wird und von Rezeptoren im Gehirn und in der Peripherie gebunden wird, Einfluss auf das Essverhalten, indem es dem Gehirn Rückmeldung über die Größe der Fettmasse und damit über die vorhandenen Energiereserven gibt. Der Serumspiegel des Leptins korreliert positiv mit der Körperfettmasse und dem BMI (Body-Mass-Index, s.u.) [Friedmann und Halaas, 1998]. Mutationen im Leptin-Gen [Strobel et al., 1998; Montague et al., 1997] oder dem Leptinrezeptor-Gen [Clement et al., 1998] führen bei Mäusen und bei Menschen zu Übergewicht. Damit muss dem Leptin eine zentrale Rolle in der Langzeit-Gewichtsregulation zugesprochen werden [Considine, 2005; Schwartz et al., 2000]. Ghrelin, das vor allem in Magen und Duodenum sezerniert wird, steigt vor Nahrungsaufnahme an und fällt nach Nahrungsaufnahme wieder ab. Damit gibt Ghrelin wohl eher über kurzfristige Änderungen im Energiehaushalt Rückmeldung [Kohno et al., 2003]. Ein weiterer Botenstoff ist Insulin, das in der Bauchspeicheldrüse gebildet wird und durch den Blutkreislauf zum Gehirn gelangt, wo es

die Energieaufnahme drosselt und den Energieverbrauch erhöht. Neurotransmitter wie Gamma-Amino-Buttersäure, NPY, AGRP, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin haben unterschiedlichen, oft noch nicht bis ins letzte Detail entschlüsselten Einfluss auf die Regulation des Körpergewichts. Gerade auf diesem Gebiet der Neurotransmitter tragen Tiermodelle, insbesondere die an der Maus, in hohem Maße zu einem besseren Verständnis der Vorgänge bei [Schwartz et al., 2000]. Diese werden im Kapitel 1.1.5 „Molekulargenetische Aspekte der Adipositas bei der Maus und beim Menschen“ genauer besprochen.

1.1.2 BODY-MASS-INDEX UND ALTERSPERZENTILE

Bei der Betrachtung des Körpergewichts müssen verschiedene Variablen wie Körperlänge, Alter und Geschlecht berücksichtigt werden. Als ein Maß für das relative (körperhöhenbereinigte) Gewicht wird in der modernen Epidemiologie am häufigsten der Body-Mass-Index (BMI), auch Quetelet-Index genannt, verwendet. Der BMI bietet den Vorteil, dass er eine hohe Korrelation zum Körpergewicht und eine niedrige zur Körperhöhe aufweist [Hebebrand et al., 1994]. Der BMI wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Körperhöhe in m})^2}$$

Mit Hilfe des BMI können Gewichtsklassen abgegrenzt werden. In Tabelle 1.1 sind die Definitionen der Gewichtsklassen, wie sie die WHO 2000 festgelegt hat, aufgeführt.

Gewichtsklasse	BMI-Wert (kg/m^2)
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	≥ 25
Präadipositas	25 – 29,9
Adipositas Grad I	30 – 34,9
Adipositas Grad II	35 – 39,9
Adipositas Grad III	≥ 40

Tabelle 1.1: Definition der Gewichtsklassen (nach WHO, 2000)

Die Einteilung der Gewichtsklassen nach dem BMI weist das Problem auf, dass Alter und Geschlecht unberücksichtigt bleiben und dass der BMI aufgrund von ontogenetisch determinierten Schwankungen des relativen Körpergewichts im Prinzip jeweils nur unter Zugrundelegung der altersentsprechenden BMI-Verteilung adäquat interpretiert werden kann. Dies spielt bei der Beurteilung von Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter eine besondere Rolle. So erreicht der BMI im ersten Lebensjahr einen Gipfel, um dann nach einem Abfall ab etwa dem siebten Lebensjahr wieder kontinuierlich anzusteigen [Rolland-

Cachera, 1993]. Deshalb wurden Altersperzentilenkurven ermittelt, die es erlauben, den BMI eines Menschen zur jeweiligen geschlechtsspezifischen Alterspopulation in Bezug zu setzen. Zugrunde gelegt wurden die Daten der Nationalen Verzehrstudie, die 1985 vom Bundesministerium für Forschung und Technologie in Auftrag gegeben wurde [Anders et al. 1990]. Nach Erhebung dieser Daten ist es nun möglich, Adipositas und extreme Adipositas sowie Untergewicht zu definieren [Hebebrand et al., 1994]. Im Jahr 2001 erstellten Kromeyer-Hauschild und Mitarbeiter mittels 17 Untersuchungen aus verschiedenen Regionen Deutschlands BMI-Referenzwerte für die Beurteilung des BMI bei deutschen Kindern und Jugendlichen. Des Weiteren berechneten sie Perzentile mit der Methode nach Cole [Kromeyer-Hauschild et al., 2001; Cole, 1990].

1.1.3 ADIPOSITAS

Aus evolutionsbiologischer Sicht entwickelte Neel (1962) die „thrifty genotype"-Hypothese, die Hypothese eines „Geiz-Gens", das dadurch, dass es zu Diabetes mellitus Typ II (NIDDM; non insulin dependent diabetes mellitus; nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus) prädisponiert, vor allem in Populationen, die häufig Hungersnöten ausgesetzt waren, einen Selektionsvorteil darstellte [Neel., 1962]. Es liegt nahe, diese „thrifty genotype"-Hypothese auch auf die Adipositas übertragen zu wollen. Zusätzlich galt Adipositas lange Zeit als Zeichen von körperlichem und finanziellem Wohlergehen. Erst in der heutigen Zeit mit einer fast unlimitierten Nahrungsversorgung in einigen Regionen der Erde erweisen sich die gleichen Erbanlagen als ungünstig für Gesundheit und Überleben [Hebebrand und Remschmidt, 1995a].

Definition. Als adipös gilt nach herkömmlichen Definitionen ein erwachsenes Individuum, wenn es einen BMI von 30 kg/m^2 und mehr aufweist oder wenn es oberhalb der 85. BMI-Altersperzentile liegt [WHO, 2000; Hebebrand et al., 1994]. Zur Beurteilung der Adipositas im Kindes- und Jugendalters empfiehlt die Arbeitsgemeinschaft „Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA)" nach Poskitt (1995) analog zum Erwachsenenalter den BMI zur Beurteilung von Übergewicht und Adipositas zu verwenden. Als Referenz für deutsche Kinder werden die in der Leitlinie vorgestellten Perzentile empfohlen: das 90. Perzentil gilt als Grenzwert zur Definition von Übergewicht und das 97. Perzentil als Grenzwert zur Definition von Adipositas. Eine extreme Adipositas liegt vor, wenn der BMI das 99,5. alters- und geschlechtsspezifische Perzentil überschreitet [Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft „Adipositas im Kindes- und Jugendalter", 2002; http://www.a-g-a.de/leitlinie.doc; Poskitt, 1995].

Erwachsene		Deutsche Kinder und Jugendliche	
Gewichtsklasse	BMI-Perzentil	Gewichtsklasse	BMI-Perzentil
Untergewicht	< 15		
		Übergewicht	> 90
Adipositas	85 – 95	Adipositas	> 97
extreme Adipositas	> 95	extreme Adipositas	> 99,5

Tabelle 1.2: BMI-Altersperzentile für verschiedene Gewichtsklassen
[nach Hebebrand et al., 1994; Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft „Adipositas im Kindes- und Jugendalter“, 2002]

Prävalenz und Epidemiologie. Adipositas ist in der westlichen Zivilisation eine häufige Erkrankung. In den USA gilt mittlerweile jeder dritte Erwachsene als adipös (BMI > 30 kg/m^2), die Prävalenzen in anderen Industriestaaten folgen dicht darauf, wobei auch in den Entwicklungsländern durch einen mehr und mehr „verwestlichten“ Lebensstil die Prävalenz steigt. Somit kann Adipositas als eine globale Pandemie gesehen werden [Bell et al., 2005].

Adipositas stellt ein weit reichendes gesundheitspolitisches Problem dar, da es zur Entstehung von Diabetes mellitus Typ II (NIDDM; non insulin dependent diabetes mellitus; nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus) und koronarer Herzerkrankung (KHK) beitragen kann. Das Auftreten von bestimmten Krebsformen, arterieller Hypertonie, Dyslipidämien, degenerativen Gelenkerkrankungen und respiratorischen Komplikationen wie obstruktiver Schlafapnoe ist erhöht [Calle et al., 2003; Kopelman, 2000; Übersicht in Bray et al., 1997]. Diese Folgeerkrankungen können die Lebensqualität erheblich beeinflussen und sind für das Gesundheitssystem von großer Bedeutung [Hebebrand et al., 1996].

Übergewicht und diabetische Stoffwechselstörungen haben in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Die Prävalenz für Adipositas steigt in allen Altersstufen [Seidell, 1997], das Ausmaß der Adipositas nimmt zu. Adipositas wird heute als chronische Krankheit angesehen [Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft „Adipositas im Kindes- und Jugendalter“, 2002]. In den USA werden 280.000-350.000 Todesfälle pro Jahr auf Adipositas mit Folgeerkrankungen zurückgeführt; damit ist sie die zweithäufigste Todesursache im Erwachsenenalter nach dem Rauchen [Bray und Tartaglia, 2000; McGinnis und Foege 1993, Übersicht in der Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft „Adipositas im Kindes- und Jugendalter“ von 2002; http://www.a-g-a.de/leitlinie.doc]. Sollte die Zunahmerate der Adipositas gleich bleiben, so wird vermutlich in den nächsten Jahren die Adipositas das Rauchen als häufigste Todesursache ablösen [Mokdad et al., 2004]. Zusätzlich zum allgemeinen Trend nahm die Gruppe der Menschen mit Adipositas Grad III (schwere Adipositas, BMI≥ 40 kg/m^2) überproportional stark zu. Hier liegt der Verdacht nahe, dass - über die Veränderungen der Umgebung in den letzten Jahrzehnten hinaus - genetische Ursachen für die extreme Gewichtszunahme verantwortlich sind [Flegal et al., 2002; Friedman, 2003]. In bestimmten Adipositas-Hochrisikogruppen (z.B. Pima-Indianer)

kann Adipositas nicht nur durch Lebensgewohnheiten und Umgebungsvariablen, die denen anderer Populationen ähnlich sind, erklärt werden, sondern legt eine genetische Komponente bei der Adipositasentstehung nahe [Bell et al., 2005].

Vor allem die Zunahme von Adipositas im Kindes- und Jugendalter in den USA und in Europa erregen Besorgnis: die reduzierte Lebenserwartung scheint ausgeprägter als erwartet zu sein [Fontaine et al., 2003]. Es finden sich z.T. schon jetzt bei Kindern und Jugendlichen prädiktive Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen [Weiss und Terwiliger, 2000; Troiano et al., 1995; Harlan, 1993; Cernerud, 1993; Übersicht in Bell et al., 2005]. Für Deutschland geht die AGA von einer Zunahme der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in den letzten 25 Jahren aus [Kromeyer-Hausschild und Wabitsch für die AGA, http://www.a-g-a.de/Trends.doc] und es liegt schon jetzt bei ungefähr der Hälfte der adipösen Kinder und Jugendlichen mindestens eine Folgeerkrankung (Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörung, Diabetes mellitus Typ 2, orthopädische Komplikationen) bzw. ein weiterer Risikofaktor (z.B. Hyperinsulinämie) vor [Kromeyer-Hausschild und Wabitsch für die AGA, http://www.a-g-a.de/Trends.doc]. Beim Auftreten von Adipositas in jungen Jahren ist später mit weit reichenderen gesundheitlichen Konsequenzen zu rechnen, als wenn die Adipositas erst im Erwachsenenalter manifest wird. Dies legt nahe, dass eine effektive Prävention und Therapie der Adipositas schon im Kindes- und Jugendalter sinnvoll ist [Micic, 2001; Mijailovic M et al., 2001; Mijailovic V et al., 2001]. Gerade bei Kindern und Jugendlichen ist die psychosoziale Beeinträchtigung, häufig einhergehend mit vermindertem Selbstwertgefühl, nicht zu unterschätzen. Kinder und Jugendliche, die unter Adipositas leiden, haben eine höhere Komorbidität als Normalgewichtige und darüber hinaus ein deutlich erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko im Erwachsenenalter. Eine erhöhte Morbidität als Folge der Adipositas ist bereits im Kindesalter feststellbar [Must et al., 1999].

Im Laufe der Zeit konnten verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung von Übergewicht ausgemacht werden [Hebebrand und Remschmidt, 1995a+b; Poskitt, 1993]. Folgende Tabelle 1.3 stellt die wichtigsten Risikofaktoren zusammen.

Umweltabhängig	Genetisch
▪ familiäre Adipositas ▪ allein erziehender Elternteil ▪ Einzelkind ▪ Zugehörigkeit zu einer niedrigen sozialen Schicht ▪ exzessives Fernsehen ▪ körperliche Inaktivität ▪ Schlafmangel ▪ psychosoziale Deprivation ▪ mangelhafte Körperpflege durch die Eltern	▪ familiäre Adipositas ▪ Geschlecht ▪ Ethnische Abstammung ▪ Chromosomenaberrationen (z.B. Prader-Willi-Syndrom) ▪ monogen verursachte syndromale Adipositas (z.B. Leptindefizienz, Cohen-Syndrom) ▪ Oligo-, Polygenie

Tabelle 1.3: Risikofaktoren für die Entwicklung von Übergewicht bei Kindern und Jugendlichen
[aus Hebebrand und Remschmidt, 1995a; nach Poskitt, 1993]

Therapieansätze. Alle bisher verfügbaren Therapien sind palliativer Natur und müssen durchgehend angewendet werden. Setzt man die Therapie aus, so ist erneute Gewichtszunahme unvermeidbar. Insgesamt beträgt der Gewichtsverlust bei Therapie meist nur etwa 10%, was für Patient und Arzt oft nicht zufrieden stellend ist [Bray und Tartaglia, 2000]. Durch kalorienreduzierte Mischkost, vermehrte körperliche Aktivität sowie Verhaltenstherapie kann eine Gewichtsreduktion erzielt werden. An pharmakologischen Optionen gibt es die im ZNS wirkenden sog. Appetitzügler, die im Darm wirkenden Fettaufnahmehemmer (Lipasehemmer), sowie Medikamente, die die Thermongenese und damit den Energieverbrauch erhöhen. Der Einsatz dieser Medikamente ist aber durch ihr Nebenwirkungsprofil (größtenteils sympathomimetische Effekte wie Mundtrockenheit, Schlaflosigkeit, Herzpalpitationen) eingeschränkt [Bray und Tartaglia, 2000]. Chirurgische Maßnahmen sollten bei Patienten in Betracht gezogen werden, die einen BMI > 35 kg/m² mit schwerwiegenden Begleiterkrankungen oder einen BMI ≥ 40 kg/m² aufweisen und bei denen konservative Behandlungsmaßnahmen nachweislich nicht erfolgreich waren [Leitlinie Chrirugische Therapie der extremen Adipositas; http://www.adipositas-gesellschaft.de/daten/Leitlinie-Chirurgie.pdf]. Zur Anwendung kommen beispielsweise die Gastroplastik, oder das Magenband („gastric banding“). Chirurgische Verfahren zur Behandlung der Adipositas Grad III zeigen in gut dokumentierten Langzeitergebnissen eine Reduktion der Komorbidität und eine deutlich erhöhte Lebensqualität der von der extremen Adipositas betroffenen Menschen [Fontaine et al., 2001]. Sie werden daher international als sichere und effektive Maßnahmen anerkannt [Kellum et al., 1998]. Operationen bei Jugendlichen unter 18 Jahren sind aber nur in Ausnahmefällen indiziert. Die chirurgische Versorgung stellt große Herausforderungen an die perioperative Versorgung des Patienten. [Leitlinie Chrirugische Therapie der extremen Adipositas; http://www.adipositas-gesellschaft.de/daten/ Leitlinie-Chirurgie.pdf].

1.1.4 FORMALGENETISCHE ASPEKTE DES KÖRPERGEWICHTS

Zwillings-, Familien- und Adoptionsstudien sprechen für eine genetische Komponente beim Phänotyp Körpergewicht [Farooqi und O´Rahilly, 2005; Barsh et al., 2000].

Beobachtungen an getrennt und gemeinsam aufgewachsenen monozygoten und dizygoten Zwillingen zeigen, dass die genetische Komponente einen wesentlichen und die Umgebung nur einen geringen Einfluss auf den BMI hat: bei monozygoten Zwillingen betrug die Intrapaar-Korrelation des BMI unabhängig vom Geschlecht 0,74. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen getrennt oder gemeinsam aufgewachsenen Zwillingen. Dagegen lag die Intrapaar-Korrelation des BMI bei dizygoten Zwillingen bei 0,32. Das entspricht einer geschätzten Heritabilität von 50-90% [Maes et al., 1997]. Bei Zwillingsstudien von Bouchard und Pérusse lag die Heritabilität zwischen 60% und 90%. Dies traf sowohl auf getrennt als auch auf gemeinsam aufwachsende Zwillinge zu [Bouchard und Pérusse, 1993]. Die Korrelation des BMIs von Kindern, die bei Ihren biologischen Eltern aufwuchsen, zu dem BMI ihrer Eltern betrug 0,19. Im Gegensatz dazu betrug die Korrelation des BMIs von adoptierten Kinder zum BMI ihrer Adoptiveltern nur 0,06, was einen relativ geringen Einfluss der Umgebungsvariablen anzeigt [Maes et al., 1997]. Insgesamt zeigten Adoptions- und Familienstudien geringere Heritabilitätsschätzungen (10-30%) für den BMI, wobei jedoch zum ersten Mal in einer großen Familienstudie eine Heritabilitätsschätzung bei 67% lag [Maes et al., 1997, Hebebrand und Remschmidt, 1995a+b; Bouchard und Pérusse, 1993].

Abgesehen von der Neugeborenenperiode, in der die Heritabilität nur etwa 40% beträgt, beeinflusst das Alter die Heritabilität nicht in grundlegendem Maße [Vlietinck et al., 1989]. Die intrauterinen Umwelteinflüsse beeinflussen nachweislich das Geburtsgewicht. Zwillingsstudien weisen darauf hin, dass dieser Umwelteinfluss schnell bis zum Schulalter von genetischen Einflüssen abgelöst wird, und lassen vermuten, dass die Heritabilität des BMI meist während später Kindheit oder im jugendlichen Alter geprägt wird [Pietilainen et al., 1999]. Die Gene, die bei der Gewichtsregulation eine Rolle spielen, sind offenbar nicht das ganze Leben hindurch dieselben. Nach einer großen longitudinalen Zwillingsstudie beeinflussen nur 40% der genetischen Faktoren, die den BMI im Alter von 20 Jahren beeinflussen, auch noch den BMI im Alter von 48 Jahren. Danach ändert sich die „Zuständigkeit“ der Genen für den BMI kaum noch [Fabsitz et al., 1992; Übersicht in Hebebrand et al, 2001]. Die Umweltfaktoren, die 30% der Varianz des BMI erklären, sind für den jeweiligen Zwillings spezifisch. Der genetische Einfluss fand sich im Bereich des gesamten Gewichtsspektrums [Stunkard et al., 1990].

1.1.5 MOLEKULARGENETISCHE ASPEKTE DER ADIPOSITAS BEI DER MAUS UND BEIM MENSCHEN

Besonders auf dem Gebiet der Neurotransmitter, aber auch zur Beobachtung von Essverhalten und körperlicher Aktivität tragen Tiermodelle, insbesondere die an der Maus, zu einem besseren Verständnis der Vorgänge der Adipositasentstehung bei. So belegen Tiermodelle, dass verschiedene Einzelgen-Mutationen mit Adipositas assoziiert sind. Am bekanntesten sind die *obese (ob/ob)*- und die *diabetes (db/db)*-Mäuse. Hierbei handelt es sich um rezessiv vererbte Gen-Mutationen:

1973 führte Coleman sogenannte Parabioseversuche durch, in denen die Blutkreisläufe von adipösen *obese (ob/ob)*- und *diabetes (db/db)*-Mäusen mit denen von normalgewichtigen Mäusen gekoppelt wurden. Das Gewicht der *ob/ob*-Mäuse nahm ab, das der *db/db*-Mäuse blieb konstant. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Adipositas bei *ob/ob*- und bei *db/db*-Mäusen durch Fehler im gleichen Übertragungsweg hervorgerufen wird. Die *db/db*-Mäuse schienen resistent gegen den Signalfaktor zu sein, der den *ob/ob*-Mäusen fehlte und der den *ob/ob*-Mäusen hier durch die Kopplung mit normalgewichtigen Mäusen zugeführt wurde und damit zur Gewichtsabnahme führte [Coleman, 1973]. Die Phänotypen der *obese (ob)*- bzw. der *diabetes (db)*-Mäuse sind durch eine Verdopplung bis Verdreifachung des Körpergewichts, Diabetes, Hypothermie und Infertilität der Weibchen gekennzeichnet [Hinney et al, 1997].

Zhang und Mitarbeitern (1994) gelang die Sequenzierung und Klonierung des *ob*-Gens und des dazu homologen humanen Gens [Zhang et al., 1994]. Das Genprodukt des *ob*-Gens ist Leptin, das fast ausschließlich im weißen Fettgewebe gebildet wird und als Hormon an der Regulation des Körpergewichts beteiligt ist. 1995 wurde von Tartaglia und Mitarbeitern der dazugehörige Leptinrezeptor kloniert [Tartaglia et al., 1995]. Schon 1992 klonierten Bultmann und Mitarbeitern das *Agouti*-Gen [Bultmann et al., 1992].

Insgesamt sind beim Menschen fünf monogene Formen der Adipositas bekannt (s. Tabelle 1.5 auf der folgenden Seite), bei denen Mutationen Fehler in den Signalübertragungswegen des Leptin und im Melanocortinsystem verursachen: Leptin [Ozata et al., 1999; Strobel et al., 1998; Montague et al., 1997], Leptinrezeptor [Clement *et al*., 1998], Prohormonconvertase 1 [Jackson *et al*., 1997] und POMC [Krude *et al*., 1998; Challis et al., 2002] als rezessive Formen sowie MC4R als einzige dominante Form [Hinney et al., 2003; Tao und Segaloff, 2003; Yeo et al., 2003; Vaisse et al., 1998]. Die rezessiven Formen sind sehr selten. Mutationen im *MC4R*-Gen treten dagegen mit einer Häufigkeit von 2-4% bei Übergewichtigen auf [Hebebrand et al., 2003].

Darüber hinaus existieren syndromale Formen der Adipositas wie das Prader-Willi-Syndrom oder das Bardet-Biedl-Sydrom.

Erbgang	Mutation	Gen der Maus	Homologes Gen beim Menschen	Homologes Genprodukt beim Menschen	Klonierung/Beschreibung
autosomal-dominant	Agouti yellow (A^y)	A^y	ASIP	Agouti-Signalprotein	Bultmann et al., 1992 Wilson et al., 1995 Lu et al., 1994
autosomal-rezessiv	Fat (fat)	Cpe	CPE	Carboxypeptidase E	Naggert et al., 1995
	Tubby (tub)	Tub	TUB	Insulin-Signalprotein	Kapeller et al., 1999 Kleyn et al., 1996 Noben-Trauth et al., 1996
	Diabetes (db)	Lepr	LEPR	Leptinrezeptor	Chen et al., 1996 Tartaglia et al., 1995
	Obese (ob)	Lep	LEP	Leptin	Zhang et al., 1994
	Fatty liver dystrophy (fld)	Lpin1	LPIN1	Lipin	Peterfy et al. 2001
	Little	Gh	GH	Growth hormone	Donahue und Beamer, 1993
	OLETF	Cckar	CCKAR	Cholezystokinin-Rezeptor A	Schwartz et al., 1999 Fumakoshi et al., 1993
	Mahogany (mg)	Atrn	ATRN	Attractin	Nagle et al., 1999 Gunn et al., 1999
	Mahoganoid (md)	Mgm1	MGRN1	Mahogunin	Phan et al., 2002

Tabelle 1.4: Monogene Tiermodelle der Adipositas und ihre Verknüpfung zur Adipositas beim Menschen [nach Pérusse et al., 2005]

Erbgang	Bezeichnung	Funktion	Beschreibung
monogen rezessive Formen	Leptin-Gen	1 Missensemutation führt zu schwerer Adipositas 1 Leserasterverschiebung führt zu einer Deletion und darüber zu einem funktionslosen Hormon.	Ozata et al., 1999 Strobel et al., 1998 Montague et al., 1997
	Leptinrezeptor	Mutation führt zu einem verkürzten, funktionslosen Leptinrezeptor.	Clement et al., 1998
	Prohormon-Convertase I (PC1)	PC1-Prozessierung wird verhindert.	Jackson et al., 1997
	POMC	Produktion eines abweichenden Proteins, das die zentrale Melanocortin-Übertragung stört. Ausfall der α-MSH-Synthese führt zu Adipositas und Nebennierenrindeninsuffizienz.	Krude et al., 1998 Challis et al., 2002
monogen dominante Form	MC4R	Frameshift- und Nonsensemutationen, die vermutlich zu einer Haploinsuffizienz des MC4-Rezeptors führen, sowie Missensemutationen.	Hinney et al., 2003 Tao und Segaloff, 2003 Yeo et al., 1998 Vaisse et al., 1998

Tabelle 1.5: Monogene Formen der Adipositas beim Menschen
[modifiziert nach Pérusse et al., 2005]

1.2 ANSÄTZE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON GENEN ZUR GEWICHTSREGULATION BEIM MENSCHEN

1.2.1 GENOMSCREEN

Ein Genomscreen ist ein systematisches und annahmefreies Verfahren, das zum Ziel hat, chromosomale Regionen, in denen Gene liegen, die in variierter Form für einen bestimmten Phänotyp von Bedeutung sind, einzugrenzen. Man benutzt dazu multiallelische Marker, die in gleichmäßigen Abständen, die nicht größer als 10 cM sein sollten, über das gesamte Genom verteilt sind. Als Marker können z.B. Mikrosatelliten dienen, die aus Di-, Tri- und Tetranukleotid-Wiederholungen (z.B. CA-CA-CA...$_n$) bestehen. Tritt nun Kopplung zwischen Allelen der Marker und der für den Phänotyp verantwortlichen Allelen auf, so kann man zuerst die so genannte Kandidatengenregion und schließlich das Gen selbst identifizieren [Hinney und Hebebrand, 2001; Lander und Kruglyak, 1995].

Hager und Mitarbeiter beispielsweise konnten 1998 mit einem konkordanten Geschwisterpaar-Ansatz bei französischen Familien einen Hauptgenort für Adipositas auf Chromosom 10 identifizieren. Dieser Kopplungsbefund konnte von Hinney et al. bestätigt werden [Hinney et al., 2005]. Lee und Mitarbeiter fanden 1999 ein signifikantes Ergebnis für die Kopplung von BMI und Körperfettmasse mit einem Genort auf Chromosom 20 [Lee et al., 1999]. Weltweit wurde in den letzten Jahren von weiteren Kopplungsbefunden berichtet [Übersicht in Pérusse et al., 2005].

1.2.2 KANDIDATENGENANSATZ

Bei der Frage, ob ein Gen als Kandidatengen in Frage kommt, lässt man sich von der physiologischen Funktion des Genprodukts, pharmakologischen und biochemischen Gesichtspunkten, dem Expressionsmuster und von tierexperimentellen Befunden leiten. Ist ein Gen schon bekannt, so kann es mittels eines Kandidatengenansatzes auf Assoziation mit einem bestimmten Phänotyp untersucht werden. Man geht davon aus, dass sich die untersuchten Regelkreise der Säugetiere - insbesondere der Nagetieren – denen des Menschen relativ ähnlich sind. In Hinblick auf Adipositas konnten in den letzten Jahren mit Kandidatengenansätzen einige relevante Gene aufgespürt werden [Übersicht in Pérusse et al., 2005]. Bei heterogenen Populationen steht man vor dem Problem, dass man nie sicher sein kann, ob Proband und Kontrollperson nicht unterschiedlichen genetischen Ursprungs sind und sich die unterschiedliche Frequenz einer Variation im Erbgut nicht hierdurch erklären lässt. Familienbasierte Untersuchungen bieten hier eine Lösung. Gleichzeitig lassen sich Familien nicht nur auf Assoziation, sondern auch auf Transmissionsungleichgewicht untersuchen [Barsh et al., 2000].

1.3 SPEZIELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM CALPAIN-10-GEN

1.3.1 AUFBAU UND PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON CALPAINEN

Calpaine sind intrazelluläre Proteasen, die eine wichtige Rolle bei zellulären Abläufen spielen. Durch ihre Prozessierungs- und Verdaueigenschaften ist es diesen Enzymen möglich, die Aktivität und die Funktion anderer Proteine genau und z.T. irreversibel zu beeinflussen. Eine Eigenschaft, die die Calpaine für die Forschung so interessant macht, ist deren Struktur: Eine Cystein-Protease-Domäne ist mit einer Calmodulin-ähnlichen, Ca^{2+}-bindenden Domäne kombiniert. So wird z.B. die Aktivität zweier Calpaine, µ- und m-Calpain, durch die Calcium-Konzentration reguliert. Die ubiquitäre Expression von µ- und m-Calpainen bei Säugetieren legt nahe, dass sie bei grundlegenden und lebensnotwendigen Funktionen der Zelle eine Rolle spielen. Diese beiden Calpaine, auch Calpain-1 bzw. -2 oder konventionelle Calpaine genannt, waren die ersten, die Aufmerksamkeit auf sich zogen und genauer untersucht wurden, um Funktion und Struktur aufzuklären. Später wurden weitere Homologe der Protease-Domäne in einer Vielzahl von Organismen gefunden. Ein paar dieser "neuen" Calpain-Homologe sind in wichtige biologische Funktionen eingebettet, wie z.B. intrazelluläre Signalübermittlung, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Einige Calpaine sind nur in bestimmten Organen zu finden. Hier wird davon ausgegangen, dass die Funktion der Calpaine eng mit der Funktion der jeweiligen Organe gekoppelt ist. Die genauen Funktionen konnten allerdings bis heute weder *in vitro* noch *in vivo* vollständig bestimmt werden. Eine Mutation im Gen, das für Calpain-3 kodiert, wird mit dem Auftreten verschiedener Muskeldystrophien in Verbindung gebracht [Huebsch et al, 2005; Horikawa et al., 2000; Sorimachi et al., 1997].

Die beiden konventionellen Calpaine bestehen aus einer kleinen (etwa 30 kDa) und einer großen (etwa 80 kDa) Untereinheit. Die große Untereinheit kann in vier Domänen unterteilt werden: Die zweite Domäne ist eine Cystein-Protease-Domäne und die vierte die kalziumbindende Domäne, die Funktionen der ersten und dritten Domäne sind bis jetzt unklar [Übersicht in Sorimachi et al., 1997].

Calpain-10 ist eine Protease, deren Gen aus 15 Exons aufgebaut ist. Es existieren mindestens acht verschiedene Splicevarianten. Die entstehenden Proteine werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich häufig gefunden [Horikawa et al., 2000].

1.3.2 VORBEFUNDE ZU CALPAIN-10

1.3.2.1 NIDDM

Genomscreen: Kopplung von NIDDM an Chromosom 2. Hanis und Mitarbeiter führten (1996) einen Genomsreen bei 330 an NIDDM erkrankten Geschwisterpaare einer mexikanisch-amerikanischen Population (Mexican Americans) durch. Bei Mitgliedern dieser in Texas, USA, ansässigen Population kommt eine mehrfach höhere Rate an Diabeteserkrankungen vor als im Gesamtdurchschnitt der USA. Es konnte ein signifikanter Nachweis für Kopplung von NIDDM an Chromosom 2 erbracht werden. Diese Genregion wurde *NIDDM1* benannt und in die Nähe des Markers D2S125 auf dem langen Arm des Chromosoms 2 bei 260,6 cM lokalisiert (Multipoint-Lod-Score = 4,03). Durch eine weitere Verfeinerung der genetischen Karte konnte *NIDDM1* in die Nähe des Markers D2S140 bei 263,6 cM lokalisiert werden. Das 1-Lod-Intervall umfasste eine 12 cM große Region von 257 cM bis 269 cM, die auch D2S125 enthält [Hanis et al., 1996].

Cox et al. zeigten 1999, dass eine Interaktion zwischen *NIDDM1* auf Chromosom 2 und einem Genort in der Nähe von *CYP19* auf Chromosom 15 bei der mexikanisch-amerikanischen Population aus Texas, USA, einen Beitrag dazu leistet, an NIDDM zu erkranken [Cox et al. 1999].

SNP-43 und der „high-risk"-Diplotyp 112/121. In einer umfangreichen Kopplungsanalyse bei an NIDDM erkrankten Geschwisterpaaren einer mexikanisch-amerikanischen Population wiesen Horikawa und Mitarbeiter (2000) in der Region um *NIDDM1* für Variationen im Calpain-10-Gen Kopplung und Assoziation mit NIDDM nach. Insgesamt wurden hierdurch 14% des populations-attributablen Risikos, an NIDDM zu erkranken, erklärt. Das Gen wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in der Chromosomen-Bande 2q37.3 lokalisiert. Neben einer Kontrollgruppe (n=112) wurden Erkrankte untersucht, wobei bei den Erkrankten drei Gruppen gebildet wurden: 1. Gruppe: alle Patienten (n=110), 2. Gruppe: Patienten mit einem Kopplungsbefund für *NIDDM1* (n=37) und 3. Gruppe: Patienten mit einem Kopplungsbefund für *NIDDM1* auf Chromosom 2 und *CYP19* auf Chromosom 15 (n=20). Bei Untersuchungen in europäischen Populationen (einer finnischen und einer deutschen) konnten 4% des populations-attributablen Risikos, an NIDDM zu erkranken, durch Variationen in diesen Genabschnitten erklärt werden [Horikawa et al., 2000].

Insbesondere drei intronischen Variationen (SNP-43, -19 und -63; SNP: single nucleotide polymorphism) wurden untersucht: SNP-43 ist ein häufiger G→A-Austausch, bei SNP-19 handelt es sich um einen 32-bp Repeat, der entweder in zweifacher oder in dreifacher Kopie vorliegt und SNP-63 ist ein einfacher C→T-Austausch. Bei SNP-43 zeigte das G-Allel einen Frequenzanstieg von der Kontrollgruppe über die 1. und 2. Patientengruppe zur 3. Gruppe (von

0,75 in der Kontrollgruppe auf 0,95 in der 3. Patientengruppe) und war zwar mit NIDDM assoziiert, jedoch wies der G/G-Genotyp selbst keinen signifikanten Anstieg des Diabetes-Risikos auf. Die Bildung von Haplotypen zeigte, dass ein Haplotyp aus den SNP-43, SNP-19 und SNP-63 einen sog. "at risk"-Haplotyp darstellte. Vier der acht möglichen Haplotypen wurden in akzeptablen Frequenzen beobachtet. Der Diplotyp (Haplotyp-Kombination) 112/121 war bei an NIDDM Erkrankten am häufigsten vertreten (Reihenfolge im Haplotyp: SNP-43, SNP-19, SNP-63; SNP-43: 1=G-Allel, 2=A-Allel; SNP-19: 1=2 Kopien des Repeats, 2=3 Kopien des Repeats; SNP-63: 1=C-Allel, 2=T-Allel). Dieser „high-risk"-Diplotyp war zudem mit einem 2,8-fachen Anstieg des Diabetes-Risikos assoziiert und könnte für die beobachtete Kopplung verantwortlich sein. Für einen der beiden Haplotypen homozygote Individuen zeigten kein erhöhtes Risiko. Es deutete nichts darauf hin, dass einer der drei SNPs eigenständig zu einer Risikoerhöhung beitragen konnte. In beiden Haplotypen lag bei SNP-43 das G-Allel vor. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass eine bestimmte Kombination zweier Risikofaktoren, die eigenständig nur einen geringen Beitrag leisten, für den Risikoanstieg verantwortlich sein könnte. Darüber hinaus schien eine gewisse Risiko-Hierarchie zu bestehen: so zeigte der Haplotyp 112 einen signifikanten Anstieg in Verbindung mit dem Haplotyp 121 und in Verbindung mit 221 eine signifikante Erniedrigung des Risikos. In Verbindung mit dem Haplotypen 111 zeigte er sich neutral [Horikawa et al., 2000].

Bei der Analyse der finnischen und deutschen Populationen zeigte sich, dass SNP-43 und SNP-63 in der finnischen Population mit NIDDM assoziiert waren. Das G-Allel von SNP-43 hatte in der finnischen Population eine Frequenz von 0,77 bei den Patienten (n=192) und eine Frequenz von 0,67 bei den Kontrollprobanden (n=191; p=0,0049). Das C-Allel bei SNP-63 hatte eine Frequenz von 0,93 bei den Patienten und eine Frequenz von 0,97 bei den Kontrollprobanden (p=0,017). Bei SNP-19 waren keine signifikanten Frequenzunterschiede zu finden. In der deutschen Population (Dresden) waren bei keinem der drei SNPs signifikante Frequenzunterschiede zu sehen (Kontrollgruppe: n=90; Patientengruppe: n=232). Bei der Haplotypfrequenzbestimmung zeigte sich eine signifikante Risikoerhöhung für NIDDM in Anwesenheit des Diplotypen 112/121: in Finnland ein 2,55-faches Risiko und in Deutschland ein 4,97-faches Risiko. Der „high-risk"-Diplotyp trat bei den nicht an NIDDM erkranken Probanden mit einer Häufigkeit von 1,3% auf, bei den an NIDDM Erkrankten mit einer Häufigkeit von 6,1% [Horikawa et al., 2000].

Folgestudien in verschiedenen Populationen. In der Folgezeit wurden in verschiedenen Populationen mehrere Assoziations- und Kopplungsstudien von SNP-43, -19 und -63 in Bezug auf NIDDM mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Eine Übersicht gibt folgende Tabelle 1.6.

Nachweis von Assoziation von *CAPN10*-Variationen mit NIDDM		
Population	Studienergebnis	Referenz
Korea	Bei an NIDDM Erkrankten hatten 69,4% ein metabolisches Syndrom. Patienten mit dem 111/121-Diplotypen wiesen ein erhöhtes Risiko für Hypertension und ein signifikant höheres Risiko für ein metabolisches Syndrom auf.	Kang et al., 2006
Südindien	„high-risk"-Diplotyp 112/121 ist signifikant mit NIDDM assoziiert	Cassel et al., 2002
Afro-Amerikaner	G/G-Genotyp an SNP-43 hat ein erhöhtes NIDDM-Risiko	Garant et al., 2002
Polen	121/121-Diplotyp mit signifikant erhöhtem NIDDM-Risiko assoziiert, nicht dagegen der 112/121-„high-risk"-Diplotyp	Malecki et al., 2002
Finnen	Bei Patienten mit NIDDM erhöhte Frequenzen für das G-Allel von SNP-43 und für das T-Allel von SNP-63 im Vergleich zu Gesunden; 121/121-Diplotyp signifikant mit erhöhtem NIDDM-Risiko assoziiert; bei 112/121 ähnlich erhöhtes Risiko; G-Allel von SNP-43 mit erhöhten Nüchternblutspiegeln an freien Fettsäuren assoziiert.	Orho-Melander et al., 2002
Skandinavisch	G/G-Genotyp von SNP-43 ging mit erhöhter insulinvermittelter Lipogenese im subkutanen Fettgewebe einher, ohne jedoch den BMI zu beeinflussen.	Hoffstedt et al., 2002b
Briten	Nicht an NIDDM erkrankte Träger des „high-risk"-Diplotyps wiesen beim oralen Glukosetoleranztest erhöhte Nüchtern- und 2-Stunden-Glukosewerte und eine erniedrigte Insulinantwort auf.	Lynn et al., 2002
Utah, europäische Abstammung	Träger des 111/221-Diplotyps hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für NIDDM.	Elbein et al., 2002
Pima-Indianer	Nicht an NIDDM erkrankte Träger des G/G-Genotyps an SNP-43 wiesen einen verminderten Postabsorptions- und insulinstimulierten Glukose-Umsatz auf, der vermutlich auf verminderte Glukoseoxidation zurückzuführen war. „high-risk"-Diplotyp ging nicht mit einer erhöhten Anfälligkeit für NIDDM einher.	Baier et al., 2000
Kein Nachweis von Assoziation von *CAPN10*-Variationen mit NIDDM		
Population	Studienergebnis	Referenz
Japaner	Keine Assoziation von *CAPN10*-Variationen mit NIDDM nachgewiesen.	Iwasaki et al., 2005
Japaner	Keine Assoziation von *CAPN10*-Variationen mit NIDDM nachgewiesen.	Horikawa et al., 2003
Finnen	Keine Assoziation von *CAPN10*-Variationen mit NIDDM nachgewiesen.	Fingerlin et al., 2002
Dänen und Schweden	Keine Assoziation von *CAPN10*-Variationen mit NIDDM nachgewiesen.	Rasmussen et al., 2002
Japaner	Keine Assoziation von SNP-43 und -44 mit NIDDM, jedoch erhöhte Serum-Cholesterol-Spiegel mit beiden SNPs assoziiert.	Daimon et al., 2002
Briten und Iren	Keine Assoziation zwischen SNP-43, -19 und -63 einzeln oder als Teil eines Haplotypen mit NIDDM nachgewiesen. Jedoch zeigt SNP-44 (an SNP-43 angrenzend) Assoziation mit NIDDM.	Evans et al., 2001
Polynesier von Samoa	Keine Assoziation zwischen NIDDM und den Allelfrequenzen der SNPs-43, -19 und -63 bzw. den aus diesen drei Polymorphismen gebildeten Haplo- und Diplotypen nachgewiesen.	Tsai et al., 2001
Oji-Cree-Indianer	Keine signifikante Assoziation von SNP-43 mit NIDDM, jedoch konnte eine Tendenz hierzu ausgemacht werden.	Hegele et al., 2001
Chinesen	Allelfrequenzen der SNPs-43, -19 und -63 unterschieden sich signifikant von denen anderer Populationen. Assoziation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.	Xiang et al., 2001

Tabelle 1.6: Übersicht über Assoziations- und Kopplungsstudien von SNP-43 -19 und- 63 in Bezug auf NIDDM

Wu et al. (2005) zeigten, dass der „high-risk“-Diplotyp in einer chinesischen Population das NIDDM-Risiko sogar senkt, dafür aber das Risiko, erhöhte Cholesterinwerte aufzuweisen, erhöht [Wu et al., 2005].

Song et al. (2004) veröffentlichten eine Metaanalyse, die 21 populationsbasierte Untersuchungen (5013 Fälle, 5876 Kontrollen) und 5 familienbasierte Untersuchungen (487 Eltern-Kind-Trios) umfasste. Die an NIDDM Erkrankten hatten höhere BMI-Werte und höhere Nüchterninsulinwerte als die Kontrollprobanden. Bei den populationsbasierten Untersuchungen konnte außer in einem rezessiven Modell, in dem für das G-Allel von SNP-43 Homozygote ein um 19% erhöhtes Risiko für NIDDM im Gegensatz zu A-Allel-Trägern hatten, keine Assoziation zwischen SNP-43 und NIDDM festgestellt werden. Die signifikante Assoziation des „high-risk“-Diplotypen mit NIDDM sei durch anfängliche, kleinere Studien überschätzt worden. Nach Entfernung dieser Studien aus der Metaanalyse konnte keine Assoziation mehr festgestellt werden. Darüber hinaus konnte keine Assoziation zwischen dem G-Allel von SNP-43 und dem „high-risk“-Diplotyp und einem metabolischen Phänotyp nachgewiesen werden. Die familienbasierten Untersuchungen zeigten lediglich eine Übertransmission des selteneren C-Allels von SNP-44 [Song et al., 2004].

Fullerton et al. (2002) genotypisierten bei 561 Individuen aus 11 Bevölkerungsgruppen von 5 Kontinenten SNP-43, SNP-19- SNP 63 und vier weitere angrenzende SNPs und untersuchten ein eventuelles Kopplungsungleichgewicht. Zusätzlich wurden die entsprechenden Regionen bei Affen untersucht, um die Abstammung zu klären. Zwischen Afrikanern und Nicht-Afrikanern zeigten sich in der Verteilung der Genotyp- und Haplotypfrequenzen größere Unterschiede als erwartet. Diese Ergebnisse lassen eine positive natürliche Selektion an dem betreffenden Genort vermuten [Fullerton et al., 2002].

1.3.2.2 CALPAIN-10 UND WEITERE PHÄNOTYPEN

Syndrom des polyzystischen Ovars (PCOS). Vom Syndrom des polyzystischen Ovars sind fast 10% der fortpflanzungsfähigen Frauen betroffen [Knochenhauer et al., 1998; Ehrmann et al., 1995]. PCOS geht mit einem beträchtlichen Risiko einher, gestörte Glukosetoleranz und NIDDM zu entwickeln [Ehrmann et al., 1999, Legro et al., 1999]. PCOS und NIDDM sind teilweise auf die gleiche Ätiologie zurückzuführen [Conn et al., 2000; Dunaif 1997; Ehrmann 1997].

Ehrmann und Mitarbeiter (2002) untersuchten 212 Frauen unterschiedlicher Abstammung, die am Syndrom des polyzystischen Ovars erkrankt waren. Hierbei fiel auf, dass Afroamerikanerinnen, die nicht an NIDDM erkrankt waren und den von Horikawa und Mitarbeitern (2000) beschriebenen 112/121-Diplotyp trugen, im Vergleich zu denen mit anderen Diplotypen beim oralen Glukosetoleranz-Test signifikant höhere Insulin-Werte

aufwiesen. Interessanterweise waren die Individuen, die den 112/121-Diplotyp trugen, weniger adipös. Zusätzlich war der 112/121-Diplotyp bei Afroamerikanerinnen und bei weißen Frauen mit einem fast 2-fachen Anstieg des Risikos assoziiert, an PCOS zu erkranken. Allerdings wurde kein Allel oder Haplotyp von heterozygoten Eltern überzufällig häufig transmittiert [Ehrmann et al., 2002].

Gonzalez und Mitarbeiter (2002) untersuchten 148 Frauen (durchschnittlicher BMI: 23,74 kg/m^2; 29% mit BMI>25 kg/m^2), bei denen das Syndrom des polyzystischen Ovars in Verbindung mit mindestens einem der Symptome Amenorrhoe, schwere Oligomenorrhoe, Androgenisierung oder Anovulationsinfertilität diagnostiziert wurde. Verglichen mit 93 nicht verwandten Kontrollprobanden konnte eine Assoziation des C-Allels an UCSNP-44 mit dem Phänotyp des Syndroms in der spanischen Bevölkerung gezeigt werden (p=0,02). Zusätzlich wurden verschiedenen *CAPN10*-Allele identifiziert, die mit vermehrtem Auftreten von Hypercholesterinämie (p=0,005) bzw. mit erhöhter familiärer Inzidenz von Krebserkrankungen (p=0,0005) assoziiert waren [Gonzalez et al., 2003]. Dagegen konnten Haddad und Mitarbeiter 2002 keine Assoziation zwischen PCOS und Variationen in *CAPN10* nachweisen [Haddad et al., 2002].

Mikrovaskuläre Funktion. Shore et al. zeigten bei nicht an NIDDM Erkrankten eine Assoziation zwischen SNP-43 und der mikrovaskulären Funktion: Bei G/G-Träger an SNP-43 war nach Erwärmen der Haut eine erhöhte maximale Hyperämie und ein erniedrigter minimaler Widerstand zu beobachten [Shore et al., 2002].

1.3.2.3 IN-VIVO-ANALYSEN

CAPN10-mRNA. Die Skelettmuskulatur gilt als das primäre Gewebe, an dem sich periphere Insulinresistenz manifestiert.

Horikawa et al. (2000) zeigten, dass der in einem Intron liegende SNP-43 die Möglichkeit, an NIDDM zu erkranken, nicht dadurch erhöht, dass das Splicen von *CAPN10*-mRNA beeinflusst wird oder dass *CAPN10* Teil eines anderen Gens ist. Wahrscheinlicher ist, dass SNP-43 und Intron 3 die Transkription und damit die Expression regulieren, indem sie eine Art Promoterfunktion übernehmen [Horikawa et al., 2000].

Hierzu lieferte eine Expressions-Untersuchung von Baier und Mitarbeitern (2000) wichtige Hinweise. Pima-Indianer, die an SNP-43 den G/G-Genotyp trugen, wiesen in der Skelettmuskulatur verminderte mRNA-Level auf. Dieser Genotyp war aber nicht mit einer erhöhten Anfälligkeit für NIDDM assoziiert; es war aber eine erhöhte Insulin-Resistenz zu beobachten. Dies könnte ein Mechanismus sein, über den *CAPN10* die Anfälligkeit für NIDDM erhöht [Baier et al., 2000]. Yang und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass die Calpain10-mRNA-Menge im Skelettmuskel bei diesen Probanden mit SNP-43 G/G-Genotyp maßgeblich von den

durch Splicing entstehenden Isoformen Calpain-10a und Calpain-10f bestimmt ist. Insgesamt entstehen mindestens 8 unterschiedliche Isoformen: Calpain-10a bis -10h. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Probanden, die an SNP-43 den Genotyp G/A oder A/A trugen, ging die verminderte Menge an Caplain-10-mRNA bei G/G-Trägern mit verminderter Expression von Calpain-10a und -10f einher [Yang et al., 2001].

Ma und Mitarbeiter entwickelten 2001 einen polyklonalen Antikörper gegen das Calpain-10 der Ratte. Damit untersuchten sie das Expressionsmuster des Calpain-10 in Geweben von Ratten, von Mäusen und von Menschen. Sie untermauerten die Annahme, dass Calpain-10 eine ubiquitär vorkommende Protease ist, und dass die Höhe der Expression und die intrazelluläre Verteilung von Kalzium beeinflusst wird [Ma et al., 2001]. 2005 wiesen Marshall und Mitarbeiter korrespondierenden Anstieg von *CAPN10*-Expression und Insulinsekretion nach und postulierten, dass eine Isoform des Calpain-10 als eine Art Kalzium-Sensor dient, um die Exozytose der Beta-Zellen des Pankreas und damit Stoffwechselvorgänge zu steuern [Marshall et al., 2005].

Logie et al. (2005) stützten die Annahme, dass Calpaine eine Rolle bei der insulinstimulierten Glukoseaufnahme spielen, wie es für die Pathogenese von periphere Insulinresistenz bei NIDDM von Bedeutung sein könnte [Logie et al., 2005]. Carlsson et al. (2005) bestätigten erniedrigte mRNA-Level bei G/G-Genotypträgern an SNP-43 und zeigten zusätzlich, dass nach einer 24-h-Infusion von Lipiden Probanden mit normaler im Gegensatz zu denen mit gestörter Glukosetoleranz erhöhte mRNA-Level aufwiesen [Carlsson et al., 2005].

Beta-Adrenorezeptor-stimulierte Lipolyse. 2002 untersuchten Hoffstedt und Mitarbeiter die Beziehung zwischen abdominellem subkutanen Fettgewebe und den drei Polymorphismen SNP-19, -43 und - 63. Bei übergewichtigen Probanden (BMI > 25 kg/m^2) wurde eine starke Assoziation zwischen der lipolytischen Funktion des beta-3-adrenergen Rezeptors (β3AR) in Fettzellen und dem SNP-19 gefunden, die bei dünnen Probanden nicht nachgewiesen werden konnte. Träger der 1/1 Kombination an SNP-19 wiesen eine 30-fach erniedrigte lipolytische Empfindlichkeit der β3AR im Vergleich zu den 1/2- und 2/2-Kombinationen. Dies war bei beiden Geschlechtern zu beobachten und wurde nicht von SNP-43 oder -63 beeinflusst [Hoffstedt et al., 2002a].

GLUT4. Paul und Mitarbeiter (2003) untersuchten den Mechanismus, mit dem Calpain die insulin-vermittelte Glukoseaufnahme in bestimmte Fettzellen beeinflusst. Sie konnten zeigen, dass die Inhibition der Calpainaktivität in einer fast 60%igen Verminderung der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme resultierte. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Inhibition von Calpain-10 die Insulin-vermittelte Migration von GLUT4-(Glukose Transporter 4)-Vesikel zur Plasmamembran und die dafür nötige Aktinreorganisation in bestimmten Adipozyten bremste. Calpain spielt also bei der Bewegung von GLUT4-Vesikeln eine Rolle und ist mit dem

Glukosestoffwechsel der Fettzellen verknüpft [Paul et al., 2003]. 2005 zeigten Cooke und Patel dagegen, dass die GLUT4 Expression in Adipozyten durch Proteosomen-Inhibitoren, nicht aber durch selektivere Calpain-Inhibitoren vermindert wird [Cooke und Patel, 2005].

1.3.2.4 TIERMODELLE

Unter der Annahme, dass Fasten Muskelabbau verursacht, fanden Salem und Mitarbeiter (2005) heraus, dass bei der Regenbogenforelle nach 35-tägigem Fasten die Expression von Calpain-1, Calpain-2 und Calpastatinen stimuliert war. Damit verbunden war einer 1,23-fache Erhöhung der katalytischen Aktivität der Calpaine. Dies legt nahe, dass Calpaine bei der Proteinmobilisation, die der Energiebereitstellung dient, eine Rolle spielen [Salem et al., 2005].

1.3.3 VERKNÜPFUNG ZWISCHEN CALPAIN-10 UND ADIPOSITAS

Adipositas ist oft mit NIDDM vergesellschaftet und prädestiniert selbst zu NIDDM [Kopelman, 2000]. Nach der "Nurses Cohort Study" von 1995 war der BMI-Wert nach Korrektur für das Alter der wichtigste Vorhersagewert für das Risiko, an Diabetes zu erkranken. Im Vergleich zu Frauen mit einem BMI von weniger als 21 kg/m^2 stieg das Diabetes-Risiko bei Frauen mit einem BMI von 25 kg/m^2 auf das fünffache, bei Frauen mit einem BMI von 30 kg/m^2 auf das 28-fache und bei Frauen mit einem BMI von 35 kg/m^2 oder mehr auf das 93-fache [Colditz et al., 1995].

Parallel dazu stieg in einer Untersuchung das NIDDM-Risiko bei Männern mit einem BMI über 24 kg/m^2 an. Verglichen mit Männern, die einen BMI von weniger als 21 kg/m^2 hatten, erhöhte sich das alterskorrigierte Risiko, an NIDDM zu erkranken, bei Männern mit einem BMI zwischen 25 und 26,9 kg/m^2 auf das 2,2-fache, bei Männern mit einem BMI zwischen 29 und 30 kg/m^2 auf das 6,7-fache und bei Männern mit einem BMI von 35 und mehr kg/m^2auf das 42-fache [Chan et al., 1994].

Es liegt nahe, dass eine genetische Variante, die bei der Entstehung von NIDDM eine Rolle spielt, ebenso zur Adipositas beitragen kann und jugendliche Adipositas später zu NIDDM führen kann. Die steigende Prävalenz von NIDDM könnte eins der ersten Anzeichen für das wachsende Problem der Adipositas in Europa sein [Seidell, 1997].

Carlsson et al. (2004) untersuchten bei Schweden die mögliche Rolle von *CAPN10* bei der Entstehung von Adipositas. Sie untersuchten je 235 adipöse und nichtadipöse Probanden in einer Fall-Kontroll-Studie und bei 116 Eltern-Kind-Trios wurde der TDT berechnet. Zusätzlich wurde bei 33 adipösen Probanden eine Biopsie des subkutanen Fettgewebes entnommen, um die *CAPN10*-mRNA-Expression zu messen. Es konnte keine Assoziation zwischen SNP-43 und Adipositas nachgewiesen werden, jedoch hatten Probanden, die homozygot für das SNP-43-G-Allel waren, signifikant höhere Triglyzerid-Level als die Träger eines A-Allels. Zusätzlich war

die *CAPN10*-mRNA-Expression bei Probanden mit dem SNP-43-G/G-Genotyp im Vergleich zu denen, die den Genotyp G/A aufwiesen, signifikant erniedrigt. Dies legt die Vermutung nahe, dass reduzierte CAPN10-Expression bei Adipösen ein Risikofaktor für Merkmale, die mit dem metabolischen Syndrom vergesellschaftet sind, sein könnte, obwohl hier Variationen im *CAPN10*-Gen per se nicht das Risiko, Adipositas zu entwickeln, zu erhöhen scheinen. [Carlsson et al., 2004].

Aus folgenden Überlegungen heraus kann die nähere Untersuchung des Calpain-10-Gens einen wertvollen Beitrag für das Verständnis der Adipositasentstehung leisten:

a) Calpain-10 zeigt einen neuen Stoffwechselweg in der Pathopyhsiologie von NIDDM auf. Es ist das dritte Beispiel einer Protease, die zur Entstehung von Diabetes beiträgt. Die anderen beiden (Prohormon-Convertase-1 und Prohormon-"prozessierende" Carboxypeptidase E) sind mit NIDDM und Adipositas bei Menschen [Naggert et al., 1995] und Mäusen [Jackson et al., 1997] assoziiert.

b) Bei einem Genomscreen für Adipositas trat ein Kopplungsbefund in der Region um *CAPN10* auf Chromosom 2q37 auf [Hager et al., 1998].

c) Der Phänotyp der Pima-Indianer, die den UCSNP-43 G/G-Genotyp zeigen, ist dem ähnlich, der in Hungerzeiten von Vorteil ist. Daher könnte das G-Allel als "thrifty"-, als "Geiz-Allel“ angesehen werden [Baier et al., 2000].

d) Calpaine sind Proteasen, die Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen bewirken, indem sie Teile derselben modifizieren. Sie sind in eine Vielzahl von Vorgängen eingebettet, z.B. spielen sie bei der intrazellulären Signalübermittlung und bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen eine Rolle und könnten auch bei Adipozytendifferenzierung und -wachstum eine Rolle spielen. Calpain-10 findet sich neben Pankreas- und Muskelzellen auch in Fettzellen [Horikawa et al., 2000; Sorimachi et al., 1997].

e) Gonzalez und Mitarbeiter identifizierten mehrere Calpain-10-Allele, die mit dem gehäuften Auftreten von Hypercholesterinämie assoziiert waren, d.h. direkt mit dem Fettstoffwechsel in Verbindung gebracht werden können. Daimon und Mitarbeiter fanden Allelkombinationen von UCSNP-43 und -44, die auch mit erhöhten Serum-Cholesterol-Spiegeln verknüpft waren [Gonzalez et al., 2003; Daimon et al., 2002].

f) Paul und Mitarbeiter zeigten 2003, dass die Inhibition der Calpainaktivität in einer fast 60%igen Verminderung der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme in bestimmte Fettzellen resultierte. Weiterhin bremste die Inhibition von Calpain-10 die Insulin-vermittelte Bewegung der GLUT4-Vesikel zur Plasmamembran und die dafür nötige Aktin-Reorganisation. Dies stellt eine Verbindung zwischen Calpain-10 und dem Stoffwechseln von Fettzellen dar [Paul et al., 2003].

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Ein wichtiges Ziel der rezenten Adipositas-Forschung ist es, die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen dieser komplexen Erkrankung zu beleuchten. Im Gegensatz zu einfachen, nach den Mendelschen Gesetzen vererbten Krankheiten, sind komplexe Krankheiten meist das Ergebnis von Aktion und Interaktion vieler Gene untereinander und mit Umweltfaktoren. Der genetische Einfluss kann von polygenisch, also mit vielen Einfluss nehmenden Genen, bei denen der Gen-Einzeleffekt eher gering ist, bis hin zu monogenen, mit relativ wenigen Genen mit vergleichbar hohem Einfluss des einzelnen Gens auf den Phänotyp, sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von 6 Polymorphismen (SNP-43, SNP-19, SNP-63, SNP-38, SNP-118 und SNP-38) im Calpain-10-Gen bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, deren adipösen Geschwistern und ihren Eltern auf den Phänotyp Adipositas zu prüfen.

Die Hypothesen lauten:

H0: Die Verteilung der Polymorphismen im Calpain-10-Gen steht in keinem Assoziations- oder Transmissionsungleichgewicht mit dem Phänotyp der früh manifesten extremen Adipositas.

H1: Die Verteilung der Polymorphismen im Calpain-10-Gen steht in einem Assoziations- oder Transmissionsungleichgewicht mit dem Phänotyp der früh manifesten extremen Adipositas.

Um einen eventuellen Einfluss zu prüfen, wurden mit den genannten sechs Polymorphismen Assoziationsstudien und Studien zum Transmissionsungleichgewicht durchgeführt. Zusätzlich wurden aus den Polymorphismen Haplotypen gebildet, wobei besonderes Augenmerk auf den aus den SNPs -43, -19 und -63 gebildeten Haplotyp gelegt wurde. Auch die Diplotypen wurden untersucht. Um Haplotypen zu bilden, wurden zwei flankierende Mikrosatellitenmarker (D2S125 und D2S2338) typisiert.

Mittels PCR und Restriktionsverdau wurden die Allel- und Haplotypfrequenzen bestimmt.

Es wurden folgende Fragestellungen geprüft:

a) Tritt für den Diplotyp 112-121, der aus der SNP-Kombination 43-19-63 gebildet wird, Transmission-Ungleichgewicht auf, d.h. wurde überzufällig häufig dieser Diplotyp von den Eltern auf die Kinder weitervererbt und ist dieser Diplotyp mit früh manifester extremer Adipositas assoziiert?

b) Für das G-Allel, das "high-risk"-Allel des SNP-43 für NIDDM, soll der PDT

aussagen, ob bei homozygotem Vorliegen (G/G) eine Assoziation mit früh manifester Adipositas besteht.

c) Explorativ soll geklärt werden, ob einer der flankierenden SNPs (SNP-118, -38 und -48) bei Adipositas Transmissionsungleichgewicht zeigt.

d) Der PDT soll explorativ für alle SNPs berechnet werden.

e) Explorativ sollen die übrigen möglichen Diplotypen auf ein eventuelles Transmissionsungleichgewicht geprüft werden.

2 PROBANDENKOLLEKTIV, MATERIAL UND METHODEN

2.1 PROBANDEN

Für die Assoziations- und Kopplungsstudien wurden 166 Familien untersucht, die aus einem extrem adipösen Kind bzw. Jugendlichen, sowie einem oder mehreren adipösen Geschwistern und beiden biologischen Eltern bestanden. Die BMI-Werte aller Probanden wurden auf Basis des gemessenen Körpergewichts und der Körperhöhe ermittelt.

Adipöse Kinder und Jugendliche, sowie deren Geschwister und Eltern wurden in Kliniken in Murnau, Berchtesgaden und Bad Orb, die sich auf die Behandlung von extremem Übergewicht spezialisiert haben, von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe Marburg rekrutiert.

Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie waren:

Indexproband: BMI ≥ 95 BMI-Altersperzentile

Geschwister: BMI ≥ 90. Altersperzentile

Alle Probanden bzw. bei Minderjährigen deren Erziehungsberechtigte gaben ihr schriftliches Einverständnis. Eine Bewilligung der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg liegt vor. Die folgende Tabelle 2.1 gibt die Zusammensetzung der Studiengruppe wieder.

Gruppe	Anzahl	Durchschnitts-alter ±δ [Jahre]	Durchschnitt-licher BMI ±δ [kg/m^2]	Durchschnittliche BMI-Perzentile ±δ [%]	Minimale und maximale BMI-Perzentile [%]
Indexprobanden	166	13,5±2,6	32,3±6,0	99,3±1,4	95-100
Geschwister	193	15,0±5,2	28,7±5,5	97,4±2,9	90-100
Mütter	166	41,6±5,2	31,3±6,3	86,3±18,9	7-100
Väter	166	44,7±5,9	31,0±5,4	82,4±22,6	2-100

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Studiengruppe

Tabelle 2.2 gibt die Geschlechterverteilung bei den Indexprobanden und den Geschwistern wieder.

	Indexprobanden		Geschwister	
weiblich	n=97	58.4%	n=102	52,9%
männlich	n=69	41,6%	n=91	47,1%

Tabelle 2.2: Geschlechterverteilung bei den Indexprobanden und den Geschwistern

2.2 VERWENDETE MATERIALIEN

2.2.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Tabelle 2.3 gibt die verwendeten Chemikalien wieder.

Chemikalie	Hersteller
123-bp-Marker	Gibco BRL
2'Propanol (Isopropanol)	Riedel-de-Haen
Acrylamid-Bis-Acrylamid (37,5:1)	Quantum
Agarose NEEO	Roth
Ammoniumperoxidsulfat $(NH_4)_2S_2O_8$	Amersham Pharmacia Biotech
Aqua ad injectabile	Braun
Borsäure	Riedel-de-Haen
Bromphenol blau	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA-Polymerisationsmix (dNTP)	Amersham Pharmacia Biotech
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Riedel-de-Haen
Ethanol, absolut	Riedel-de-Haen
Ethanol, vergällt 100%	Apotheke
Ethidiumbromid	Roth
Ethylenediamin-tetraaceticacid- $2Na2H_2O$ (EDTA)	Roth
Ficoll (Type 400)	Pharmacia Biotech
Formaldehyd 37%	Merck
Formamid	Sigma
Glycerol	Sigma
HPLC-Wasser	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Loading Dye (Stopp- und Ladepuffer)	Amersham Pharmacia Biotech
Long Ranger 50% (Acrylamid-Mischung)	BioWhittaker Molecular Applications
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	MWG/Sigma
Natriumcarbonat ($NaCo_3$)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
PCR-Puffer (10x) (magnesiumfrei)	MWG/Sigma
Puffer 0^+	MBI Fermentas
Puffer $SdaI^+$	MBI Fermentas
Puffer Y^+/Tango™	MBI Fermentas
Salpetersäure (HNO_3)	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Roth
Sodiumdodicylsulfat (SDS)	Merck
Temed ($C_6H_{16}N_2$)	Sigma
TrisHCL	Roth
Urea (Harnstoff)	Amersham Pharmacia Biotech
Xylene-Zyanol blau	Merck

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller

2.2.2 VERWENDETE ENZYME

Tabelle 2.4 gibt die verwendeten Enzyme wieder. Für ein genauere Beschreibung der Enzyme s. Tabelle 2.28 auf Seite 41.

Enzym	Bezugsquelle
*Bsp*TI	MBI Fermentas
*Sda*I	MBI Fermentas
*Bse*LI	MBI Fermentas
Pronase E	Sigma
Taq- Polymerase	MWG (SNP-19, SNP-38, SNP-48 und SNP-63) Sigma (SNP-118 und SNP-43)

Tabelle 2.4: Enzyme und ihre Bezugsquellen

2.2.3 VERWENDETE PUFFER

Alle verwendeten Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt und, wenn nicht anders erwähnt, anschließend autoklaviert. Die hierfür verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen.

2.2.3.1 PUFFER FÜR DIE DNA-EXTRAKTION

Verwendet wurden ein red cell lysis buffer (RCLB) mit pH = 7,6, ein SE-Puffer mit pH= 8,0 und ein TE-Puffer mit pH = 8,0. Die Zusammensetzung wird in Tabelle 2.7 auf Seite 28 aufgeführt.

2.2.3.2 PUFFER FÜR DIE PCR

Die Zusammensetzungen der bei der PCR verwendeten Puffer, die von den Firmen Sigma ARK und MWG bezogenen wurden, sind in Tabelle 2.9 auf Seite 32 angegeben.

2.2.3.3 PUFFER FÜR DIE RESTRIKTIONSENZYME

Die bei der Restriktion verwendeten Puffer wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 2.29 auf Seite 42 aufgeführt.

2.2.3.4 PUFFER FÜR DIE AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE

Die bei der Agarose-Gel-Elektrophorese verwendeten Puffer (50xTAE, 1xTAE und Auftragspuffer) sind in Tabelle 2.38, Tabelle 2.39 und Tabelle 2.40 auf den Seiten 49 und 50 aufgeführt.

2.2.4 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Primer wurden vom Hersteller im Synthesemaßstab 0,2 µmol produziert und mittels HPLC aufgereinigt.

In Tabelle 2.5 sind alle benutzten Primer und ihre Hersteller genannt. Die zugehörigen Sequenzen sind in Tabelle 2.10 auf Seite 33 aufgeführt.

Oligonukleotide	Hersteller
Cal-118-F Cal-118-R	Sigma ARK
Cal-19-F Cal-19-R	
Cal-38-F Cal-38-R	
Cal-48-F Cal-48-R	
ARMS:	
Cal-63-F Cal-63var-F Cal-63-R	Sigma ARK
Cal-43c-F Cal-43d-R Cal-43dvar-R	MWG
Mikrosatelliten-Typisierung:	
D2S125-F (modifiziert mit Farbstoff IRD 700) D2S125-R D2S2338-F (modifiziert mit Farbstoff IRD 700) D2S2338-R	MWG-Biotech

Tabelle 2.5: Verwendete Primer und ihre Hersteller[1]

[1] Die verwendeten Primer wurden hier zur besseren Unterscheidung von den Polymorphismen mit „Cal-“ bezeichnet.

2.2.5 VERWENDETE GROßGERÄTE

Tabelle 2.6 gibt die verwendeten Großgeräte und ihre Hersteller an.

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Analyse-Waage	SBC 51	Scaltec
Autoklav	3850 EL	Tuttnauer
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammer	Maxi Gel System	Owl-Scientific
Gefrierschränke (-80° C)	Ultra low freezer U57085 und C 66085	New Brunswick Scientific
Geltrockner mit Zeitschaltuhr mit Öldrehschieberpumpe und Kältefalle	Uni geldryer 4050 Uni cryo MC 2L – 60° C	Uniequip
Gradientenzykler	Multiblock System MBS 0,2G	Hybaid Ltd.
Kamera	Digitales Videosystem	Polaroid
Kühlschränke	glassline	Liebherr
Kühlzentrifuge	Megafuge 2.0 R	Heraeus
Magnetrührer	IKAMAG RH	IKA-Works Inc.
pH-Meter	Labor-pH-mV-Meter pH 525	WTW
Photometer	GeneQuant II	Amersham Pharmacia Biotech
Reinstwasseranlage	MiliQplus	Milipore
Schüttelwasserbad	1083 GFL	GFL
Stromgeber	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Stromgeber	Microcomputer Electrophoresis Power Supply E452 und E 734	Consort
Thermozykler groß	Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer
Thermozykler klein	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermozykler, dreifach	Touchdown	Hybaid Ltd.
Tischzentrifuge	Labofuge 400 E	Heraeus
Tischzentrifuge	Biofuge13	Heraeus
Transilluminator	UV-TM-25	Hoefer Scientific Instruments
Vortex-Schüttelgerät	MINI Schüttler MS 1	IKA-Works Inc.
Wärmeschränke	Function line Typ UT12	Heraeus
Wipp-Schüttler	Duomax 1030	Heidolph
Sequencer mit Dual-Laser-System	Li-cor DNA Analyzer Gene Readir 4200	MWG-Biotech

Tabelle 2.6: Verwendete Großgeräte und ihre Hersteller

2.3 DNA-EXTRAKTION

Genauso wie man ein Gewebe in die lebenden Zellarten, aus denen es besteht, zerteilen kann, so lässt sich eine Zelle in ihre funktionstüchtigen Organellen und Makromoleküle aufteilen. Durch osmotischen Schock werden die Blutzellen zum Platzen gebracht. Die verschiedenartigen Komponenten der durch das Aufbrechen entstandenen Mischung werden durch Zentrifugieren ihrer Masse und Dichte nach getrennt. Bei niedrigen Geschwindigkeiten sedimentieren schwere Komponenten – wie Kerne und nicht aufgebrochene Zellen – schnell und bilden am Boden des Zentrifugenröhrchens einen Niederschlag (Sediment). Zellproteine werden enzymatisch gespalten und durch hochprozentige Salzlösung gefällt. Ethanol führt dazu, dass die DNA aus dem Zellkern an der Oberfläche schwimmt. Nach dem Lösen in einem geeigneten Puffer und der Konzentrationsbestimmung kann die DNA auf eine definierte Konzentration verdünnt werden [Alberts et al., 1996; Gassen und Minol, 1996].

2.3.1 REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.7 werden die Bestandteile und Konzentrationen der bei der DNA-Extraktion verwendeten Lösungen aufgeführt.

Puffer	Konzentration	Reagenzien	g/1000ml aqua bidest.
Red cell lysis buffer (RCLB) (pH = 7,6)	10 mM	TrisHCl	1,21
	5 mM	$MgCl_2$	1,02
	10 mM	NaCl	0,58
SE-Puffer (pH= 8,0)	75 mM	NaCl	4,39
	25 mM	Na_2EDTA	8,41
TE-Puffer (pH = 8,0)	10 mM	TrisHcl	1,21
	1 mM	Na_2EDTA	0,34
Ethanol	absolut 70 %		
NaCl-Lösung	5 M		

Tabelle 2.7: Bei der DNA-Extraktion verwendete Lösungen

In Tabelle 2.8 werden die Bestandteile des Pronase-Reaktionsmixes genannt. Die *Pronase E* wird in *aqua dest*. zu einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Aliquots werden bei –20° C gelagert.

Reagenzien	Einzelprobe
SE-Puffer	5 ml
Pronase E 10 mg/ml (in *aq. dest.*)	25 µl
SDS 10 %	500 µl

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des bei der DNA-Extraktion angewendeten *Pronase*-Reaktionsmixes

2.3.2 DURCHFÜHRUNG

Die DNA extrahierten wir mit der Aussalzungsmethode nach Miller (1988) aus Leukozyten. Die Extraktion erstreckt sich über zwei Tage. Es wird EDTA-Blut verwendet, da das EDTA die Koagulation des Blutes verhindert. In einem 50-ml-Falcon werden dann 10-20 ml dieses EDTA-Blutes mit 30 ml eiskaltem RCLB gemischt, wodurch die Zellen lysieren. Diese Mischung muss 15 min bei 4° C inkubieren und währenddessen drei- bis viermal gemischt werden. Dann wird das Gemisch 10 min bei 4° C und maximaler Geschwindigkeit (3300 Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert (Heraeus, Megafuge). Der Überschuss wird abgegossen und das Sediment, in dem sich die Zellkerne und Mitochondrien mit der DNA befinden, wird mit etwas RCLB aufgenommen und dann mit RCLB auf 25 ml aufgefüllt. Anschließend wird dieses Gemisch wieder 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das neu entstandene Sediment wird mit 5,5 ml Pronase-Reaktionsmix aufgenommen und über Nacht bei 37° C schüttelnd (GFL, Schüttelwasserbad) inkubiert. Die Lösung muss klar sein. In dieser Zeit baut die *Pronase E* die in dem Gemisch befindlichen Proteine ab.

Zu dieser Lösung werden am nächsten Tag jeweils 5 ml SE-Puffer hinzugegeben und die Lösung dann 10 min, gegebenenfalls auch länger, bei 55° C schüttelnd (GFL, Schüttelwasserbad) inkubiert. Zur Proteinfällung sollen die Proben sofort nach Zugabe von 2,5 ml 5 M NaCl-Lösung 15 Sekunden gevortext werden (IKA-Works, MINI-Schüttler). Danach werden die Proben bei Raumtemperatur und mit 3300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Heraeus, Megafuge), wobei sich die durch die Salzlösung gefällten Proteine absetzen. Der Überstand, in dem sich nun die DNA befindet, wird in ein 50-ml-Falcon umgefüllt. Dieses Falcon wird mit Ethanol aufgefüllt, und die beiden entstehenden Phasen werden langsam gemischt. Die DNA sollte durch die Alkoholzugabe an der Oberfläche schwimmen. Danach wird die DNA mit einem Haken (Pasteurpipette mit zusammengeschmolzener Spitze) gefischt, kurz in 70 % Ethanol geschwenkt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer mit pH 8,0 bei 4° C über Nacht (Heidolph, Rotor Duomax 1030) oder 1-2 h bei 50° C im Wasserbad (GFL, Schüttelwasserbad) gelöst.

Anders wird bei vielen kleinen DNA-Bruchstücken verfahren: Nach der Fällung wird die DNA

für 20 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit ein weiteres Mal zentrifugiert (Heraeus, Megafuge). Die DNA setzt sich auf dem Boden des Falcons ab und der Überstand kann abgegossen werden. In das Falcon werden 1,5 ml 70 % Ethanol gegeben, um beides gemeinsam in ein Eppendorf-Cup überführen zu können. Das Gemisch wird bei 14 000 x g zentrifugiert (Heraeus, Labofuge 400 E), dann das Ethanol entfernt. Das Pellet, das die DNA enthält, soll einige Minuten an der Luft trocknen und, wie weiter oben beschrieben, in TE-Puffer gelöst werden [modifiziert nach Miller et al., 1988].

2.3.3 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Menge an DNA, die aus verschiedenen Blutproben gewonnen werden kann, ist sehr unterschiedlich und muss daher bestimmt werden. Die Konzentration der in TE-Puffer gelösten DNA wird mit Hilfe eines Photometers (Amersham Pharmacia Biotech, GeneQuant II) bestimmt. Die gelöste DNA wird mit destilliertem Wasser 1:200 verdünnt und die Extinktion dieser Lösung im Photometer gemessen. Folgende Formel dient zur Berechung der Konzentration:

DNA-Konzentration (µg/ml) = Verdünnung x 50 µg/ml x $E_{260\ nm}$

mit $E_{260\ nm}$ = Extinktion bei 260 nm

Die erreichte DNA-Konzentration sollte zwischen 300 und 1000 µg/ml liegen und das Verhältnis zwischen DNA und Proteinen sollte 1,5 nicht unterschreiten.

2.3.4 DNA-VERDÜNNUNG

Nachdem die DNA-Konzentration bestimmt wurde, wird ein Teil der DNA-TE-Lösung so mit *aqua bidest.* verdünnt, dass die DNA-Konzentration der Verdünnung 25 ng/µl beträgt. Sowohl die Verdünnungen als auch die Ursprungslösungen werden bei -80° C tiefgefroren.

2.3.5 MIKROTITERPLATTEN

Zur einfacheren Verarbeitung der Proben werden die DNA-Verdünnungen auf Mikrotiterplatten verteilt. Auf Eis werden in jedes der 96 Wells einer Platte 30µl pipettiert und die Platten bei minus 20° C tiefgefroren.

2.3.6 ANMERKUNG

Nur ein Teil der Blutproben wurde von mir selbst extrahiert. Zum großen Teil konnte ich auf die Bestände der Klinischen Forschergruppe zurückgreifen.

2.4 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction - PCR) ist eine *in vitro* Methode, um zellunabhängig eine definierte DNA-Sequenz schnell vervielfältigen zu können. Die PCR wurde 1987 von Mullis und Faloona entwickelt; seitdem zählt sie in molekularbiologischen Laboren zu einer Routinemethode [Mullis et Faloona, 1987]. Da es sich um eine Hintereinanderschaltung von vielen Polymeraseschritten handelt, sprich man von Polymerase-Kettenreaktion.

Als Ausgangsmaterial dient genomische DNA oder cDNA. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) sind zu kurzen Abschnitten der zu kopierenden DNA-Einzelstränge komplementär und rahmen so das Zielgebiet ein. Um sie herzustellen, benötigt man Informationen über die Sequenz, die vervielfältigt werden soll. Primer dienen als Startpunkt für eine Kettenverlängerung, da an ihren 3'-Enden eine DNA-Polymerase die entsprechenden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) anbauen kann. Die Primer sollten so gewählt werden, dass sie sich an ihrem 3'-Ende nicht aneinander anlagern können und sie in etwa gleich lang sind (zwischen 15 und 30 Basen, Unterschied zwischen den beiden Primern nicht größer als 2-3 Basen). Tandemförmige Wiederholungen sollten vermieden werden und der GC-Gehalt sollte 50% betragen. Er bestimmt die Schmelztemperatur, die bei beiden Primern ähnlich sein sollte. Zur ungefähren Berechnung der Schmelztemperatur kann folgende Formel verwendet werden:

Schmelztemperatur T_m [° C]= 2 x Anzahl der AT-Basenpaare + 4 x Anzahl GC-Basenpaare

Durch die Entdeckung einer hitzestabilen Polymerase ist es möglich geworden, die Zyklenabfolge zu automatisieren. Die hier verwendete Polymerase wird aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) gewonnen, der in heißen Quellen seinen natürlichen Lebensraum hat. Jeder Zyklus besteht aus drei zeitlich genau definierten Abschnitten. In jedem Zyklus dient zusätzlich die neusynthetisierte DNA als Matrize, so dass eine exponentielle Vermehrung der oft nur in geringer Menge vorliegenden Ausgangs-DNA möglich ist. Man erhält etwa 2^n Kopien (n = Anzahl der Zyklen). Die *Taq*-Polymerase reagiert empfindlich auf die Magnesiumchloridkonzentration. Da Desoxynukleosidtriphosphate äquimolar Magnesiumionen binden, ist die genaue Konzentration an freiem Magnesium von der Konzentration der dNTPs abhängig. Ebenso bindet EDTA zweiwertige Kationen wie Magnesiumionen. Die Konzentration an Magnesiumionen sollte zwischen 1,5 und 4 mM liegen, da es bei niedrigeren Konzentrationen zur Inaktivierung der *Taq*-Polymerase kommen kann und bei höheren die Bildung von Nebenprodukten steigt. Die einzelnen Schritte eines Zyklus sind:

- Denaturierung: Bei 93-95° C zerfällt menschliche genomische DNA in Einzelstränge. Nur wenn die DNA in Einzelsträngen vorliegt, können sich die Primer anlagern. Die *Taq*-Polymerase wird durch die hohe Temperatur idealerweise nicht zerstört, muss also nur einmal zu Beginn in ausreichender Menge zugegeben werden.
- Anlagerung (Annealing): Bei 50-70° C lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. Die genaue Temperatur liegt meist etwa 5° C unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer. Es sollte ein Primerüberschuss vorliegen, um spontane Renaturierung der DNA-Einzelstränge zu minimieren.
- Synthese (Kettenverlängerung): Das Arbeitsoptimum der *Taq*-Polymerase liegt bei 70-75° C. In einer Sekunde werden bis zu 150 Nukleotide angebaut.

Diesen Zyklen wird ein längerer Denaturierungsschritt (z.B. 5 Minuten bei 94° C) vorangestellt, um die Bildung der Einzelstränge voranzutreiben. Ein längerer Syntheseschritt (z.B. 5 Minuten bei 72° C) nach der Zyklenfolge soll die Fertigstellung von inkomplett gebildeten DNA-Kopien ermöglichen. Danach wird das Gemisch auf 4° C abgekühlt und muss somit nicht sofort weiterverarbeitet werden [Strachan und Read, 1996; Mullis et Faloona, 1987].

2.4.1 Reagenzien und Lösungen

2.4.1.1 Puffer und Magnesiumchlorid

Für die PCR wurden die von dem jeweiligen Hersteller mit der *Taq*-Polymerase mitgelieferten Puffer und das $MgCl_2$ verwendet. Für die Primer Cal-19, Cal-38, Cal-48 und Cal-63 wurden die Reagenzien von der Firma MWG benutzt, für Cal-118 und Cal-43 die von Sigma.

Tabelle 2.9 gibt die Zusammensetzung der Puffer an. Die $MgCl_2$-Stocklösungen lagen in einer Konzentration von 25 mM vor.

Hersteller	Zusammensetzung
Sigma ARK	100 mM Tris-HCl pH 8,3 500 mM KCl
MWG	100 mM Tris-HCl pH 9,0 500 mM KCl 1% Triton X-100

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Puffer für die PCR

2.4.1.2 Primer

Die Primer-Sequenzen wurden der Sequenz AF158748 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) entnommen und die Primer dann mit dem im Internet frei zugänglichen Programm "Primer3" (Copyright 1996, 1997, 1998 Whitehead Institute for Biomedical Research; Adresse: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) oder im Falle der Primer

zur Mikrosatellitentypisierung angelehnt an Angaben aus der Datenbank „The Genome Database“ (GDB, Adresse im Internet: http://www.gdb.org/) erstellt. In Tabelle 2.10 sind die Sequenzen der verwendeten Primer angegeben. Die Sequenzen sind in 5' → 3'- Richtung angegeben. "F" steht für den jeweiligen Primer in Vorwärtsrichtung, "R" für die Rückwärtsrichtung. Außer für den Primer Cal-118-R, für den eine 500 pmol/µl-Stocklösung angefertigt wurde, wurden nach Erhalt der Primer mit *Aqua ad injectabile* 1000 pmol/µl-Stocklösungen hergestellt, die bei -20°C gelagert wurden. Aus den Stocklösungen wurden kleine Mengen 25 pmol/µl-Verdünnungen (bei den Primern für die Mikrosatellitentypisierung: 10 pmol/µl-Verdünnungen; bei Cal-118-F: 50 pmol/µl-Verdünnung) für den Tagesgebrauch hergestellt.

Primer	Sequenz in 5' → 3'-Richtung
Cal-118-F	CTG AGG GCT TGG GGC CCA GG
Cal-118-R	ACT CGC ACC CAC TCC ACG CC
Cal-19-F	GGA GGC CGG CCA CCT GCA GA
Cal-19-R	TGT GGG ACA CGG CTC CTC GC
Cal-38-F	TGG GCT GGA ACG CCT GTG CC
Cal-38-R	GCC CAC AGC GCC CAC AGC AC
Cal-48-F	AGA GGG CCA AGG GCA TCC GA
Cal-48-R	TGG CTG TGT GCT CCT GGC CC
ARMS:	
Cal-63-F	GGG CCT GAC GGG GGT GGA TC
Cal-63var-F	GGG CCT GAC GGG GGT GGA TT
Cal-63-R	GGG CGC AGC ACT CCC AGC TC
Cal-43c-F	AAA GCA GGG TTG GAG CTT G
Cal-43d-R	GCT TAG CCT CAC CTT CAA CC
Cal-43dvar-R	GCT TAG CCT CAC CTT CAA CT
Mikrosatelliten-Typisierung	
D2S125-F	GCA ACA GAG TGA GAC CCT GA (modifiziert mit IRD 700)
D2S125-R	TTC TGA GAA CCA GAT TGT GAT TG
D2S2338-F	TCA AGA CCA GCC TGG G (modifiziert mit IRD 700)
D2S2338-R	TTT GAG TGC TCA GTG TGC

Tabelle 2.10: Verwendete Primer und ihre Sequenzen in 5' → 3'- Richtung

2.4.1.3 dNTP´S UND *TAQ*-POLYMERASE

Die Stocklösung der dNTP´s (Nukleotidmix für die DNA-Synthese) hatte eine Konzentration von 20mM. Die *Taq*-Polymerase von Sigma ARK hatte eine Konzentration von 5 units/µl und die von MWG eine Konzentration von 4 units/µl.

2.4.2 PCR-OPTIMIERUNG

Tabelle 2.11 zeigt, von welchem Standard-Rezept bei der PCR-Optimierung ausgegangen wird. Die Reagenzien werden auf Eis mit einer Test-DNA zusammenpipettiert. Die *Taq*-Polymerase wird als letztes hinzugegeben.

Reagenz	Menge in µl pro 25-µl-Ansatz	Konzentration [im 25-µl Ansatz]
DNA	2,50	2,5 ng/µl
aqua injectabile	17,55	
10 x PCR-Puffer	2,50	10 %
$MgCl_2$	1,50	1,5 pmol/µl
Forward-Primer	0,25	je nach Primer
Reverse-Primer	0,25	je nach Primer
dNTP	0,25	0,02 pmol/µl
Taq-Polymerase	0,20	0,04 units/µl (Sigma ARK) 0,032 units/µl (MWG)

Tabelle 2.11: Ausgangs-Rezept für die PCR-Optimierung

Die PCR wird in einem Thermozykler (s. Tabelle 2.6) nach oben genannter Zyklusfolge automatisiert durchgeführt. Ergibt die PCR bei oben genannten Bedingungen kein zufrieden stellendes Ergebnis, so können die in Tabelle 2.12 genannten Zusatzreagenzien in der angegebenen Konzentration eingesetzt werden.

Reagenz	Menge pro 25-µl-Ansatz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
Formamid	1,25 µl	100 %	5 %
DMSO	1,25 µl	100 %	5 %
Glycerol	3,75 µl	100 %	15 %
$(NH_4)_2SO_4$	1,00 µl	375 mM	15 mM
BSA	1,50 µl	20 mg/ml	1,28 mg/ml

Tabelle 2.12: Zusatzreagenzien für die PCR-Optimierung

Die Menge an zusätzlich zugefügten Stoffen muss am Aqua ad injectabile eingespart werden. Des Weiteren können sowohl die Zyklenanzahl als auch die Annealing-Temperaur verändert werden, um eine Verbesserung der PCR-Ergebnisse zu erzielen. Dazu nähert man die Anlagerungstemperatur der Schmelztemperatur der Primer von unten her so lange an, bis man ein spezifisches PCR-Produkt erhält.

2.4.3 DURCHFÜHRUNG

Die Reagenzien werden unabhängig vom jeweiligen Primer auf Eis zusammenpipettiert.

2.4.3.1 TRENNUNG VON VOR- UND NACH-PCR-BEREICH

Die PCR ist eine sehr sensitive Methode, die deshalb für Verunreinigungen (genomische DNA und PCR-Produkte) sehr anfällig ist. Aus diesem Grund trennt man räumlich:

Vor-PCR-Bereich: Dort wird die DNA extrahiert und die PCR vorbereitet. Zur Vermeidung von Verunreinigungen werden die Reagenzien aliquotiert und als Qualitätskontrolle läuft bei jeder PCR-Reaktion eine Wasserprobe als Negativprobe mit.

Nach-PCR-Bereich: In diesem Raum stehen die Thermozykler für die eigentliche PCR-Reaktion, ein Wasserbad für die Restriktion und die Gel-Elektrophorese-Kammern. In jedem Bereich gibt es eigene Materialien und Geräte, die nicht ausgetauscht werden dürfen.

2.4.3.2 PCR MIT DEN PRIMERN CAL-118-F UND CAL-118-R

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.13 werden die Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt, die für die PCR mit den Primern Cal-118-F und Cal-118-R benötigt werden. Hierfür wurden die Reagenzien bei Sigma bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	15,65	1721,5
10 x PCR-Puffer	2,50	275,0
$MgCl_2$	3,50	385,0
Primer Cal-118-F	0,20	22,0
Primer Cal-118-R	0,20	22,0
dNTP	0,25	27,5
Taq	0,20	22,0

Tabelle 2.13: Stoffkonzentration für den Cal-118-F/R Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	30 sec	69° C
	30 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.14: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-118-F/R

2.4.3.3 PCR MIT DEN PRIMERN CAL-43C-F, CAL-43D-R UND CAL-43DVAR-R (ARMS)

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

Für die PCR mit den Primern Cal-43C-F und Cal-43D-R wurden die gleichen Mengen benötigt wie mit Cal-43C-F und Cal-43Dvar-R. In Tabelle 2.15 werden die verwendeten Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt. Hierfür wurden die Reagenzien bei Sigma bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	17,65	1765,0
10 x PCR-Puffer	2,50	250,0
$MgCl_2$	1,50	150,0
Primer Cal-43c-F	0,20	20,0
Primer Cal-43d-R / Primer Cal-43dvar-R	0,30	30,0
DNTP	0,25	25,0
Taq	0,10	10,0

Tabelle 2.15: Stoffkonzentration für den Cal-43C-F/Cal-43D-R- bzw. Cal-43C-F/Cal-43Dvar-R-Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	30 sec	56° C
	30 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.16: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-43c-F/Cal-43d-R

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	30 sec	58° C
	30 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.17: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-43c-F/Cal-43dvar-R

2.4.3.4 PCR MIT DEN PRIMERN CAL-19-F UND CAL-19-R

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.18 werden die Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt, die für die PCR mit den Primern Cal-19-F und Cal-19-R benötigt werden. Hierfür wurden die Reagenzien bei Sigma bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	17,65	1941,5
10 x PCR-Puffer	2,50	275,0
$MgCl_2$	1,50	165,0
Primer Cal-19-F	0,25	27,5
Primer Cal-19-R	0,25	27,5
dNTP	0,25	27,5
Taq	0,10	11,0

Tabelle 2.18: Stoffkonzentration für den Cal-19-F/R Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

		Dauer	Temperatur
1 Zyklus		5 min	94° C
30 Zyklen		30 sec	94° C
		30 sec	69° C
		30 sec	72° C
1 Zyklus		5 min	72° C
		∞	4° C

Tabelle 2.19: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-19-F/R

2.4.3.5 PCR MIT DEN PRIMERN CAL-48-F UND CAL-48-R

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.20 werden die Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt, die für die PCR mit den Primern Cal-48-F und Cal-48-R benötigt werden. Hierfür wurden die Reagenzien bei MWG bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	17,55	1755,0
10 x PCR-Puffer	2,50	250,0
$MgCl_2$	1,50	150,0
Primer Cal-48-F	0,25	25,0
Primer Cal-48-R	0,25	25,0
DNTP	0,25	25,0
Taq	0,20	20,0

Tabelle 2.20: Stoffkonzentration für den Cal-48-F/R Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	50 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.21: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-48-F/R

2.4.3.6 PCR MIT DEN PRIMERN CAL-63-F, CAL-63VAR-F UND CAL-63-R (ARMS)

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.22 werden die Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt, die für die PCR mit den Primern Cal-63-F und Cal-63-R benötigt werden. Hierfür wurden die Reagenzien bei Sigma bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	15,60	1560,0
10 x PCR-Puffer	2,50	250,0
$MgCl_2$	3,50	350,0
Primer Cal-63-F	0,25	25,0
Primer Cal-63-R	0,25	25,0
dNTP	0,25	25,0
Taq	0,15	15,0

Tabelle 2.22: Stoffkonzentration für den Cal-63-F/R Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	30 sec	70° C
	30 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.23: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-63-F/R

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.24 werden die Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt, die für die PCR mit den Primern Cal-63var-F und Cal-63-R benötigt werden. Hierfür wurden die Reagenzien bei Sigma bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	16,60	1660,0
10 x PCR-Puffer	2,50	250,0
$MgCl_2$	2,50	250,0
Primer Cal-63var-F	0,25	25,0
Primer Cal-63-R	0,25	25,0
dNTP	0,25	25,0
Taq	0,15	15,0

Tabelle 2.24: Stoffkonzentration für den Cal-63var-F/Cal-63-R Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	30 sec	66° C
	30 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.25: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-63var-F/Cal-63-R

2.4.3.7 PCR MIT DEN PRIMERN CAL-38-F UND CAL-38-R

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

In Tabelle 2.26 werden die Reagenzien und Endkonzentrationen aufgeführt, die für die PCR mit den Primern Cal-38-F und Cal-38-R benötigt werden. Hierfür wurden die Reagenzien bei MWG bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,50	
Aqua ad injectabile	15,55	1710,5
10 x PCR-Puffer	2,50	275,0
$MgCl_2$	3,50	385,0
Primer Cal-38-F	0,25	27,5
Primer Cal-38-R	0,25	27,5
dNTP	0,25	27,5
Taq	0,20	22,0

Tabelle 2.26: Stoffkonzentration für den Cal-38-F/R Reaktionsmix

AMPLIFIKATIONSBEDINGUNGEN

	Dauer	Temperatur
1 Zyklus	5 min	94° C
30 Zyklen	30 sec	94° C
	30 sec	69° C
	30 sec	72° C
1 Zyklus	5 min	72° C
	∞	4° C

Tabelle 2.27: Amplifikationsbedingungen für das Primerpaar Cal-38-F/R

2.4.3.8 PCR MIT DEN PRIMERN D2S125-F UND D2S125-R SOWIE D2S2338-F UND D2S2338-R

Diese PCR diente dazu, DNA-Fragmente zur Typisierung von Mikrosatellitenmarkern herzustellen. Die für diese PCR verwendeten Reagenzien und Lösungen sowie die Amplifikationsbedingungen werden daher in Kapitel 2.7 - Typisierung multiallelischer Mikrosatellitenmarker ab Seite 45 aufgeführt.

2.5 PCR - RESTRIKTIONS-FRAGMENTLÄNGEN-POLYMORPHISMUS (RFLP)

Dringt artfremde DNA in Bakterien ein, so wird sie bald nach dem Eindringen von Restriktionsendonukleasen zerstört. Diese Enzyme erkennen eine spezifische DNA-Sequenz. Es gibt mehrere hundert solcher Restriktionsenzyme. Man kann sie sich bei der Detektion von Punktmutationen zunutze machen, da Punktmutationen eine Schnittstelle produzieren oder eine zerstören können (RFLP - restriction fragment length polymorphism). Um eine passende Restriktionsendonuklease zu finden, müssen die flankierende Sequenz um die Mutation und der Basenaustausch an der Stelle der Punktmutation bekannt sein. Mit dem im Internet frei zugänglichen Programm "Webcutter 2.0" (copyright 1997 Max Heiman; http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html) kann man eine Liste der Enzyme erhalten, die die Punktmutation in den durch die Oligonukleotide eingerahmten DNA-Abschnitten erkennen können, indem sie z.B. im Fall des Wildtyps schneiden und im Fall der Mutation nicht oder umgekehrt. Man muss sicherstellen, dass die Restriktionsendonuklease nur an dieser Stelle schneidet, d.h. nur einmal im untersuchten DNA-Abschnitt. Kann die Restriktionsendonuklease die DNA schneiden, so erhält man zwei Fragmente, die sich in einer Agarose-Gel-Elektrophorese der Länge nach auftrennen lassen. Das Ergebnis wird mit einer Probe bekannten Genotyps verglichen.

2.5.1 REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

2.5.1.1 ENDONUKLEASEN

Nachfolgend gibt Tabelle 2.28 allgemeine Informationen über die in dieser Untersuchung verwendeten Endonukleasen.

Endonuklease	*Bsp*TI	*Sda*I	*Bse*LI
Spezies	Bacillus species	Streptomyces distaticus	Bacillus stearothermophilus
Erkennungssequenz	5' ...C↓TTAAG...3' 3'...GAATT↑C...5'	5'...CCTGCA↓GG...3' 3'...GG↑ACGTCC…5'	5'…CCNNNNN↓NNGG…3' 3'...GGNN↑NNNNNCC...5'
Konzentration	10 U/µl	5 U/µl	10 U/µl

Tabelle 2.28: Angabe der verwendeten Enzyme, der Mikroorganismen, aus denen sie gewonnen wurden, sowie ihrer Erkennungssequenz und ihrer Konzentration
[Herstellerangaben; ↓,↑ = Schnittstellen; N = A,T,G oder C]

2.5.1.2 PUFFER FÜR DIE RESTRIKTION

Die Endonukleasen arbeiten bei spezifischen Ionenkonzentrationen und pH-Werten am zuverlässigsten. Um diese Verhältnisse zu schaffen, müssen Puffer eingesetzt werden. Diese Lösungen wurden von dem jeweiligen Hersteller zusammen mit den Enzymen bezogen und hatten die in Tabelle 2.29 angegebene Zusammensetzung.

Puffer	Hersteller	Zusammensetzung
0^+	MBI Fermentas	50 mM Tris-HCl (ph 7,5) 10mM $MgCl_2$ 100mM NaCl 0,1mg/ml BSA
$SdaI^+$	MBI Fermentas	37 mM Tris-acetat (pH 7,0) 15 mM $MgCl_2$ 150 mM KCl 0,1mg/ml BSA
Y^+/Tango	MBI Fermentas	33mM Tris-acetat (pH 7,9) 10mM $MgCl_2$, 66mM KCl 0,1mg/ml BSA

Tabelle 2.29: Bei der RFLP benutzte Puffer, ihre Bezugsquellen und ihre Zusammensetzung

2.5.2 DURCHFÜHRUNG

Ein Restriktionsverdau wurde bei folgenden Polymorphismen angewendet: SNP-118, SNP-38 und SNP-48.

Tabelle 2.30 gibt die für die Restriktion verwendeten Enzyme, die zugehörigen Puffer, die Reaktionsbedingungen sowie die Fragmentlängen der PCR-Produkte und der DNA-Abschnitte nach Restriktionsverdau wieder. Bei allen fand der Verdau über Nacht statt, d.h. die Enzyme wirkten 16-20 Stunden auf die DNA ein.

Poly-morphismus	Enzym	Puffer	PCR-Produktlänge	Fragmentlänge nach RFLP			Basenaustausch
				WT/WT	WT/VAR	VAR/VAR	Wildtyp/Variation
SNP-118	*Bsp*TI	O^+	321 bp	194 bp	194 bp/127 bp	127 bp	C/**G**
SNP-38	*Bse*LI	Y^+/Tango	228 bp	158 bp	158 bp/70 bp	70 bp	A/**C**
SNP-48	*Sda*I	$SdaI^+$	505bp	208 bp	208 bp/297 bp	297 bp	G/**A**

Tabelle 2.30: Für Restriktionsverdau benutzte Enzyme und zugehörige Puffer
Angegeben sind auch die Längen der Fragmente nach PCR und nach Restriktionsverdau (RFLP). In Fettdruck, die Variante, die geschnitten wird. (WT=Wildtyp, VAR=Variation)

Tabelle 2.31 zeigt die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsverdaue auf.

	SNP-118		SNP-38		SNP-48	
PCR-Produkt vorgelegt	15 µl		15 µl		15 µl	
	für 1 Probe	für 96 Proben	für 1 Probe	für 96 Proben	für 1 Probe	für 96 Proben
Enzym	0,2	22,0	0,2	22,0	0,4	44,0
Puffer	3,0	330,0	3,0	330,0	3,0	330,0
Aq. Bidest.	11,8	1298,0	11,8	1298,0	11,6	1276,0
Temperatur	37° C		55° C		37° C	

Tabelle 2.31: Reaktionsbedingungen für die Restriktionsverdaue

2.6 ALLELSPEZIFISCHE AMPLIFIKATION (ARMS)

Punktmutationen, die keine Restriktionsschnittstelle erzeugen oder zerstören, können über die allelspezifische Polymerase-Kettenreaktion ('*amplification refractory mutation system*'; ARMS-Test; Newton *et al.;* 1989) nachgewiesen werden. Der Test besteht aus zwei getrennten PCR-Ansätzen, in denen ein Primer identisch ist. Der zweite Oligonukleotidprimer variiert an der letzten Base am 3'-Ende, die entweder komplementär zur veränderten oder komplementär zur normalen Sequenz ist.

In den jeweiligen PCR-Ansatz wird eine der Versionen des zweiten Primers gegeben. Da eine terminale Fehlpaarung eine Amplifikation nicht völlig ausschließt, wird deshalb auch die vorletzte Base 3'-Ende des Primers nach der folgenden Tabelle 3-1 verändert [Kwok *et al.;* 1990].

Tabelle 2.32 gibt an, wie die ARMS-Primer erstellt werden müssen, um Fehlpaarungen zu vermeiden.

	Nukleotid des kodierende Stranges korrespondierend zum vorletzten Nukleotid am 3'-Ende des Primers			
Terminale Fehlpaarung	A	G	C	T
AA	A	G	A	G
AG	C	T	A	G
AC	G	A	C	T
TT	C	T	A	G
TG	G	A	T	C oder T
TC	C	T	A	G
CC	C	T	A	G
GG	A	G	A	G

Tabelle 2.32: Design der ARMS-Primer zur Vermeidung von Fehlamplifikationen.
Die linke Spalte listet die terminalen Fehlpaarungen am 3'-Ende auf, z.B. eine Mutation in dem kodierenden Strang mit der normalen Base im nicht kodierenden Strang [Kwok *et al.;* 1990].

Durch die allelunabhängige Amplifikation eines Kontrollfragments in dem gleichen Reaktionsansatz wird sichergestellt, dass ein nicht vorhandenes ARMS-Produkt auf die Abwesenheit eines bestimmten Genotyps schließen lässt. Deshalb wurde dem Ansatz entweder ein dritter Primer, der das ARMS-Produkt beinhaltet, oder ein Primerpaar, mit dem sich nicht verwandte Sequenzen amplifizieren lassen, hinzugefügt. Als Testkontrolle wurde DNA bekannten Genotyps verwendet. Trotzdem wurde als Qualitätssicherung von einigen Proben der Genotyp durch eine Sequenzierung bestätigt. Hierzu wurden die Proben an ein auf Sequenzierungen spezialisiertes Labor eingeschickt (Fa. SeqLab GmbH, Göttingen).

2.7 TYPISIERUNG MULTIALLELISCHER MIKROSATELLITENMARKER

Zur Berechnung der Haplotypen wurden im Rahmen dieser Arbeit die zwei Mikrosatellitenmarker D2S125 und D2S2338 bestimmt. Sie sind auf Chromosom 2 flankierend zu der Region des Calpain-10-Gens angeordnet. Von etwa einer Hälfte des gesamten Probandenkollektivs wurden die Marker im Mikrosatellitenzentrum in Berlin (Molekulare Genetik und Mikrosatellitenzentrum, Max-Delbrück-Centrum, Berlin) typisiert, der Rest wurde im Labor der Klinischen Forschergruppe bestimmt. Zur Anwendung kam hier der semi-automatische Sequenzierer *Li-Cor* (Fa. MWG Biotech), der es ermöglicht, mit einem Fluorenszensfarbstoff markierte DNA-Abschnitte der Länge nach aufzutrennen. Schon Unterschiede von einem Basenpaar können erkannt werden. Die Modifikation wird durch Markierung der Primer durch den Farbstoff IRD erreicht. Die Markierung muss auf die jeweilige Wellenlänge des benutzten Lasers abgestimmt sein. Da das hier verwendete Gerät bei Wellenlängen von 700 und 800 nm gleichzeitig messen kann, ist es möglich zwei gleich lange DNA-Fragmente gleichzeitig zu untersuchen. Da die hier untersuchten DNA-Abschnitte aber einen genügend großen Längenunterschied aufwiesen (D2S125: 88-100 bp und D2S2338: 163-169 bp), reichte es aus, die verschiedenen Mikrosatellitenmarker mit dem gleichen Farbstoff (IRD 700) zu modifizieren. Die Modifikation findet am Vorwärts-Primer statt, der schon mit dem Farbstoff bestellt wird und somit bei der PCR in jeden DNA-Abschnitt mit eingebaut wird. Für das Primer-Design und die genomischen Sequenzen der Zielregionen wurde auf die Datenbankeinträge des National Institute of Health (http://www.ncbi.nlm.nih.gov; Zugriffsnummern Z16591 und Z51342) zurückgegriffen, die auf Veröffentlichungen von Gyapay et al., 1994 (D2S125) bzw. Dib et al., 1996 (D2S2338) zurückgehen.

2.7.1 REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

Tabelle 2.33 gibt die Reagenzien in der eingesetzten Menge an, die für die Herstellung der Gele zur Typisierung der Mikrosatelliten im Li-Cor benötigt wurden.

Reagenz	Eingesetzte Menge für ein Gel
Long Ranger 50%	4 ml
Urea	10,5 g
10 x TBE	2,5 ml
HPLC-Wasser	zu 25 ml
APS (10 %)	175 µl
TEMED	25 µl
Laufpuffer	1 x TBE

Tabelle 2.33: Verwendete Reagenzien mit den eingesetzten Mengen für die Gele zur Mikrosatelliten-Typisierung

2.7.2 OPTIMIERUNG

Das Ziel der Optimierung ist es, klare Banden zu erhalten, die weit genug aufgetrennt sind und eindeutig ausgewertet werden können. Hierzu kann man die Mengen der Bestandteile der PCR (DNA, Puffer, $MgCl_2$, Primer, dNTP, *Taq*) und die Amplifikationsbedingungen (Zyklenanzahl und -dauer, Temperaturen) variieren. Zusätzlich können die Laufbedingungen im Sequencer (angelegte Spannung, Temperatur und Gelbedingungen) verändert werden.

2.7.3 DURCHFÜHRUNG

Zuerst wurden von den Proben PCRs angefertigt, um die zu untersuchenden DNA-Fragmente zu erhalten. Nachfolgend werden in Tabelle 2.34 und Tabelle 2.35 die Reagenzien angegeben, die für die PCR mit den Primern D2S125-F und D2S125-R bzw. D2S2338-F und D2S2338-R verwendet wurden. Puffer und *Taq*-Polymerase wurden bei Sigma bezogen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,00	
Aqua ad injectabile	15,40	1694,0
10 x PCR-Puffer	2,50	275,0
$MgCl_2$	3,50	385,0
Primer D2S125-F	0,35	38,5
Primer D2S125-R	0,70	77,0
dNTP	0,25	27,5
Taq	0,30	33,0

Tabelle 2.34: Stoffkonzentrationen für den D2S125-F/D2S125-R-Reaktionsmix zur Herstellung der DNA-Fragmente, die mittels des Li-Cor typisiert werden sollen.

Reagenz	pro Cup (25µl-Ansatz) [µl]	pro Mikrotiterplatte (96 Cups) [µl]
DNA (aus der Mikrotiterplatte vorlegen)	2,00	
Aqua ad injectabile	18,10	1991,0
10 x PCR-Puffer	2,50	275,0
$MgCl_2$	1,00	110,0
Primer D2S2338-F	0,30	33,0
Primer D2S2338-R	0,60	66,0
dNTP	0,25	27,5
Taq	0,75	82,5

Tabelle 2.35: Stoffkonzentrationen für den D2S2338-F/D2S2338-R-Reaktionsmix zur Herstellung der DNA-Fragmente, die mittels des Li-Cor typisiert werden sollen.

Nachfolgend geben Tabelle 2.36 und Tabelle 2.37 die Amplifikationsbedingungen für die PCR mit den Primern D2S125-F und D2S125-R bzw. D2S2338-F und D2S2338-R wieder.

		Dauer	Temperatur
1 Zyklus		5 min	94° C
25 Zyklen		30 sec	94° C
		40 sec	56° C
		30 sec	72° C
1 Zyklus		5 min	72° C
		∞	4° C

Tabelle 2.36: Amplifikationsbedingungen für die PCR mit den Primern D2S125-F und D2S125-R

		Dauer	Temperatur
1 Zyklus		5 min	94° C
25 Zyklen		30 sec	94° C
		40 sec	52° C
		30 sec	72° C
1 Zyklus		5 min	72° C
		∞	4° C

Tabelle 2.37: Amplifikationsbedingungen für die PCR mit den Primern D2S2338-F und D2S2338-R

Für diese Untersuchung wurden Polyacrylamid-Gele verwendet, die aus den in Tabelle 2.33 genannten Komponenten gegossen wurden. Vor dem Gießen werden die Glasplatten mit aqua bidest. und danach mit Isopropanol gereinigt und zusammengeschraubt. Zum Gießen wird zu dem Long Ranger, das eine Acrylamid-Mischung ist, der Harnstoff (Urea) und das 10 x TBE hinzugegeben und mit HPLC-Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Da vor allem der Harnstoff schwer löslich ist und sich die Stoffe beim Vermengen stark abkühlen, wird das Gemisch auf einem Schüttler bei hoher Geschwindigkeit geschüttelt, bis sich der Harnstoff aufgelöst hat. Danach gibt man APS und TEMED (unter dem Abzug!) dazu. Ab jetzt beginnt der Polymerisationsprozess, mittels einer 50-ml-Spritze mit Filteraufsatz wird das Gel gegossen.

Mit dem Filter wird verhindert, dass Teilchen wie nicht gelöster Harnstoff das Gel verunreinigen und damit die Abtastung durch den Laserstrahl behindern würden. Durch Beklopfen der Apparatur kann man die Gefahr, Blasen im Gel zu bilden, erniedrigen. Nach dem Gießen wird der Vorkamm gesteckt, der einen geraden Abschluss herstellt. Er wird nach dem Vorlauf durch den sog. Haifischkamm ersetzt. Nachdem das Gel nach etwa zwei Stunden ausgehärtet ist, kann der Vorlauf gestartet werden.

Bevor man die Glasplatten im Gerät verankert, vergewissert man sich, dass der Bereich des Glases, der im Laser-Strahlengang liegt, auf jeden Fall sauber ist, um eine einwandfreie Ablesung zu ermöglichen. Nachdem die Glasplatten in das Gerät eingebaut sind, werden die Pufferkammern mit dem 1 x TBE-Laufpuffer gefüllt. Der Vorlauf wird gestartet. Er dauert etwa eine halbe Stunde und dient der Durchtränkung des Gels mit Puffer und seiner Anwärmung. Bei dieser Untersuchung wurden sowohl Vorlauf als auch Hauptlauf bei einer Spannung von 1050 V und bei einer Temperatur von 50° C durchgeführt. Die Stromstärke betrug 35 mA. Nach Beendigung des Vorlaufs wird der Vorkamm durch den Haifischkamm ersetzt, damit sich die Probentaschen bilden. Die Ansatzstelle des Kamms wird gesäubert und mit Puffer gespült, um zu gewährleisten, dass die Taschen gut befüllt werden können. Der Kamm weist 48 Taschen auf.

Die Taschen werden jeweils mit einem Teil PCR-Produkt und einem Teil Loading Dye, einem Stopp- und Ladepuffer, gefüllt. Der Loading Dye enthält Formamid, das die Denaturierung stabilisiert und den Farbstoff Fuchsin-Rot. In dieser Untersuchung wurde 1 µl PCR-Produkt des Markers D2S125 und 1 µl PCR-Produkt des Markers D2S2338 mit 2 µl Loading Dye gemischt. Vor dem Beladen der Taschen werden die PCR-Produkte für 3 Minuten bei 94° C denaturiert. Ein Aufbewahren auf Eis ist danach nicht nötig. In die beiden äußeren Taschen und in eine an geeigneter Stelle in der Mitte (schön ist es, wenn die Proben einer Familie nicht getrennt werden müssen) wird ein Längenmarker gegeben. In dieser Untersuchung wurde ein eigens aus internen Kontroll-DNA-Proben hergestellter Längenmarker verwendet. Dazu wurde eine DNA-Probe mit geeignetem Bandenmuster, das die Längen der Mikrosatellitenmarker abdeckt, verwendet. Diese DNA-Probe wurde mit einem gekauften Längenstandard (123-bp-Marker, Gibco BRL) verglichen. Ein Gel kann nach einmaligem Vorlauf für 2 bis 3 Läufe verwendet werden.

Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Programm "DataCollection Model 4200 DEV 1" und die Bildbearbeitung mit dem Programm "Image Manipulation, Version 4.00". Beide Programme sind in dem Programm-Paket "Base Image IR, Version 4.1" von Li-Cor enthalten. Die Auswertung wurde mit dem Programm "OND-Dscan, Version 1.3" von Scanalytics durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf CD-Rom gespeichert.

2.8 GEL-ELEKTROPHORESE UND PHOTOGRAPHIE

Die DNA-Fragmente, die man durch PCR und den eventuell angeschlossenen Enzymverdau erhalten hat, werden in einem Agarose-Gel durch Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes der Länge nach aufgetrennt. Die DNA wandert auf die positiv geladene Anode zu, da die DNA-Moleküle bei neutralem pH-Wert durch die negative Ladung an der Posphatgruppe eines jeden Nukleotids insgesamt negativ geladen sind. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Fragmente im Gel bewegen, hängt von verschiedenen Faktoren ab:

- Die Größe der DNA-Fragmente spielt wohl die größte Rolle. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich mit einer Geschwindigkeit, die zum Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportional ist.

Weiter Einflussgrößen sind:

- die Konzentration der Agarose im Gel (hier 2,5 %),
- der verwendete Laufpuffer und
- die angelegte elektrische Spannung.

Die Gel-Matrix bietet beim Lauf einen gewissen Widerstand und verhindert eine zufällige Diffusion. Die Gele werden beim Gießen mit Ethidiumbromid versetzt, welches in die DNA-Doppelhelix interkaliert. Der entstandene DNA-Ethidiumbromid-Komplex kann später durch UV-Licht angeregt und als fluoreszierende Bande sichtbar gemacht werden.

2.8.1 REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

Diese Lösungen wurden nicht autoklaviert. Alle Chemikalien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst.

2.8.1.1 50 X TAE-PUFFER

Der 50 x TAE-Puffer wurde in 5-Liter-Ansätzen hergestellt. Tabelle 2.38 gibt die Zusammensetzung wieder.

Agens	Menge in 5 l
TrisHcl	1210 g
Eisessig	285,5 ml
EDTA 0,5 M; pH 8,0	500 ml

Tabelle 2.38: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers

2.8.1.2 1 X TAE-PUFFER

Der 1xTAE-Puffer ist Bestandteil des Agarose-Gels und dient als Laufpuffer. Der Puffer wurde in 10-Liter-Mengen aus dem 50 x TAE-Puffer hergestellt, indem 200 ml des 50xTAE-Puffers auf 10 l mit *aqua bidest.* aufgefüllt wurden. Tabelle 2.39 zeigt die daraus folgende Konzentration des 1xTAE-Puffers.

Agens	Konzentration
TrisHCl	0,04 M
Eisessig	2 %
EDTA pH 8,0	0,01 M

Tabelle 2.39: Zusammensetzung des 1xTAE-Puffers

2.8.1.3 AUFTRAGSPUFFER

Tabelle 2.40 gibt die Zusammensetzung des Auftragspuffers an.

Agens	Konzentration
Bromphenol blau	0,25 %
Xylen-Zyanol	0,25 %
Ficoll	15 %

Tabelle 2.40: Zusammensetzung des Auftragspuffers.

2.8.1.4 AGAROSE-GEL

Zur Trennung aller entstandenen DNA-Fragmente wurden Gele verwendet, bei denen der Anteil der Agarose 2,5 % betrug. Hierzu werden 6,25 g Agarose in 250 ml 1xTAE-Puffer unter sanftem Schütteln mehrmals aufgekocht (Achtung! Siedeverzug!) bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und möglichst wenige Luftblasen in dem Gemisch sind. Dann werden unter dem Abzug 20 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Danach gießt man alles in eine Kammer, vergisst nicht, sie mit Kämmen, die die Geltaschen formen, zu bestücken und lässt das Gel erstarren. Nach etwa einer halben Stunde entfernt man die Kämme. Danach können die entstandenen Geltaschen mit den Proben beladen werden.

2.8.1.5 AUFTRAGSPUFFER

Der Auftragspuffer dient dazu, die Proben zu beschweren und damit zu verhindern, dass sie aus den Geltaschen laufen. Zusätzlich hilft er bei der Abschätzung der Laufweite der DNA-Proben: Bromphenol blau läuft ungefähr 2,2-mal so schnell, Xylen-Zyanol blau etwa genauso schnell wie ein 200 bp-Fragment.

2.8.1.6 123-BP-MARKER

Die Stocklösung des Markers muss verdünnt werden: Ein Teil Stocklösung und ein Teil bestehend aus 75% destilliertem Wasser und 25% Auftragspuffer werden gemischt. Der Längenmarker dient zur Abschätzung der Länge der untersuchten DNA-Fragmente. Hier wurde ein 123-Basenpaar-Marker verwendet, der folgende Längen anzeigt: 123, 246, 369, 492, 615, 738...4182 bp.

2.8.2 DURCHFÜHRUNG

Das Agarose-Gel wird in eine Elektrophorese-Kammer (Owl-Scientific) gelegt. Die Kammer ist mit 1xTAE-Puffer so weit gefüllt, so dass das Gel gerade bedeckt ist. Zu den 25 µl des PCR- oder Enzymverdau-Produkts werden 5 µl Auftragspuffer gegeben. 10 µl dieses Gemischs werden in die Geltaschen pipettiert. Für die spätere Auswertung muss in jeder Taschenreihe mindestens eine Geltasche mit 1 µl 123-bp-Marker gefüllt werden. Die angelegte Spannung beträgt bei einer kleinen Elektrophoresekammer (Platz für bis zu 24 Proben) 120 V, bei einer großen Kammer (Platz für etwa 120 Proben) 200 V. Die Laufzeiten betrugen zwischen 20-60 Minuten.

Zur Auswertung werden die Gele mit UV-Licht durchleuchtet (Transilluminator UV-TM-25 von Hoefer Scientific Instruments), fotografiert und Bildausdrucke angefertigt. Zusätzlich können einzelne Bilder auf Diskette gespeichert werden (Digitales Videosystem von Polaroid).

Die Auswertungen der Genotypen erfolgten immer unabhängig voneinander durch zwei Personen. Unstimmigkeiten wurden durch Vergleich, durch Auswertung durch eine dritte Person oder durch nochmalige Genotypisierung gelöst. Fand sich keine eindeutige Lösung, wurde der Datensatz von den Berechnungen ausgeschlossen.

Zusätzlich wurden alle genotypisierten Marker mit den Programmen PEDCHECK, VERSION 1.1 [O'Connell und Weeks, 1998] und GENEHUNTER, Version 2.0b [Kruglyak et al., 1996] auf Unstimmigkeiten geprüft.

2.9 STATISTISCHE VERFAHREN

2.9.1 KOPPLUNG

Zur Untersuchung von chromosomalen Regionen auf die Vererbung von funktionsrelevanten DNA-Varianten und zur Einengung dieser Genabschnitte unterscheidet man zwei verschiedene Ansätze: Kopplung und Assoziation. Kopplung gibt die Beziehung entweder zwischen Genorten untereinander oder zwischen Genorten und Phänotypen an. Assoziation trifft eine Aussage über die Vererbung von Allelen an verschiedenen Genorten. Beide messen Abweichungen vom 3. Mendelschen Gesetz der unabhängigen Vererbung [Böddeker und Ziegler, 2000].

Von Kopplung spricht man, wenn zwei oder mehr Genorte bzw. Genorte und Phänotypen überzufällig häufig zusammen vererbt werden. Dabei spielt der Abstand zwischen den Genloci die entscheidende Rolle: Je kleiner der Abstand der Genloci auf dem Chromosom ist, desto unwahrscheinlich werden sie durch Rekombination voneinander getrennt. Für näher beieinander liegende Loci spiegelt die Rekombinationshäufigkeit die Entfernung wider. Dies wird in der relativen Längenangabe cM (centiMorgan) ausgedrückt. 1cM entspricht einer Rekombinationshäufigkeit von 1 %, d.h. alle 100 Meiosen tritt eine Rekombination auf. Alle Gene auf einem Chromosom bilden eine sogenannte Kopplungsgruppe. Liegen Genorte auf zwei unterschiedlichen Chromosomen beträgt der Höchstwert der beobachtbaren Rekombinationshäufigkeit 50 %, was einer voneinander unabhängigen Vererbung entspricht. Man spricht von Kopplung, wenn ein bestimmter Phänotyp und ein genetischer Marker überzufällig häufig kosegregieren. Kopplung wird vor allem bei der Entdeckung von chromosomalen Regionen mit funktionsrelevanten DNA-Varianten untersucht [Böddeker und Ziegler, 2000].

In dieser Untersuchung wurde eine modellfreie Kopplungsanalyse durchgeführt, die die MLB (maximum likelihood binominal)-Statistik benutzt. Diese Statistik ist in das Programm MLBGH, Version 1.0, eingebaut [Abel und Müller-Myhsok, 1998]. Ein multipoint LOD score μ 0,7 bei einem Signifikanzniveau von 5% wird als signifikanter Hinweis auf Kopplung gewertet [Lander und Kruglyak, 1995] (s. auch "Der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT)" in Kapitel 2.9.2.3).

2.9.2 ASSOZIATION

Assoziation liegt vor, wenn ein spezifisches Allel eines genetischen Markers in einer Population häufiger bei Erkrankten als bei Gesunden vorkommt. Man misst Assoziation zur Einengung chromosomaler Regionen oder zur Untersuchung von Kandidatengenen. Kopplung und Assoziation können auch gemeinsam vorkommen [Böddeker und Ziegler, 2000].

Assoziation kann verschiedene Gründe haben:

- Das Allel hat einen direkten Einfluss auf den Phänotyp.
- Liegen zwei Polymorphismen eng beieinander, so können sie gekoppelt sein. Dabei ist nur einer der beiden Polymorphismen von funktioneller Relevanz – der andere ist bloß zufällig mit dem ersten gekoppelt und hat selbst keinerlei Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps.
- Scheinassoziation: Menschen mit einem Phänotyp und Menschen ohne ihn stammen möglicherweise aus genetisch unterschiedlichen Untergruppen der Bevölkerung, die sich gleichzeitig auch in Bezug auf die Häufigkeit des A-Allels unterscheiden (Stratifikation).

Besonders der letzte Punkt bringt Probleme mit sich. Der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT; [Spielmann et al., 1993]; s. Kapitel 2.9.2.3) schafft Abhilfe [Strachan und Read, 1996].

Trotz der angesprochenen Probleme wurde auch der Assoziationsansatz beschritten, denn die Probandenrekrutierung für den TDT ist aufgrund seiner Konstitution – man benötigt neben dem Probanden auch seine leiblichen Eltern – sehr aufwendig. Daher sind hier die Fallzahlen geringer.

2.9.2.1 DER MODIFIZIERTE X^2-TEST

Grundlage des nach Schäfer modifizierten χ^2-Tests ist eine Vierfeldertafel (s. Tabelle 2.41) [Schäfer, 1995].

	Allel A	nicht Allel A	
Probanden	A	b	$a + b = n$
Kontrollen	C	d	$c + d = m$

Tabelle 2.41: Vierfeldertafel für den modifizierten χ^2-Test

$\hat{p}$: Schätzer der Frequenz des Allels auf Grund der Stichprobe

p : "wahrer" P-Wert aus der Grundgesamtheit

Schätzwert für p_1: $\hat{p}_1 = \frac{a}{a+b}$

Schätzwert für p_2: $\hat{p}_2 = \frac{c}{c+d}$

Schätzwert für die Varianz: $s^2 = \frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n} + \frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{m}$

Teststatistik: $T = \frac{\hat{p}_2 - \hat{p}_1}{s}$

2.9.2.2 DER EXAKTE TEST NACH FISHER

Neben dem modifizierten χ^2-Test wurde auch mit dem exakten Test nach Fisher gerechnet. Dessen Herleitung findet sich bei Rüger, 1996.

2.9.2.3 DER TRANSMISSIONS-DISEQUILIBRIUM-TEST (TDT)

Jedes Individuum besitzt einen diploiden Chromosomensatz (Ausnahmen sind die Geschlechtschromosomen bei Männern und numerische Aberrationen: z.B. Trisomie 21) und damit zwei Allele an jedem Genort.

Der TDT [Spielmann et al., 1993] ist ein kombinierter Test auf Kopplung und auf Assoziation. Bei Trios (Proband mit seinen Eltern) wird untersucht, welche Allele überzufällig häufig transmittiert werden und dann mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert sind. Für diesen Test sind nur heterozygote Eltern informativ, da bei Homozygotie nicht bestimmt werden kann, ob ein Allel überzufällig häufig weitergegeben wurde.

Die Eltern stellen eine interne Kontrollgruppe dar, weshalb sich hier keine Stratifikations-Probleme ähnlich denen der herkömmlichen Assoziationstests ergeben.

Der Test vergleicht also die Häufigkeit, mit der das Allel unter den weitergegebenen und unter den nicht weitergegebenen Allelen vorkommt:

> H0: Beide Allele werden gleich häufig weitergegeben (d.h. die Transmissionsrate beträgt 50%), der Polymorphismus hat keinen Einfluss auf den Phänotyp.
>
> H1: Wenn die Allelhäufigkeiten der vererbten Allele sich unterscheiden, kann ein Einfluss des Polymorphismus auf den Phänotyp nicht ausgeschlossen werden.

Das Transmissionsungleichgewicht wird mit Hilfe des McNemar-Tests überprüft (Vierfeldertafel in Tabelle 2.42).

		nicht transmittiert	
		wt	mt
transmittiert	wt	a	b
	mt	c	d

Tabelle 2.42: Vierfeldertafel für den TDT

wt – Wildtypallel

mt – Allel mit der Mutation

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

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

Neben den unbestreitbaren Vorteilen hat dieser Test auch einige Nachteile:

- Der Test kann Assoziationen, die durch ein Kopplungsungleichgewicht ausgelöst werden, nicht von solchen unterscheiden, bei denen der Marker selbst funktionelle Relevanz hat.
- Der Test ist aufwendiger als die üblichen Fall-Kontrollstudien, da für jeden Probanden zwei weitere Personen (statt einer weiteren) typisiert werden müssen.
- Bei einer geringen Frequenz (unter 10 %) eines Polymorphismus wird der Test erst bei großen Fallzahlen aussagekräftig.

2.9.2.4 DER PEDIGREE-DISEQUILIBRIUM-TEST (PDT)

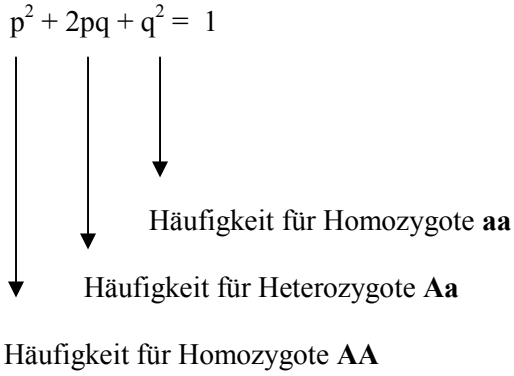
Tests, die ein Kopplungsungleichgewicht untersuchen, basieren typischerweise auf Familien, die aus dem Indexprobanden und den beiden Eltern oder dem nicht betroffenen Geschwister bestehen. Werden größere Familien oder Stammbäume untersucht, so sind die Ergebnisse bei der Untersuchung auf Assoziation meist nicht mehr valide. Wenn größere Familien zur Verfügung stehen, wäre es natürlich wünschenswert, auch diese in die Untersuchung mit einbeziehen zu können. Dazu eignet sich – auf der Grundlage des TDT – der einseitige, asymptotische PDT (pedigree disequilibrium test) [Martin et al., 2000]. Auch mit dem PDT können Kopplung und Assoziation gleichzeitig untersucht werden.

2.9.3 DIE BONFERRONI-KORREKTUR

Bei Assoziationsstudien besteht bei jedem Test ein eigenes Risiko für ein falsch positives Ergebnis. Um Fehler zu vermeiden, muss man eine Bonferroni-Korrektur durchführen [Sachs, 1974]. Der Grenzwert für die Signifikanz wird nicht wie üblich bei p=0,05 festgesetzt, sondern bei p=0,05/n, wobei n die Zahl der möglichen unabhängigen Assoziationen ist, die geprüft werden.

2.9.4 DAS HARDY-WEINBERG-DISEQUILIBRIUM

Die aus einer Population durch schwere Erkrankung bei Homozygoten „aa“ ausscheidenden Allele „a“ werden durch neue Mutationen ersetzt, so dass ein Gleichgewicht besteht. Die Allele eines Gens sind wie in Abbildung 2.1 verteilt [Passarge, 1994].



p, q : Häufigkeiten

A, a : Allele

Abbildung 2.1: Hardy-Weinberg-Disequilibrium

Diese Regel kann als Kontrolle verwendet werden, um auszuschließen, dass in einer Studie grobe systematische Fehler unterlaufen sind.

2.9.5 BILDUNG VON HAPLOTYPEN

Unter einem Haplotypen versteht man die Kombination von genetischen Informationen, die an mehreren Markern eines Chromosoms vorliegen. Man untersucht, ob eine von der Mutter bzw. vom Vater vererbte Allelkombination der betrachteten Marker mit einem Phänotyp (der Krankheit) assoziiert ist. Die Assoziation kann stärker sein als für einen einzelnen Marker. Dadurch können bei der Analyse genetischer Daten Zusammenhänge oft besser aufgedeckt werden, als wenn man die Genotypen an Einzelmarkern alleine betrachtet. Deswegen wird die Analyse von Haplotypen heute in vielen Studien durchgeführt. Die Frage ist immer, welche Kombination von Allelen auf einem DNA-Strang vorliegt, und welche auf dem anderen und ob eine Kombination mit einem Phänotyp assoziiert ist oder nicht.

Haplotypen können auf folgende Weise bestimmt werden:

- Eine genaue Bestimmung ist immer durch die allelspezifische PCR möglich. Hier handelt es sich allerdings um ein sehr aufwendiges Verfahren.
- Bei der Bestimmung der Haplotypen bei einer einzelnen Person gilt: Liegt bei den untersuchten SNPs höchstens einer heterozygot vor, so ist die Bestimmung eindeutig möglich. Liegen mehr als ein SNP heterozygot vor, so kann die Kombination nicht mehr eindeutig ausgemacht werden.
- Liegen über die Information zu einer Einzelperson hinaus noch genetische Informationen aus der Familie vor, so können die Haplotypen trotz mehrfacher Heterozygotie zu einem größeren Teil bestimmt werden, da die Zahl der möglichen Kombinationen durch die Vorgaben der Eltern schon etwas eingeschränkt ist.
- Haplotypen können mit statistischen Verfahren geschätzt werden. Hierbei wird aber abhängig vom Verfahren immer ein bestimmter Teil der Haplotypen falsch festgelegt.

Verschiedene Verfahren zur Schätzung der Haplotypen wurden und werden entwickelt, wobei versucht wird, die Zahl der falsch bestimmten Haplotypen möglichst gering zu halten. In dieser Arbeit wurde der Lander-Green-Algorithmus verwendet, der in das Programm GENEHUNTER, Version2.0b eingearbeitet ist [Kruglyak et al., 1996]. Hierbei werden die für die Kinder erwarteten Diplotypen aus denen der Eltern errechnet und mit der tatsächlich beobachteten Anzahl mittels eines einseitigen exakten Tests verglichen. So ist es z.B. dafür, dass ein Kind den Diplotyp 112-121 aufweisen kann, Voraussetzung, dass ein Elternteil den Haplotypen 112 aufweist und der andere Elternteil den Haplotyp 121. Abhängig von den Genotypen der Eltern, wird der untersuchte Diplotyp mit einer Wahrscheinlichkeit von p=0,25, p=0,5 oder p=1 geerbt.

2.10 ANMERKUNG

Der praktische Teil dieser Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2000 bis Juni 2001 an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg. Zusammen mit zwei medizinischen Doktorandinnen (Anne Hoch und Constanze Vogel) habe ich den Einfluss von Polymorphismen in Kandidatengenen in Hinblick auf Übergewicht untersucht. Dabei galt mein besonderes Augenmerk dem Calpain-10-Gen und seinen Polymorphismen. Die Probanden wurden von ärztlichen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe "Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation" rekrutiert. Ein Teil der DNA der Probanden wurde von mir extrahiert.

Prof. Dr. Ziegler sowie Herr Frank Geller und Herr Tilman Görg vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg unterstützten mich mit ihrem mathematisch-statistischen Fachwissen bei der Erstellung der in dieser Arbeit aufgeführten Statistiken. Die für die vorliegende Untersuchung notwendigen PCRs, Restriktionen, Typisierungen und Gelelektrophoresen sind von mir selbständig nach entsprechender Einarbeitung durchgeführt worden. Ich habe mir die zur Erstellung dieser Promotionsarbeit erforderlichen wissenschaftlichen Grundkenntnisse in Molekulargenetik, Klinik und Biomathematik angeeignet. Für den theoretischen Teil dieser Arbeit habe ich in der Literaturübersicht die Gewichtsregulation, Adipositas und die Verknüpfung mit Calpain-10 betrachtet.

3 ERGEBNISSE

Im Folgenden werden nacheinander die Ergebnisse der Untersuchung der 6 Polymorphismen (Allel- und Genotypfrequenzen) beschrieben. Daran schließen sich die Ergebnisse der Kopplungsanalyse an, gefolgt vom PDT, sowie der Haplotyp- und Diplotypberechnungen der Polymorphismen SNP-43, -19 und -63. Zum Schluss werden die Ergebnisse der TDTs für die beiden flankierenden Mikrosatellitenmarker (D2S125 und D2S2338) aufgeführt.

3.1 AUSWERTUNG DER UNTERSUCHTEN POLYMORPHISMEN

Auswertung der Agarose-Gel-Elektrophorese. Die PCR und der Restriktionsverdau wurden mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese ausgewertet. In den Gelen, die 2,5 % Agarose enthielten und die mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, leuchten die Banden der geschnittenen und ungeschnittenen Fragmente sowie des 123-bp-Markers unter UV-Licht auf. Aus dem Bandenmuster kann man so die Genotypen der Probanden bestimmen.

SNP-118: An der Position -10732 relativ zum Beginn des Calpain-10-Gens, zwischen Exon 8 und Exon 9 des Gens *RNPEPL1*, wird Cytosin gegen Guanin ausgetauscht.

Abbildung 3.1 zeigt die Banden der geschnittenen (194 bp und 127 bp, entspricht dem G-Allel) und ungeschnittenen (321 bp, C-Allel) PCR-Produkte. Die PCR wurde mit den Primern Cal-118-F und Cal-118-R angefertigt. Die PCR-Produkte wurden mit dem Enzym *Bsp*TI verdaut.

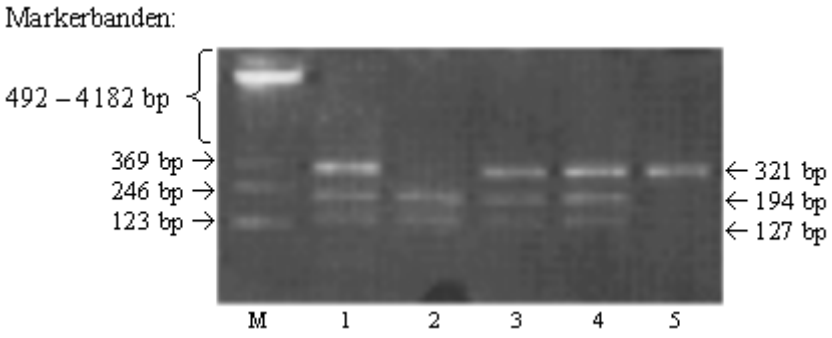


Abbildung 3.1: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-118-Polymorphismus im Calpain-10-Gen
M=123-bp-Marker, 1=Proband: heterozygot (C/G), 2=Mutter: homozygot geschnitten (G/G), 3=Vater: heterozygot (C/G), 4=Geschwister: heterozygot (C/G), 5=Proband (aus anderer Familie): homozygot ungeschnitten (C/C).

SNP-43: An Position 4852 des Calpain-10-Gens wird Guanin gegen Adenosin ausgetauscht. Da diese Region in Intron 3 liegt, hat der Austausch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz.

Um die Genotypen der Probanden zu ermitteln, wurden PCRs mit ARMS-Primern (Cal-43c-F, Cal-43-d-R und Cal-43-dvarR) durchgeführt. In Abbildung 3.2 ist ein Gel abgebildet, das das Ergebnis einer PCR mit dem nicht-variierten Primerpaar (Cal-43c-F und Cal-43-d-F) zeigt und mit dem das G-Allel nachgewiesen wurde. Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis der PCR mit den gleichen Proben wie in Abbildung 3.2, allerdings mit dem variierten Primerpaar (Cal-43c-F und Cal-43-dvarR). Diese PCR weist das A-Allel nach. Die Banden stammen von dem 170-bp-DNA-Fragment, das in der PCR vervielfältigt wurde, sowie von dem 123-bp- Marker.

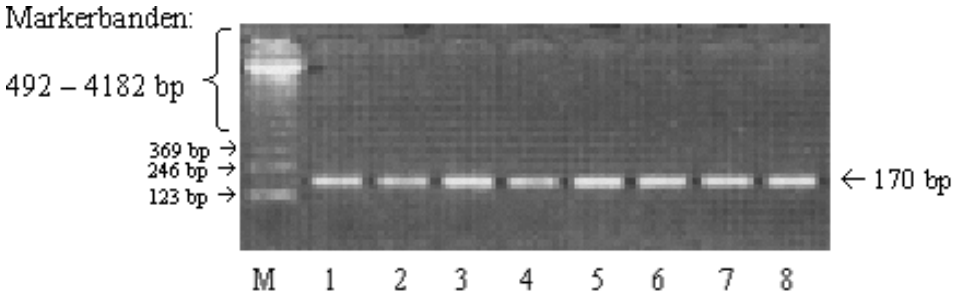


Abbildung 3.2: Gel-Elektrophorese des SNP-43-Polymorphismus in *CAPN10* mit nicht-variiertem Primerpaar zum Nachweis des G-Allels
M-123-bp-Marker, 1-Proband Familie A, 2-Mutter Familie A, 3-Vater Familie A, 4-Geschwister Familie A, 5-Proband Familie B, 6-Mutter Familie B, 7-Vater Familie B, 8-Geschwister Familie B. Bei allen kommt das G-Allel vor.

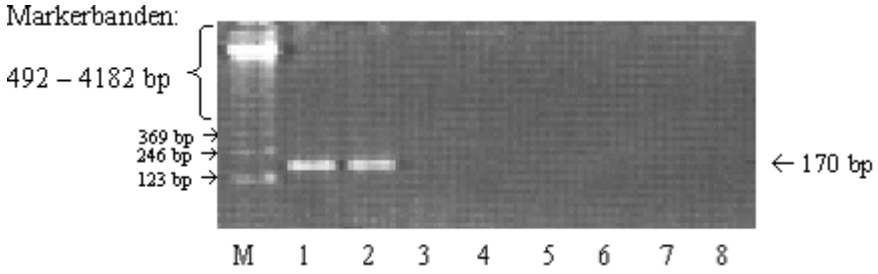


Abbildung 3.3: Gel-Elektrophorese des SNP-43 in *CAPN10* mit variiertem Primerpaar zum Nachweis des A-Allels
M-123-bp-Marker, 1-Proband Familie A, 2-Mutter Familie A, 3-Vater Familie A, 4-Geschwister Familie A, 5-Proband Familie B, 6-Mutter Familie B, 7-Vater Familie B, 8-Geschwister Familie B. Bei 1 und 2 ist das A-Allel vorhanden, bei 3-8 dagegen nicht.

Der Genotyp eines Probanden kann nur mit beiden PCRs bestimmt werden. So sind die Probanden 1 und 2 heterozygot (G/A), die Probanden 3-8 dagegen homozygot (G/G).

SNP-19 ist ein 32-bp-Repeat, der an Position 7920 des Calpain-10-Gens in Intron 6 liegt und entweder zwei oder drei Kopien einer 32 Basenpaar-Wiederholung aufweist.

Die PCR wurde mit den Primern Cal-19-F und Cal-19-R durchgeführt. Abbildung 3.4 zeigt die Banden, die vom 123-bp-Marker, sowie von den entstandenen Fragmenten von 321 bp Länge (2 Kopien des Repeats) und 353 bp Länge (3 Kopien des Repeats) stammen. Dieser Längenunterschied reicht für eine Auswertung bei der Agarose-Gel-Elektrophorese aus.

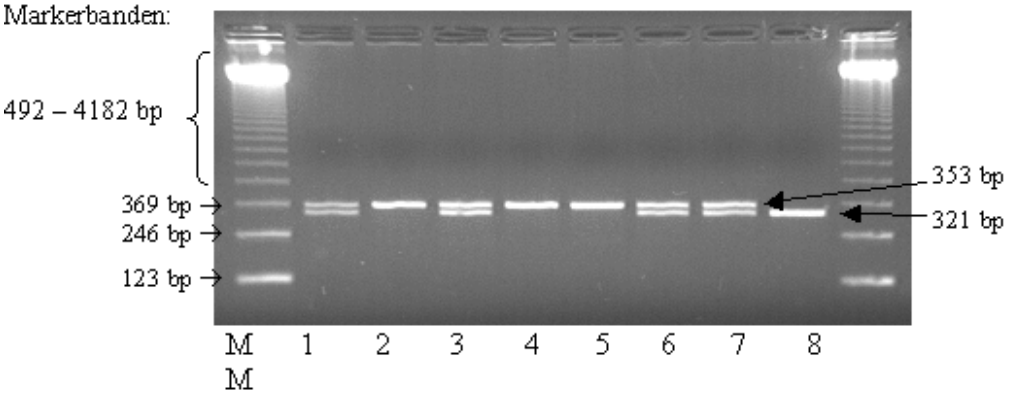


Abbildung 3.4: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-19 im Calpain-10-Gen
M-123-bp-Marker, 1-Proband Familie A: heterozygot (2/3), 2-Mutter Familie A: homozygot (3/3), 3-Vater Familie A: heterozygot (2/3), 4-Geschwister Familie A: homozygot (3/3), 5-Proband Familie B: homozygot (3/3), 6-Mutter Familie B: heterozygot (2/3), 7-Vater Familie B: heterozygot (2/3), 8-Geschwister Familie B: homozygot (2/2).

SNP-48: An Position 11098 im Calpain-10-Gen findet sich ein Austausch von Guanin zu Adenosin. Dieser Polymorphismus liegt in Exon 11, der Basenaustausch hat aber keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

Die PCR wurde mit den Primern Cal-48-F und Cal-48-R, der anschließende Verdau der PCR-Produkte wurde mit dem Enzym *Sda*I durchgeführt.

Abbildung 3.5 zeigt ein Gel, dessen Banden vom 123-bp-Marker und von ungeschnittenen (505 bp; entspricht dem G-Allel) und geschnittenen (297 bp und 208 bp; entspricht dem A-Allel) DNA-Abschnitten stammen.

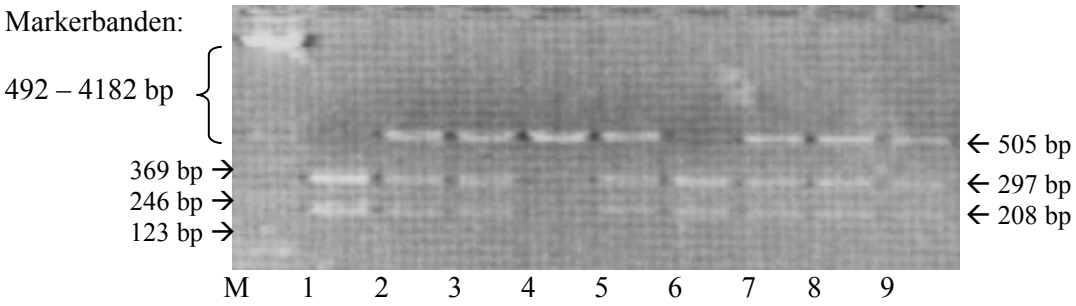


Abbildung 3.5: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-48 im Calpain-10-Gen
M-123-bp-Marker, 1-Proband Familie A: homozygot geschnitten (A/A), 2-Mutter Familie A: heterozygot (G/A), 3-Vater Familie A: heterozygot (G/A), 4-Geschwister Familie A: homozygot ungeschnitten (G/G), 5-Proband Familie B: heterozygot (G/A), 6-Mutter Familie B: homozygot geschnitten (A/A), 7-Vater Familie B: heterozygot (G/A), 8-Geschwister 1 Familie B: heterozygot (G/A), 9-Geschwister 2 Familie B: heterozygot (G/A).

SNP-63: An Position 16378 wird im Calpain-10-Gen Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Dieser Polymorphismus liegt in Intron 13; der Austausch hat damit keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz.

Die PCR wurde mit ARMS-Primern (Cal-63-F, Cal-63var-F und Cal-63-R) angefertigt. Die Banden stammen von dem 123-bp-Marker und den PCR-Produkten (187bp), die einmal das C-Allel und einmal das T-Allel nachweisen.

Abbildung 3.6 zeigt ein Gel einer PCR mit dem nicht-variierten Primerpaar (Cal-63-F und Ca-63-R). Diese PCR weist das C-Allel nach.

Abbildung 3.7 zeigt ein Gel einer PCR von den gleichen Probanden wie in Abbildung 3.6, jedoch mit dem variierten Primerpaar (Cal-63varF und Cal-63-R). Damit wird das T-Allel nachgewiesen.

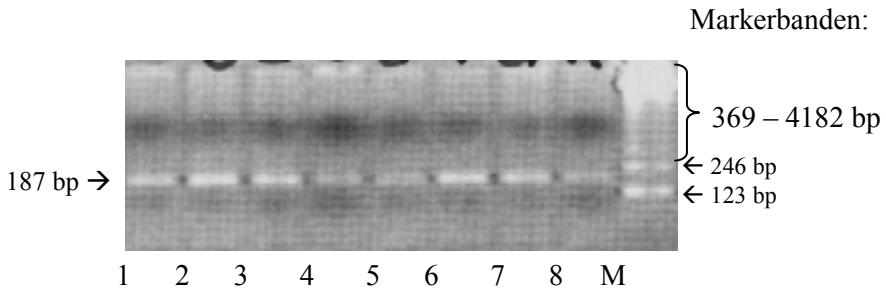


Abbildung 3.6: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-63 im Calpain-10-Gen mit nicht-variiertem Primerpaar zum Nachweis des C-Allels
1-Proband Familie A, 2-Mutter Familie A, 3-Vater Familie A, 4-Geschwister Familie A, 5-Proband Familie B, 6-Mutter Familie B, 7-Vater Familie B, 8-Geschwister Familie B, M-123-bp-Marker; Alle Probanden weisen das C-Allel auf.

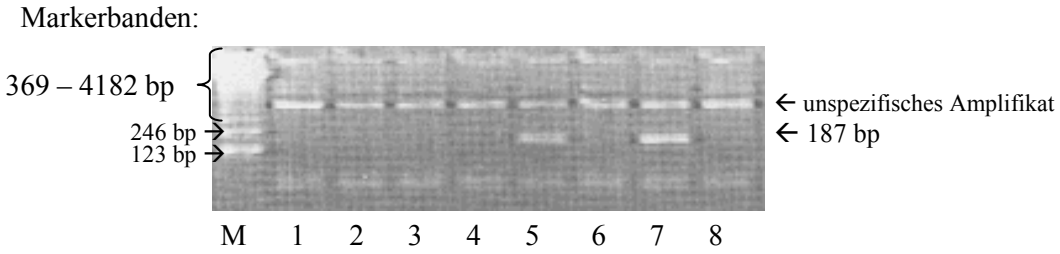


Abbildung 3.7: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-63 im Calpain-10-Gen mit variiertem Primerpaar zum Nachweis des T-Allels
M-123-bp-Marker, 1-Proband Familie A, 2-Mutter Familie A, 3-Vater Familie A, 4-Geschwister Familie A, 5-Proband Familie B, 6-Mutter Familie B, 7-Vater Familie B, 8-Geschwister Familie B; Probanden 5 und 7 weisen das T-Allel auf.

Der Genotyp eines Probanden kann nur mit beiden Gelen zusammen bestimmt werden. So sind hier alle Probanden homozygot (C/C), außer die Probanden 5 und 7, die heterozygot (C/T) sind.

SNP-38: An Position 43153 relativ zum Beginn des Calpain-10-Gens findet sich im einzigen Exon des nachfolgenden Gens *GPR35* ein Basenaustausch von Adenin zu Cytosin. Dies hat einen Aminosäureaustausch von Serin zu Arginin im *GPR35*-Gen zur Folge.

Für diese Untersuchung wurde eine PCR mit den Primern Cal-38-F und Cal-38-R durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem Enzym *Bse*LI verdaut. In Abbildung 3.8 ist ein Gel zu sehen, dessen Banden vom 123-bp-Marker, von ungeschnittenen (228 bp; entspricht dem A-Allel) und geschnittenen (158 bp + 70 bp; entspricht dem C-Allel) DNA-Fragmenten und von Primerdimeren stammen.

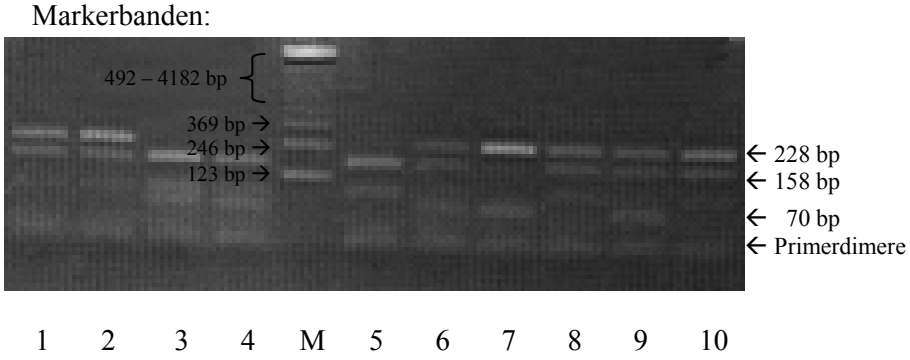


Abbildung 3.8: Agarose-Gel-Elektrophorese des SNP-38 im Calpain-10-Gen
1-Proband Familie A: heterozygot (A/C), 2-Mutter Familie A: heterozygot (A/C), 3-Vater Familie A: homozygot geschnitten (C/C), 4-Geschwister 1 Familie A: homozygot geschnitten (C/C), M-123-bp-Marker, 5-Geschwister 2 Familie A: homozygot geschnitten (C/C), 6-Geschwister 3 Familie A: heterozygot (A/C), 7-Proband Familie B: homozygot ungeschnitten (A/A), 8-Mutter Familie B: heterozygot (A/C), 9-Vater Familie B: heterozygot (A/C), 10-Geschwister Familie B: heterozygot (A/C).

3.2 ALLELVERTEILUNG UND GENOTYPFREQUENZEN

Als erstes wurden bei einem Teilkollektiv von 94 Indexprobanden und deren Eltern und insgesamt 110 Geschwistern die Allelfrequenzen aller 6 untersuchten Polymorphismen (SNP-118, -43, -19, -48, -63 und -38) bestimmt. Diese sind in Tabelle 3.1 angegeben. Danach wurde die Untersuchung auf das Gesamtkollektiv (166 Indexprobanden und deren Eltern, sowie 193 Geschwister) ausgedehnt, wobei hier nur noch die Allelfrequenzen der drei von Horikawa und Mitarbeitern (2000) beschriebenen Polymorphismen (SNP-43, -19 und -63) bestimmt wurden. Die Ergebnisse des Gesamtkollektivs sind in Tabelle 3.2 aufgestellt. Hieraus wurden die Genotypfrequenzen im Gesamtkollektiv bestimmt. Diese sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Tabelle 3.4 stellt die Allelfrequenzen der adipösen Patienten dieser Untersuchung mit den Allelfrequenzen der gesunden Probanden und der an NIDDM Erkrankten aus der Untersuchung von Horikawa und Mitarbeitern (2000) gegenüber. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

94 Indexpatienten mit Adipositas		
	Allelhäufigkeit	
	Allel 1	Allel 2
SNP-118	0,71	0,29
SNP-43	0,74	0,26
SNP-19	0,42	0,58
SNP-48	0,44	0,56
SNP-63	0,50	0,50
SNP-38	0,48	0,52
94 Väter		
	Allelhäufigkeit	
	Allel 1	Allel 2
SNP-118	0,74	0,26
SNP-43	0,72	0,28
SNP-19	0,43	0,57
SNP-48	0,46	0,54
SNP-63	0,93	0,07
SNP-38	0,53	0,47
94 Mütter		
	Allelhäufigkeit	
	Allel 1	Allel 2
SNP-118	0,69	0,31
SNP-43	0,76	0,24
SNP-19	0,44	0,56
SNP-48	0,48	0,52
SNP-63	0,97	0,03
SNP-38	0,47	0,53
110 Geschwister		
	Allelhäufigkeit	
	Allel 1	Allel 2
SNP-118	0,69	0,31
SNP-43	0,76	0,24
SNP-19	0,45	0,55
SNP-48	0,49	0,51
SNP-63	0,95	0,05
SNP-38	0,52	0,48

Tabelle 3.1: Allelfrequenzen im Teilkollektiv
94 Indexprobanden und deren Eltern sowie 110 Geschwistern (SNP-118: Allel 1=C, Allel 2=G; SNP-43: Allel 1=G, Allel 2=A; SNP-19: Allel 1=2 Wiederholungen des 32bp-Repeats, Allel 2=3 Wiederholungen des 32bp-Repeats; SNP-48: Allel 1=G, Allel 2=A; SNP-63: Allel 1=C, Allel 2=T; SNP-38: Allel 1=A, Allel 2=C).

166 Indexpatienten mit Adipositas				
	Allelhäufigkeit		Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	
	Allel 1	Allel 2	T-Wert	p-Wert
SNP-43	0,74	0,26	0,13	0,72
SNP-19	0,38	0,62	0,09	0,76
SNP-63	0,93	0,07	0,92	0,34
166 Elternpaare				
	Allelhäufigkeit		Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	
	Allel 1	Allel 2	T-Wert	p-Wert
SNP-43	0,75	0,25	0,77	0,38
SNP-19	0,40	0,60	0,01	0,91
SNP-63	0,92	0,08	0,54	0,46
193 Geschwister				
	Allelhäufigkeit		Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	
	Allel 1	Allel 2	T-Wert	p-Wert
SNP-43	0,78	0,22	6,72	0,01
SNP-19	0,44	0,56	1,08	0,30
SNP-63	0,92	0,08	1,47	0,23

Tabelle 3.2: Allelfrequenzen im Gesamtkollektiv
Bei 166 Indexprobanden und deren Eltern sowie 193 Geschwistern (SNP-43: Allel 1=G, Allel 2=A; SNP-19: Allel 1=2 Wiederholungen des 32bp-Repeats, Allel 2=3 Wiederholungen des 32bp-Repeats; SNP-63: Allel 1=C, Allel 2=T).

Polymorphismus	Genotyp	Indexpatienten		Eltern		Geschwister	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
SNP-43	11	91	54,82	183	55,12	125	64,77
	12	65	39,16	131	39,46	53	27,46
	22	10	6,02	18	5,42	15	7,77
SNP-19	11	26	15,66	55	16,57	41	21,24
	12	77	46,39	159	47,89	88	45,60
	22	63	37,95	118	35,54	64	33,16
SNP-63	11	143	86,14	283	85,24	162	83,94
	12	23	13,86	46	13,86	31	16,06
	22	0	0,00	3	0,90	0	0,00

Tabelle 3.3: Genotypfrequenzen von SNP-43, -19 und -63
(SNP-43: Allel 1=G, Allel 2=A; SNP-19: Allel 1=2 Wiederholungen des 32bp-Repeats, Allel 2=3 Wiederholungen des 32bp-Repeats; SNP-63: Allel 1=C, Allel 2=T).

Polymorphismus	Allel	Frequenz f, mit der das Allel in der jeweiligen Gruppen vorkommt				
		adipöse Indexpatienten dieser Untersuchung	Horikawa et al. (2000)			
			Deutsche		Mexikanische Amerikaner	
			Kontrollen	Patienten	Kontrollen	Patienten
SNP-118	C	0,71	NA	NA	0,85	0,88
	G	0,29	NA	NA	0,15	0,12
SNP-43	G	0,74	0,66	0,72	0,75	0,80
	A	0,26	0,34	0,28	0,25	0,20
SNP-19	2	0,42	0,27	0,34	0,57	0,58
	3	0,58	0,73	0,66	0,43	0,42
SNP-48	G	0,44	NA	NA	0,53	0,58
	A	0,56	NA	NA	0,47	0,42
SNP-63	C	0,50	0,94	0,92	0,77	0,77
	T	0,50	0,06	0,08	0,23	0,23
SNP-38	A	0,48	NA	NA	0,62	0,50
	C	0,52	NA	NA	0,38	0,50

Tabelle 3.4: Gegenüberstellung der Allelfrequenzen der adipösen Patienten dieser Untersuchung mit Kontrollen und an NIDDM erkrankten Patienten der Untersuchung von Horikawa und Mitarbeitern (2000).
[Horikawa et al., 2000]; NA= nicht angegeben

3.3 KOPPLUNGSANALYSE

Die anschließend durchgeführte modellfreie Kopplungsanalyse an den Markern D2S125 und D2S2338 zeigte im Gesamtkollektiv (166 Indexprobanden) keinen Hinweis auf Kopplung der untersuchten Region mit Adipositas. Keiner der Multipoint-LOD-Werte lag über 0,45. Die Berechnung der Two-Point-LOD-Werte zeigte die in Tabelle 3.5 angegebenen Ergebnisse.

Marker	Two-Point-LOD-score	
	Teil-Kollektiv	gesamtes Kollektiv (MLBGH)
D2S125	1,002	0,388
SNP-118	0,082	n.u.
SNP-43	0,594	0,116
SNP-19	0,075	0,000
SNP-63	0,061	0,000
SNP-48	0,102	n.u.
SNP-38	0,000	n.u.
D2S2338	1,591	0,450

Tabelle 3.5: Berechnung der Werte des Two-Point-LOD der Marker D2S125 und D2S2338 sowie der SNPs -118, -43, -19, -63 ,-48, -38.
Getrennt aufgelistet sind die Ergebnisse für die Untersuchungen des ersten Teil-Kollektivs (n=96 Familien) und des gesamten Kollektivs (n=166 Familien). n.u. = nicht untersucht: beim Gesamtkollektiv wurden die SNPs -118, 48 und -38 nicht weiter untersucht (s. Text).

3.4 PDT DER SNPS -43, -19 UND -63

Im nächsten Schritt wurde im Gesamtkollektiv (166 Indexprobanden mit Familien) ein einseitiger asymptotischer PDT für SNP-43 berechnet, um die Transmissionshäufigkeit der einzelnen Allele zu überprüfen. Hierbei zeigte sich keine erhöhte Transmission des G-Allels (Transmissionsrate 50,7%; p-Wert 0,29). Der PDT der SNPs-19 und -63 zeigte ebenfalls keine erhöhte Transmission eines Allels (SNP-19: Transmissionsrate 50,0%, p-Wert 0,98; SNP-63: Transmissionsrate C-Allel: 50,3%, p-Wert 0,56). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Polymorphismus		transmittiert	nicht transmittiert	Transmissions-rate	p-Wert
SNP-43					
	Allel 1	547	532	50,7%	0,29
	Allel 2	167	182	47,9%	0,29
SNP-19					
	Allel 1	296	296	50,0%	0,98
	Allel 2	418	418	50,0%	0,98
SNP-63					
	Allel 1	660	652	50,3%	0,56
	Allel 2	54	62	46,6%	0,56

Tabelle 3.6: PDT von SNP-43, SNP-19 und SNP-63 von 166 Indexprobanden, deren Eltern und Geschwistern.
(SNP-43: Allel 1=G, Allel 2=A; SNP-19: Allel 1=2 Wiederholungen des 32bp-Repeats, Allel 2=3 Wiederholungen des 32bp-Repeats; SNP-63: Allel 1=C, Allel 2=T).

3.5 DIE HAPLOTYPEN AUS DEN SNPS -43, -19 UND -63

Für die Untersuchung der Haplotypen, die aus den drei SNPs -43, -19 und -63 gebildet werden, wurden die Haplotypfrequenzen bestimmt und ein einseitiger asymptotischer PDT durchgeführt. Tabelle 3.7 zeigt die Haplotypfrequenzen bei den Kindern und deren Eltern, Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse des PDT. Die restlichen, aus SNP-118, -48 und -38 gebildeten, Haplotypen wurden explorativ untersucht. Bei diesen Untersuchungen konnte keine signifikant erhöhte Transmission eines Haplotypen festgestellt werden.

166 Indexpatienten mit Adipositas		
Haplotyp	Anzahl	Häufigkeit (%)
111	105	31,6
112	20	6,0
121	120	36,1
122	2	0,6
211	4	1,2
212	0	0,0
221	80	24,1
222	1	0,3
166 Elternpaare		
Haplotyp	Anzahl	Häufigkeit (%)
111	220	33,1
112	42	6,3
121	227	34,2
122	8	1,2
211	7	1,1
212	0	0,0
221	158	23,8
222	2	0,3
193 Geschwister		
Haplotyp	Anzahl	Häufigkeit (%)
111	138	35,8
112	27	7,0
121	134	34,7
122	4	1,0
211	5	1,3
212	0	0,0
221	78	20,2
222	0	0,0

Tabelle 3.7: Haplotypfrequenzen
Bei 166 Indexprobanden und deren Eltern sowie 193 Geschwistern. Innerhalb eines Haplotypen gilt die Reihenfolge SNP-43, SNP-19 und SNP-63. Die Ziffer "1" bei SNP-43 für das G-Allel, bei SNP-19 für 2 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das C-Allel. Die Ziffer "2" steht bei SNP-43 für das A-Allel, bei SNP-19 für 3 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das T-Allel.

Haplotyp	Indexpatienten	Eltern	Transmission in Prozent (p-Wert)
111	105	220	49,5 (0,84)
112	20	42	49,5 (1,00)
121	120	227	52,5 (0,19)
122	2	8	35,3 (0,45)
211	4	7	64,3 (0,66)
212	0	0	0
221	80	158	47,7 (0,31)
222	1	2	0 (0,32)

Tabelle 3.8: PDT der Haplotypen der 3 interessanten SNPs -43, -19 und -63 von 166 Indexprobanden.
Zu den Haplotypen sind das jeweilige Vorkommen sowie die Transmission in Prozent und der P-Wert angegeben. Innerhalb eines Haplotypen gilt die Reihenfolge SNP-43, SNP-19 und SNP-63. Die Ziffer "1" bei SNP-43 für das G-Allel, bei SNP-19 für 2 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das C-Allel. Die Ziffer "2" steht bei SNP-43 für das A-Allel, bei SNP-19 für 3 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das T-Allel.

3.6 DIE DIPLOTYPEN AUS DEN SNPS -43, -19 UND -63

Die Untersuchung erstreckte sich auf alle Diplotypen, die aus SNP-43, -19 und -63 gebildet werden können. Ausgehend von der Haplotypverteilung bei den Eltern wurde die bei den Kindern zu erwartenden berechnet und mit der tatsächlich beobachteten Haplotypverteilung mittels eines einseitigen exakten Tests verglichen. Hierbei wurde spezielles Augenmerk auf den „high-risk"-Diplotyp 112-121 von Horikawa et al. (2000) gelegt. Damit ein Kind diesen relevanten Diplotyp erben kann, muss ein Elternteil den 112-Haplotyp aufweisen, der andere Elternteil den 121-Haplotyp. Je nach Verteilung der Haplotypen bei den Eltern beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Kind, den 112-121 Haplotyp zu erben, 0,25, 0,5 oder 1.

Bei der explorativen Analyse des Teilkollektivs zeigte sich eine veränderte Transmission für den Diplotyp 121/221. Hier standen 30,25 erwarteten Kindern, die diesen Diplotyp erben, 19 tatsächlich beobachtete entgegen (Tabelle 3.9). Im Gesamtkollektiv konnte keine signifikant veränderte Transmission festgestellt werden (55,25 erwarteten Fällen standen 50 beobachtete Fälle gegenüber, Tabelle 3.10).

In Tabelle 3.10 ist die Verteilung der Diplotypen wiedergegeben. Die explorative Untersuchung der aus den restlichen Polymorphismen SNP-118, -48 und -38 gebildeten Diplotypen zeigte keine überzufällig häufige Vererbung.

Diplotyp	Auftreten dieses Diplotyps bei den Eltern		Anzahl der Kinder, die den jeweiligen Haplotyp mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit p erben			erwartete Anzahl	beobachtete Anzahl
	n	relative Häufigkeit	p=0.25	p=0.5	p=1		
11	63	0,161	45	31	13	39,75	35
12	12	0,031	7	4	0	3,75	6
13	89	0,227	77	38	2	40,25	40
14	2	0,005	5	0	0	1,25	1
15	2	0,005	12	0	0	3	0
16	0	0,000	0	0	0	0	0
17	63	0,161	66	26	0	29,5	35
18	0	0,000	0	0	0	0	0
22	0	0,000	0	0	0	0	0
23	**8**	**0,020**	**13**	**0**	**0**	**3,25**	**6**
24	1	0,003	0	0	0	0	0
25	0	0,000	0	0	0	0	0
26	0	0,000	0	0	0	0	0
27	11	0,028	18	5	0	7	6
28	0	0,000	0	0	0	0	0
33	38	0,097	40	18	2	21	24
34	3	0,008	10	0	0	2,5	3
35	11	0,028	14	2	0	4,5	7
36	0	0,000	0	0	0	0	0
37	**64**	**0,163**	**57**	**24**	**4**	**30,25**	**19**
38	1	0,003	2	0	0	0,5	0
44	0	0,000	0	0	0	0	0
45	1	0,003	0	0	0	0	0
46	0	0,000	0	0	0	0	0
47	0	0,000	3	0	0	0,75	0
48	0	0,000	2	0	0	0,5	0
55	0	0,000	0	0	0	0	0
56	0	0,000	0	0	0	0	0
57	2	0,005	2	0	0	0,5	2
58	0	0,000	0	0	0	0	0
66	0	0,000	0	0	0	0	0
67	0	0,000	0	0	0	0	0
68	0	0,000	0	0	0	0	0
77	21	0,054	23	14	0	12,75	9
78	0	0,000	0	0	0	0	0
88	0	0,000	0	0	0	0	0

Kodierung für die Diplotypen:
Die Haplotyp-Kodierung gibt zuerst SNP-43, dann SNP-19 und an letzter Stelle SNP-63 an.

1= Haplotyp 1-1-1	5= Haplotyp 2-1-1
2= Haplotyp 1-1-2	6= Haplotyp 2-1-2
3= Haplotyp 1-2-1	**7= Haplotyp 2-2-1**
4= Haplotyp 1-2-2	8= Haplotyp 2-2-2

Tabelle 3.9: Verteilung der Diplotypen im Teilkollektiv (n=96 Familien) bei den Eltern und die daraus errechnete zu erwartende und die wirklich beobachtete Verteilung bei deren Kindern.
Bei der Kodierung der Diplotypen steht z.B. 23 für den Diplotyp 112/121. Innerhalb eines Haplotyps steht "1" bei SNP-43 für das G-Allel, bei SNP-19 für 2 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das C-Allel. Die Ziffer "2" steht bei SNP-43 für das A-Allel, bei SNP-19 für 3 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das T-Allel.

Diplotyp	Auftreten dieses Diplotyps bei den Eltern		Anzahl der Kinder, die den jeweiligen Haplotyp mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit p erben			erwartete Anzahl	erwarteter Anteil	beobachtete Anzahl	beobachteter Anteil	erwarteter oder beobachteter Anteil > 5%
	n	relative Häufigkeit	p=0.25	p=0.5	p=1					
11	38	0,114	71	39	13	50,25	0,140	48	0,134	x
12	13	0,039	21	12	2	13,25	0,037	19	0,053	x
13	75	0,226	99	96	2	74,75	0,208	73	0,203	x
14	6	0,018	7	2	0	2,75	0,008	5	0,014	
15	2	0,006	12	0	0	3	0,008	0	0,000	
16	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
17	47	0,142	91	53	0	49,25	0,137	49	0,136	x
18	1	0,003	4	0	0	1	0,003	1	0,003	
22	2	0,006	7	0	0	1,75	0,005	0	0,000	
23	**12**	**0,036**	**38**	**12**	**0**	**15,5**	**0,043**	**17**	**0,047**	**x**
24	1	0,003	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
25	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
26	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
27	12	0,036	39	9	0	14,25	0,040	11	0,031	
28	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
33	36	0,108	79	45	2	44,25	0,123	53	0,148	x
34	0	0,000	10	3	0	4	0,011	1	0,003	
35	4	0,012	14	2	0	4,5	0,013	7	0,019	
36	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
37	**63**	**0,190**	**93**	**52**	**6**	**55,25**	**0,154**	**50**	**0,139**	**x**
38	1	0,003	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
44	0	0,000	2	0	0	0,5	0,001	0	0,000	
45	1	0,003	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
46	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
47	0	0,000	3	0	0	0,75	0,002	0	0,000	
48	0	0,000	4	0	0	1	0,003	0	0,000	
55	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
56	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
57	0	0,000	2	0	0	0,5	0,001	2	0,006	
58	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
66	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
67	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
68	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
77	18	0,054	42	24	0	22,5	0,063	23	0,064	x
78	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	
88	0	0,000	0	0	0	0	0,000	0	0,000	

Kodierung für die Diplotypen:
Die Haplotyp-Kodierung gibt zuerst SNP-43, dann SNP-19 und an letzter Stelle SNP-63 an.

1= Haplotyp 1-1-1	5= Haplotyp 2-1-1
2= Haplotyp 1-1-2	6= Haplotyp 2-1-2
3= Haplotyp 1-2-1	**7= Haplotyp 2-2-1**
4= Haplotyp 1-2-2	8= Haplotyp 2-2-2

Tabelle 3.10: Verteilung der Diplotypen im gesamten Kollektiv (n=166 Familien) bei den Eltern und die daraus errechnete zu erwartende und die wirklich beobachtete Verteilung bei deren Kindern.
Bei der Kodierung der Diplotypen steht z.B. 23 für den Diplotyp 112/121. Innerhalb eines Haplotyps steht "1" bei SNP-43 für das G-Allel, bei SNP-19 für 2 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das C-Allel. Die Ziffer "2" steht bei SNP-43 für das A-Allel, bei SNP-19 für 3 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das T-Allel.

In Bezug auf den „high-risk“-Diplotyp wurden 50 Kinder gefunden, bei denen jedes Elternteil entweder einen oder zwei der relevanten Haplotypen besaß (Tabelle 3.11). Bei 38 Kindern hatte jedes Elternteil genau einen dieser beiden Haplotypen. Diese Kinder erben den „high-risk“-Diplotyp mit einer Wahrscheinlichkeit von p=0,25. Bei 12 Kindern war ein Elternteil homozygot für den einen Haplotypen und der andere Elternteil heterozygot für den jeweiligen anderen Haplotyp. Diese Kinder erben den „high-risk“-Diplotyp mit einer Wahrscheinlichkeit von p=0,5. Bei keinem Kind wurden Eltern gefunden, bei denen ein Elternteil homozygot für den einen und der andere Elternteil homozygot für den anderen Haplotyp war. Daraus ergibt sich eine erwartete Häufigkeit von 15,5. Die tatsächliche beobachtete Anzahl von 17 liegt nur leicht darüber (p-Wert=0,3) und entspricht einem Anteil von 4,7% (95%-Konvidenzintervall: 2,9-7,3%). Dieser Anteil liegt zwischen dem Anteil bei gesunden Kontrollpatienten (1,3%) und an NIDDM erkrankten Patienten (6,1%) aus Dresden [Horikawa et al., 2000].

Diplotypen der Eltern	112/xxx und 121/xxx	112/112 und 121/xxx oder 121/121 und 112/xxx	112/112 und 121/121
Anzahl der Kinder	38	12	0

Tabelle 3.11: Die 50 Kinder, die den „high-risk“-Diplotyp erben können, aufgelistet nach den Diplotypen der Eltern.
xxx steht für jeden Haplotyp außer 112 und 121.

3.7 TDT DER MIKROSATELLITENMARKER D2S125 UND D2S2338

Um die Haplotypen richtig zuordnen zu können, wurde der TDT (Transmissions-Disequilibrium-Test) für zwei flankierende Mikrosatellitenmarker (D2S125 und D2S2338) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13 zu sehen. Angegeben sind jeweils die Anzahl der Fälle, in denen das Allel transmittiert bzw. nicht transmittiert wurde, die Transmissionsrate, der χ^2-Wert und der p-Wert.

Marker	Allel	gesamtes Kollektiv (n=166 Familien)				
		trans-mittiert	nicht transmittiert	Trans-missionsrate	χ^2	p-Wert
D2S125	1	4	3	57,1 %	0,14	0,705
	2	128	107	54,5 %	1,88	0,171
	3	84	83	50,3 %	0,01	0,938
	4	70	100	41,2 %	5,29	0,021
	5	145	142	50,5 %	0,03	0,859
	6	48	65	42,5 %	2,56	0,110
	7	34	35	49,3 %	0,01	0,904
	8	58	42	58,0 %	2,56	0,110
	9	13	8	61,9 %	1,19	0,275
	10	3	2	60,0 %	0,20	0,655

Tabelle 3.12: TDT der 10 Allele des Markers D2S125 auf Chromosom 2 in der Umgebung des Calpain-10-Gens.
Angegeben ist jeweils die Anzahl der Fälle, in denen das Allel transmittiert bzw. nicht transmittiert wurde. Daraus errechnen sich die Transmissionsrate sowie der χ^2-Wert und der p-Wert.

Marker	Allel	gesamtes Kollektiv (n=166 Familien)				
		trans-mittiert	nicht transmittiert	Trans-missionsrate [%]	X^2	p-Wert
D2S2338	1	3	8	27,3	2,27	0,132
	2	4	1	80,0	1,80	0,180
	3	174	178	49,4	0,05	0,831
	4	10	13	43,5	0,39	0,532
	5	180	170	51,4	0,29	0,593
	6	11	12	47,8	0,04	0,835

Tabelle 3.13: TDT der 6 Allele des Markers D2S2338 auf Chromosom 2, flankierend zu *CAPN10*.
Angegeben ist jeweils die Anzahl der Fälle, in denen das Allel transmittiert bzw. nicht transmittiert wurde. Daraus errechnen sich die Transmissionsrate sowie der χ^2-Wert und der p-Wert.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von sechs Polymorphismen im *CAPN10*-Gen auf Chromosom 2q37 - speziell der SNPs -43, -19 und -63 - auf die früh manifeste Adipositas zu prüfen. Hierfür wurden 166 Familien mit 166 adipösen Indexprobanden sowie deren insgesamt 193 adipösen Geschwistern untersucht.

Im Gegensatz zu viel versprechenden Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen über die *CAPN10*-Region in Bezug auf NIDDM [Horikawa et al., 2000], sowie Kopplungsbefunden in dieser Region für Adipositas [Hager et al., 1998] und der Tatsache, dass an NIDDM Erkrankte meist erhöhte BMI-Werte aufweisen [Song et al., 2004], stützen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Verwicklung von *CAPN10* in die Entstehung von früh manifester Adipositas nicht:

Allelverteilung. Die Allelverteilung bei den sechs untersuchten SNPs wich nicht vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab und zeigte damit keine Assoziation mit Adipositas und war der anderer kaukasischer Populationen ähnlich. Tabelle 4.1 zeigt eine Gegenüberstellung der Allelfrequenzen der drei den „high-risk"-Diplotyp definierenden SNPs aus dieser Arbeit mit den Allelfrequenzen, die in anderen kaukasischen und auch anderer Populationen gefunden wurden. Ehrmann und Mitarbeiter (2002) konnten bei an PCOS Erkrankten Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen Weißen und Afro-Amerikanern nachweisen [Ehrmann et al., 2002]. Ebenso fanden Fullerton et al. 2002 bei der Genotypisierung von Individuen von fünf Kontinenten bei der Allelfrequenz der den 112/121-Diplotyp definierenden SNPs zwischen Afrikanern und Nicht-Afrikanern größere Unterschiede als erwartet [Fullerton et al., 2002].

SNP-		Allelfrequenzen (%)							
		Indexpatienten dieser Untersuchung	Ehrmann et al., 2002		Elbein et al., 2002	Horikawa et al., 2000		Malecki et al., 2000	
			Weiße	Afro-Amerikaner		Finnland	Deutschland	Polen NIDDM	Polen Kontrollen
43	G-Allel	74	65	80	74±2	67	66	73	69
	A-Allel	26	35	20	26±2	33	34	27	31
19	2 Repeats	38	36	66	43±2	38	27	34	35
	3 Repeats	62	64	34	57±2	62	73	66	65
63	C-Allel	93	90	53	92±1	97	94	93	91
	T-Allel	7	10	47	8±1	3	6	7	9

Tabelle 4.1: Allelverteilung der SNPs, die den „high-risk"-Diplotyp definieren, in verschiedenen Populationen
[Ehrmann et al., 2002 (Probanden mit PCOS und z.T. NIDDM); Elbein et al., 2002 (Probanden nordeuropäischer Abstammung, an NIDDM Erkrankte und Kontrollen); Horikawa et al., 2000 (nicht an NIDDM Erkrankte); Malecki et al., 2002]

Kopplungsanalyse. Bei den Kopplungsuntersuchungen konnte keine Kopplung von Adipositas mit den drei SNPs -43, -19 und -63 oder den beiden Mikrosatellitenmarkern D2S125 und D2S2338 nachgewiesen werden. Der höchste LOD-Score wurde bei dem Mikrosatellitenmarker D2S2338 (0,45) beobachtet.

Der PDT. Die Transmissionsraten der Allele der SNPs -43, -19 und -63 und der daraus gebildeten Haplotypen wichen nicht signifikant von 50% ab.

Die Haplotypen. Die Haplotypfrequenzen waren denen anderer kaukasischer Familien sehr ähnlich. Ehrmann und Mitarbeiter konnten (2002) bei Patienten mit PCOS neben Unterschieden in der Allelverteilung auch einen Unterschied in der Haplotypverteilung zwischen Weißen und Afro-Amerikanern feststellen, der allerdings bei geringer Fallzahl in Hinblick auf das NIDDM-Risiko nicht signifikant war. (Tabelle 4.2) [Ehrmann et al., 2002; Elbein et al., 2002; Horikawa et al., 2000; Malecki et al., 2002].

Haplotyp	Haplotypfrequenzen (%)							
	Indexpatienten dieser Untersuchung	Ehrmann et al., 2002		Elbein et al, 2002*	Horikawa et al., 2000		Malecki et al., 2002	
		Weiße	Afro-Amerikaner		Finnland	Deutschland	Polen NIDDM	Polen Kontrollen
111	31,6	27	19	31	35	25	27,0	26,4
112	6,0	11	47	7	3	3	7,2	8,8
121	36,1	27	17	35	29	42	38,9	33,7
122	0,6	k.A.	k.A.	1	0	1	0	1
211	1,2	k.A.	k.A.	1	0,3	0	k.A.	k.A.
212	0,0	k.A.	k.A.	0	0	0	k.A.	k.A.
221	24,1	34	16	25	32	29	29,9	30,7
222	0,3	k.A.	k.A.	0	0	0	k.A.	k.A.

Tabelle 4.2: Verteilung der Haplotypen, die aus SNP-43, SNP-19 und SNP-63 gebildet werden, in verschiedenen Populationen
[Ehrmann et al., 2002 (Probanden mit PCOS, ohne NIDDM); Elbein et al., 2002 (Probanden nordeuropäischer Abstammung, an NIDDM Erkrankte und Kontrollen); Horikawa et al., 2000 (nicht an NIDDM Erkrankte); Malecki et al., 2002]. Innerhalb eines Haplotypen gilt die Reihenfolge SNP-43, SNP-19 und SNP-63. Die Ziffer "1" bei SNP-43 für das G-Allel, bei SNP-19 für 2 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das C-Allel. Die Ziffer "2" steht bei SNP-43 für das A-Allel, bei SNP-19 für 3 Kopien des Repeats und bei SNP-63 für das T-Allel. K.A.= keine Angaben in der Literatur

Die Diplotypen. In der vorliegenden Arbeit wich bei der Weitervererbung der Diplotypen die tatsächlich beobachtete Anzahl nicht signifikant von der jeweils erwarteten ab. Es konnte keine Abhängigkeit zwischen dem von Horikawa und Mitarbeitern (2000) beschriebenen „high-risk"-Diplotypen 112/121 und früh manifester Adipositas gefunden werden.

* In dieser Veröffentlichung kann man in der Tabelle, die die Haplotypfrequenzen angibt, die Frequenzen nicht eindeutig dem jeweiligen Haplotypen zuordnen, da wahrscheinlich durch ein Versehen ein Haplotyp doppelt aufgeführt ist. Hier sind die Frequenzen aufgeführt, wie sie mutmaßlich beobachtet wurden. Eine Anfrage hierzu wurde an den Autor gestellt.

Besprechung. Assoziation der drei SNPs - 43, -19 und -63 mit NIDDM konnte in einigen Populationen nachgewiesen werden [Baier et al., 2000 (Pima Indianer); Cassell et al., 2002 (Inder); Garant et al., 2002 (Afro-Amerikaner); Malecki et al., 2002 (Polen); Orho-Melander et al., 2002 (Finnen)], in anderen Populationen dagegen nicht [Evans et al., 2001 (Briten); Hegele et al., 2001 (Oji-Cree Indianer); Tsai et al., 2001 (Polynesier von Samoa); Xiang et al., 2001 (Chinesen); Daimon et al., 2002 (Japaner); Elbein et al., 2002 (Weiße aus Utah); Fingerlin et al., 2002 (Finnen); Rasmussen et al., 2002 (Dänen und Schweden); Horikawa et al., 2003 (Japaner)].

Im Gegensatz zur Eingangshypothese der vorliegenden Arbeit, legen einzelne Studien sogar den Verdacht nahe, dass der „high-risk"-Diplotyp (112/121) das Risiko, an Adipositas zu erkranken, minimiert. So wies ein Genomscreen für koronare Herzkrankheit bei einer indo-mauretanischen Population die größte Kopplung von NIDDM an den Chromosomenort 2q37 (*CAPN10-Region)* bei den 24 Familien mit NIDDM nach, die den geringsten BMI aufwiesen [Francke et al., 2001]. Bei einer Untersuchung in einer Population im Südwesten Deutschlands konnten Stumvoll und Mitarbeiter (2001) keine unterschiedliche Allelverteilung bei den Probanden mit normaler und denen mit gestörter Glukosetoleranz feststellen. Der Genotyp G/G des SNP-43 war mit höherer Glukose-stimulierter Insulinsekretion und effizienterer Konversion von Proinsulin in Insulin assoziiert war. Das Gegenteil der zwei genannten Parameter ist aber typisch für NIDDM. Diplotypen wurden aufgrund der kleinen Studiengruppe nicht gebildet [Stumvoll et al., 2001]. Wu et al. (2005) zeigten, dass der „high-risk"-Diplotyp in einer chinesischen Population das NIDDM-Risiko sogar senkt, dafür aber das Risiko, erhöhte Cholesterinwerte aufzuweisen, erhöht [Wu et al., 2005]. Zusätzlich zeigten Ehrmann und Mitarbeiter 2002 bei Patienten, die an PCOS, nicht aber an NIDDM erkrankt waren, dass die, die den 112/121-Diplotyp trugen, weniger adipös waren als Patienten, die diesen Diplotyp nicht aufwiesen [Ehrmann et al., 2002].

Die Widersprüche zwischen den Ergebnissen der publizierten Arbeiten und den Daten der vorliegenden Arbeit könnten durch falsch positive oder negative Werte und durch genetische Heterogenität erklärt werden. Angesichts der vielen unterschiedlichen Geno- und Phänotypen, die in den Arbeiten, die eine Assoziation von Körpergewicht mit der Chomosomenregion 2q37 zeigten, untersucht wurden, müssen Mehrfachbestimmungen als eine mögliche Erklärung in Betracht gezogen werden. Geografische und ethnische Unterschiede spielen sicher eine Rolle in der Verteilung der Allel, Haplotyp- und Genotypfrequenzen und könnten möglicherweise als positiver Selektionsdruck interpretiert werden [Fullerton et al., 2002]. Dies erschwert die Suche nach einer oder mehreren Varianten, die zu NIDDM oder Adipositas führen können. Song et al. (2004) zeigen, dass unzureichende statistische Aussagekraft (Power), o.g. Populations-unterschiede, potentielle Gen-Gen oder Gen-Umwelt-Interaktionen, systematische Fehler

(publication bias) und Mehrfachprüfungen von Hypothesen zur Heterogenität vorangegangener Studien zu *CAPN10* und NIDDM beitragen könnten [Song et al., 2004].

Die Auswirkungen von Variationen im Chromosom 2q37 auf andere biochemische Mechanismen wie die Assoziation von SNP-19 mit der lipolytische Aktivität adrenerger Rezeptoren in Fettzellen oder die Auswirkungen von erniedrigten *CAPN10*-mRNA-Leveln müssen weiter untersucht werden [Hoffstedt et al., 2002a; Baier et al., 2000; Yang et al., 2001]. Diese noch nicht vollständig entschlüsselten Mechanismen könnten die Deutung der Ergebnisse anderer Studien vereinfachen und vor allem Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen darstellen.

Ausblick. Song et al. (2004) regen an, dass beides, groß angelegte, gut gestaltete Assoziationsstudien und auch funktionelle (in-vitro-) Untersuchungen gerechtfertigt sind, um die Hypothese hinsichtlich der Rolle von *CAPN10* für das NIDDM-Risiko entweder zuverlässig zu bestätigen oder schlüssig zu widerlegen [Song et al., 2004]. Es muss versucht werden, die statistische Aussagekraft der Analysen und damit die Genauigkeit zu erhöhen. Dies kann z.B. durch Erhöhung der Fallzahlen, Verfeinerung der Phänotypen und Benutzung extremer Phänotypen geschehen, ist aber meist mit erhöhten Kosten verbunden. Wie schon bei der Untersuchung anderer komplexer Krankheiten geschehen (z.B. bei Diabetes mellitus Typ I und Asthma), kann die Zusammenarbeit mehrerer Arbeitsgruppen und damit die Zusammenlegung der Datensätze die statistische Power erhöhen, birgt aber das Problem, wie das oft recht heterogene Datenmaterial abgeglichen werden kann [Bell et al., 2005]. Schön wäre es, wenn in Hinblick auf das Adipositas-Risiko in der Zukunft Studien ähnlichen Ausmaßes möglich wären.

Die Entschlüsselung annähernd des gesamten menschlichen Genoms ist durch die Schaffung von Hochleistungslabors mit Automatisierung vieler Arbeitschritten und rasant gewachsener Rechnerleistungen, womit ein hoher Probendurchsatz erreicht werden konnte, fast abgeschlossen. Hier bieten sich für die Zukunft unvorstellbare Möglichkeiten für große Assoziations- und Kopplungsstudien.

In den bisherigen Studien zur Adipositas wurden viele Phänotypen untersucht, die jeweils Vor- und Nachteile haben und es herrscht nur wenig Einigkeit darüber, welcher Phänotyp der beste ist. Es sollte weiterhin die Untersuchung von Intermediär-Phänotypen (Fettverteilungsmuster, Hormonspiegel) verfeinert werden, da BMI und Adipositas Phänotypen sind, die ganz am Ende einer möglichen Reihe von Veränderungen stehen und so die entdeckten Gen-Variationen nicht einem Einzelschritt in der Adipositas-Entstehung zugeordnet werden können. Hier bietet die in letzter Zeit häufiger zur Anwendung kommende Microarray-Technik neue Möglichkeiten: die Gen-Expression einer Vielzahl von Genen wird in verschiedenen Geweben, hier in Adipozyten, untersucht und zwischen adipösen und normalgewichtigen Probanden verglichen, um damit Gene zu finden, die zwischen diesen beiden Zuständen eine Hoch- oder Herunterregulation

erfahren. Diese Technik ist allerdings mit hohen Kosten verbunden und die Aussagekraft ist umstritten, da bislang beim Menschen keine bahnbrechenden Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die hier untersuchten Genvariationen sind in Introns lokalisiert. Entgegen dem allgemeinen Trend, muss in Zukunft ein besonderes Augenmerk auf diese Intronregionen gelegt werden, um die funktionelle Relevanz dieser Intron-Variationen aufzudecken. Um dieses weite Feld zugänglicher zu machen, werden Methoden zu finden sein, um funktionelle Elemente sowohl in kodierende als auch in nicht-kodierende Regionen aufzuspüren.

Geht man davon aus, dass der genetische Einfluss auf die Entstehung von Adipositas polygenisch ist, d.h. spielen mehrere Gen-Variationen mit wahrscheinlich eher geringem einzelnen Einfluss eine Rolle, dann ist klar, dass die Suche nach den Einfluss nehmende Variationen bzw. nach den Kombinationen aus den Variationen eine große Aufgabe ist und das große Fallzahlen nötig sind, um geringe Einflüsse einzelne Genvariationen aufzudecken.

Man darf nicht außer Acht lassen, dass bei der Entstehung von Adipositas neben den genetischen Faktoren natürlich auch Umgebungsfaktoren wie Erziehung und Vorbildfunktion durch die Eltern und das weitere sozialen Umfeld und damit Verhalten, Ernährung und Einstellung zu sportlichen Aktivitäten eine große Rolle spielen. Hier muss durch gezielte und individuelle präventive Maßnahmen im häuslichen Umfeld, in der Schule und am besten schon im Vorschulalter entgegen gewirkt werden, um die immensen Folgen für den Einzelnen und die Gesellschaft zu minimieren. Das Bewusstsein dafür, dass Adipositas nicht verharmlost werden darf, muss weiter geschärft und gleichzeitig der Stigmatisierung adipöser Menschen entschieden entgegen getreten werden.

Das Gen bzw. die Gene, die die Kopplung von Adipositas mit den Chromosom-Regionen – insbesondere mit dem hier behandelten Abschnitt auf Chromosom 2q37 – hervorrufen, müssen in weiteren Untersuchungen noch identifiziert werden. Die biochemischen Signalübertragungswege und Wirkmechanismen müssen genauer entschlüsselt werden, um daraus sichere und effektive Therapiemöglichkeiten zu erarbeiten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Adipositas, speziell die früh manifeste Adipositas, stellt nicht nur für den Patienten eine gesundheitliche und soziale Belastung dar, sondern spielt auch in sozioökonomischer Hinsicht für die Gemeinschaft mit allen Folgekosten eine große Rolle. Man muss davon ausgehen, dass in Deutschland je nach Alter etwa 10-18% der Kinder und Jugendlichen übergewichtig sind. Eine Adipositas liegt bei etwa 4-8% der deutschen Kinder und Jugendlichen vor.

Durch Studien der letzten Jahre gewinnt bei der Interaktion zwischen exogenen Faktoren wie Umwelteinflüssen und endogenen Faktoren wie Veranlagung mehr und mehr der genetische Aspekt an Bedeutung. Bei genomweiten Kopplungsuntersuchungen in Bezug auf Adipositas und bei Untersuchungen in Bezug auf Diabetes mellitus Typ II (NIDDM; non insulin dependent diabetes mellitus; nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus) konnte in der Chromosomenregion 2q37 das Gen *CAPN10* identifiziert und ein Diplotyp, der aus den Polymorphismen SNP-43,- 19 und -63 gebildet wird, als „high-risk"-Diplotyp für NIDDM identifiziert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass *CAPN10* mit Adipositas in Verbindung gebracht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden 166 Familien mit 166 adipösen Indexprobanden, 193 adipösen Geschwistern, sowie deren 166 Elternpaaren untersucht. Sechs Polymorphismen im *CAPN10*-Gen sowie zwei Mikrosatellitenmarker, die die Region flankieren, wurden mittels Polymerasekettenreaktion bzw. mit Hilfe eines semi-automatischen Sequenzierers typisiert. Eine Kopplungsanalyse für die Region wurde durchgeführt und die Allel- und die Haplotypfrequenzen wurden bestimmt. Die Transmissionsraten der drei Polymorphismen, die den „high-risk"-Diplotypen definieren, sowie der jeweiligen Haplotypen wurden mittels eines Pedigree–Disequilibrium-Tests errechnet. Weiterhin wurde die aus den Diplotypen der Eltern errechnete Verteilung der Diplotypen bei den Kindern mit der tatsächlich aufgetretenen Anzahl verglichen.

Bei den hier untersuchten Individuen konnte keine Kopplung der *CAPN10*-Region mit früh manifester Adipositas nachgewiesen werden. Assoziation von Allel- und Genotypfrequenzen mit früh manifester Adipositas konnte nicht nachgewiesen werden. Die Haplotypfrequenzen waren denen anderer kaukasischer Familien sehr ähnlich. Die Transmissionsraten der Haplo- und Diplotypen wich nicht signifikant von 50% ab. Insbesondere für den „high-risk"-Diplotypen 112/121 konnte keine Abhängigkeit mit früh manifester Adipositas gefunden werden.

6 ANHANG

6.1 BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHTEN POLYMORPHISMEN

Tabelle 6.1 gibt nähere Auskunft über die untersuchten Polymorphismen. Angegeben sind die absolute (in Bezug auf den Beginn des Chromosoms 2) und relative (in Bezug auf den Beginn des CAPN10-Gens) Lage, die Art der Variation, in welchem Genbereich sie liegen und die von Horikawa et al. 2000 gefundene Allelfrequenzen des jeweils häufigeren Allels.

Polymorphismus	Lage		Variation	Genbereich	Frequenz	
	absolut	relativ			Kontrollen	Patienten
SNP-118	7179	-10732	C→G	RNPEPL1	0,85	0,88
SNP-43	22762	4852	G→A	CAPN10	0,75	0,80
SNP-19	25830	7920	32 bp Repeat	CAPN10	0,57	0,58
SNP-48	29008	11098	G→A	CAPN10	0,53	0,58
SNP-63	34288	16378	C→T	CAPN10	0,77	0,77
SNP-38	61063	43153	A→C	GPR35	0,62	0,50

Tabelle 6.1: Beschreibung der untersuchten Polymorphismen im Calpain-10-Gen.
Angegeben ist die absolute Lage auf Chromosom 2 und die relative Lage ab Beginn des *CAPN10*-Gens in Nukleotiden. In den nächsten Zeilen ist die Art der Variation angegeben, gefolgt von Genbereich und Allelfrequenzen des jeweils häufigeren Allels bei Kontrollen und Patienten wie sie bei der Untersuchung von Horikawa und Mitarbeitern 2000 bei den mexikanischen Amerikanern gefunden wurden [Horikawa et al., 2000].

6.2 GENOMISCHE UMGEBUNG DES CALPAIN-10-GENS

In der folgenden Abbildung 6.1 ist schematisch die Umgebung des Caplain10-Gens auf Chromosom 2 dargestellt.

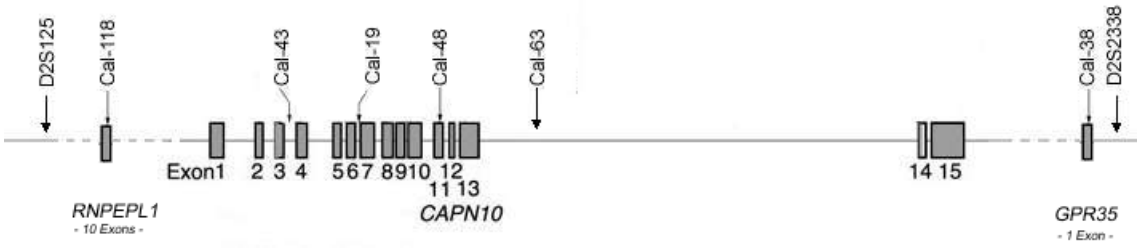


Abbildung 6.1: Aufbau und Umgebung des *CAPN10*-Gens auf Chromosom 2.
Angegeben sind die flankierenden Marker D2S125 und D2S2338, die umgebenden Gene *RNPEPL1* und *GPR35* sowie die nummerierten Exons in *CAPN10* [nach Horikawa et al., 2000].

6.3 AUSZÜGE AUS DER GENOMISCHEN STRUKTUR DER *CAPN10*-REGION

Die genomische Struktur ist im Internet in der Genbank des National Institute of Health (NIH) unter der Zugriffsnummer AF158748 zu finden (Internet-Adresse der Datenbank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Hier werden die Strukturen der Regionen um SNP-43 und SNP-48 im Calpain-10-Gen auf Chromosom 2 angegeben. SNP-43 wurde mittels der ARMS-Methode, SNP-48 mittels Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus untersucht.

6.3.1 GENOMISCHE SEQUENZ IN DER UMGEBUNG VON SNP-43

Nukleotid-Position
in Chromosom 2

o

```
21781 atatcacgct cgccttttgc ttctccctgt gcatggcagg tcattcctcc gggacagccg
21841 agctgggccg accaggagta ccgggggctcc ttcacctgtc gcatttggca gtttggacgc
21901 tgggtggagg tgaccacaga tgaccgcctg ccgtgccttg cagggagact ctgtttctcc
21961 cgctgccaga gggaggatgt gttctggctc ccctttactgg aaaaggtcta cgccaagtgc
22021 gtgtgctggg ggctgaaggg cctggcctgg ggcaagtggg agctgccact accatgggct
22081 gccccaggag ggtctctgct cactctgggc tgcagagccc ccttcagttc tgagggtctg
22141 gcagctcatt ctgtgagtca ggctgacagg ccaggtgcag agattcttct tttgggcctg
22201 tggtttgccc actccctgct ttcccttccc ttgttccaaa gcccagcgtg gagtcgttct
22261 ccacagagaa catgtgtgcc gtcctcctta ttttatcggc cccagcaaga aagatgcttc
22321 tttatatttg ttgtggaatg gttgggacag gcagactcat tgtgtagtcg ttggggagga
22381 gtgaggctac cccagcatac caacacttgt gtatcacggt gcttgctggc tcaggggacc
22441 aggaccctca ccatgagtca taattgaata gccttccctc ttagaatgca tttgtcttct
22501 tgccaaaggc aactggactg acaggcaggc agggaagctg gtgaacatgg gaaggctggc
```

Primer Cal-43c-F →

```
22561 tggtgacatc agtgcccagt gagcccttcc atcccaaggg ctgttttagg aaaagcaggg
22621 ttggagcttg agagccaagg gatgtgggca tccatagctt ccacgcctcc tgccctgctc
22681 ctgtgcccac accggatgcc agagagtttc tgtgtgtggg cagaggactg cagggcgctc
```

Primer Cal-43dR bzw. Cal-43dvar-R ←

```
22741 acgcttgctg cgaagtaagg cgtttgaagg tgaggctaag ccttgacttg gtgaggatga
22801 ggaagaaggc agaggggagt aaagaggtgg gattgaggca gcggttggac gatttggggt
22861 gctacagacc atgggaatca gagaggggcc catgctcaat gccagaggct cactcccatg
22921 gtgattgtgt cccctaggct ccatgggtcc tacgagcacc tgtgggccgg gcaggtggcg
22981 gatgccctgg tggacctgac cggcggcctg gcagaaagat ggaacctgaa gggcgtagca
23041 ggaagcggag gccagcagga caggccaggc cgctgggagc acaggacttg tcagcagctg
23101 ctccacctga aggacagtg tctgatcagc tgctgcgtgc tcagccccag agcaggtgag
23161 gcacgtggcc aacatgggag ggctgcagcc agcgtgcccc ccactgccag gcctcaggca
```

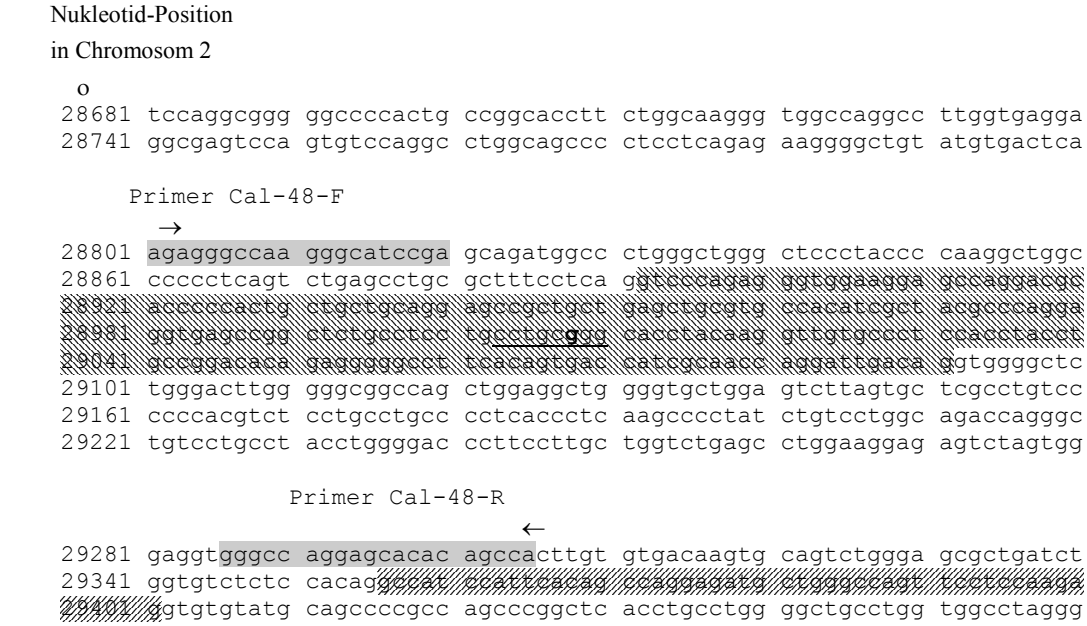
Exon 3 Exon 4

g SNP-43-Polymorphismus (G → A-Austausch)

ARMS-Primer (Cal-43c-F, Cal-43dR und Cal-43dvar-R)

Abbildung 6.2: Genomische Sequenz in der Umgebung von SNP-43

6.3.2 GENOMISCHE SEQUENZ IN DER UMGEBUNG VON SNP-48



Exon 11

Exon 12

g SNP-48-Polymorphismus (G → A-Austausch)

Primer (Cal-48-F und Cal-48-R)

Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms mit Schnittstelle (cctgca/gg wird bei "/" geschnitten, cctgcggg nicht)

Abbildung 6.3: Genomische Sequenz in der Umgebung von SNP-48

6.4 GENOMISCHE SEQUENZ DER REGIONEN UM DIE MIKROSATELLITENMARKER D2S125 UND D2S2338

Die genomischen Strukturen der Regionen um die Mikrosatellitenmarker D2S125 und D2S2338 sind im Internet in der Datenbank des National Institute of Health unter den Zugriffsnummern Z16591 und Z51342 zu finden (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

6.4.1 GENOMISCHE SEQUENZ DER REGION UM DEN MARKER D2S125

Nukleotidposition
im Chromosom 2
↓

```
   1  agctacttgg gaggctgagg tgggaggatc acttgagcct gggaggctga ggttgcagtg

                                   Primer D2S125-F
                                   →
 61  agccatgatt atactccagc ctgggcaaca gagtgagacc ctgacacaca cacacacaca

                                                          Primer D2S125-R
                                                                       ←
121  cacacacaca cacacacaca cacacatctt atttacacaa tcacaatctg gttctcagaa
181  tttagatttc ttcattttga aatgtatcta acgctttcct ttctgtttac tttcaggtcg
241  tttagattaa gtgctgagag gtgtagct
```

Primer D2S125-F und D2S125-R

Abbildung 6.4: Genomische Sequenz der Region um den Marker D2S125

6.4.2 GENOMISCHE SEQUENZ DER REGION UM DEN MARKER D2S2338

Nukleotidposition
im Chromosom 2
↓

```
                                                  Primer D2S2338-F
                                                  →
  1  agctacctga naggctgang tcagaggttc anttgantcc aggaattcaa gaccagcctg
 61  ggcaacataa aangaccccc atctcaaaca cacacacaca cacacacaca cacacatatg
121  cacacacaca catgcacaca cacgtgcaca cacacacatg cacacacaca cacacacaaa

                                   Primer D2S2338-R
                                                ←
181  caccttagta gcaataagca cactgagcac tcaaatactt gttttgaaca ccatttccaa
241  ttaaaggnng antttcaatt attgtttttc tcaactgtta tctattgcct cgggcagcaa
301  caactaaagc ctttggctat aagtgttttc cacaaacact ccctgcgtaa gt
```

Primer D2S2338-F und D2S2338-R

Abbildung 6.5: Genomische Sequenz der Region um den Marker D2S2338

6.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb	Abbildung
aqua (bi)dest.	aqua (bi)destillata
ARMS	amplification refractory mutation system; allelspezifische Polymerase-Kettenreaktion
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cM	Centi-Morgan
Da	Dalton
et al.	und andere
Fa.	Firma
G	Guanin
h	Stunde
k	Kilo
K	Kalium
kb	Kilobasen
kcal	Kilokalorien
l	Liter
M	mol pro Liter
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
Mol	Mol
NIDDM	non insulin dependent diabetes mellitus; nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDT	Pedigree-Disequilibrium-Test
s.	siehe
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
TDT	Transmissions-Disäquilibrium-Test
U	Uracil
V	Volt
W	Watt

6.6 LITERATURVERZEICHNIS

Abel L, Müller-Myhsok B. Robustness and power of the maximum-likelihood-binomial and maximum-likelihood-score methods, in multipoint linkage analysis of affected-sibship data. *American Journal Of Human Genetics* **1998**; 63: 638-647

Alberts B, Bray D, Lewis J, Ruff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle. *VCH Weinheim* **1996**; 2. Auflage

Anders HJ, Rosenbauer J, Matiaske B. Repräsentative Verzehrstudie in der Bundesrepublik Deutschland inkl. West-Berlin. *Schriftenreihe der AGEV, Bd. 8. Umschau Verlag. Frankfurt* **1990**

Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **2000**; 106: R69-R73

Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* **2000**; 404(6778): 644-651.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nature Reviews. Genetics.* **2005**; 6: 221-234

Böddeker I, Ziegler A. Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **2000**; 125:810-815.

Bouchard und Pérusse. Genetic aspects of obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1993**; 699: 26-35

Bray GA, Bouchard C, James WPT (Hrsg). *Handbook of obesity*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Honkong **1997**

Bray GA, Tartaglia LA. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* **2000**; 404: 672-677

Bultmann SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* **1992**; 71: 1195-1204.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *New England Journal of Medicine* **2003**; 348: 1625–1638

Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstrale M. Variation in the calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2004**; 89 7: 3601-3605

Carlsson E, Poulsen P, Storgaard H, Almgren P, Ling C, Jensen CB, Madsbad S, Groop L, Vaag A, Ridderstrale M. Genetic and nongenetic regulation of CAPN10 mRNA expression in skeletal muscle. *Diabetes* **2005**; 54: 3015-3020

Cassell PG, Jackson AE, North BV, Evans JC, Syndercombe-Court D, Phillips C, Ramachandran A, Snehalatha C, Gelding SV, Vijayaravaghan S, Curtis D, Hitman GA. Haplotype combinations of calpain 10 gene polymorphisms associate with increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in South Indians. *Diabetes* **2002**; 51: 1622-1628

Cernerud L. Height and body mass index of seven-year-old Stockholm schoolchildren from 1940 to 1990. *Acta Paediatrica* **1993;** 82(3): 304-305

Chagnon YC, Pérusse L, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C. The human obesity map: the 1999 update. *Obesity Research* **2000**; 8(1); 89-117

Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, Wareham NJ, Yeo GS, Bhattacharyya S, Froguel P, White A, Farooqi IS, O'Rahilly S. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Human Molecular Genetic*, **2002**; 11(17): 1997-2004.

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* **1994**; 17: 961-969.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. 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

Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **1998**; 392;398-401

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Annals of Internal Medicine* **1995**; 122: 481-486.

Cole TJ. The LMS method for constructing normalized growth standards. *European Journal of Clinical Nutrition* **1990**;44(1):45-60**.**

Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* **1973**; 9(4): 294-298.

Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, Mitchell BD, Mahaney MC, Dyer TD, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nature Genetics* **1997**; 15: 273-276

Comuzzie AG, Williams JT, Martin LJ, Blangero J. Searching for genes underlying normal variation in human adiposity. *Journal of Molecular Medicine* **2001**; 79: 57-70

Conn JJ, Jacobs HS, Conway GS. The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology (Oxford)* **2000**; 52:81-86

Considine RV. Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med* **2005**; 5(1): 15-24.

Cooke DW, Patel YM. GLUT4 expression in 3T3-L1 adipocytes is repressed by proteasome inhibition, but not by inhibition of calpains. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2005**; 232: 37-45

Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, Concannon P, Hanis CL, Bell GI, Kong A. Loci on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nature Genetics* **1999**; 21: 213-215

Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Manaka H, Kato T. Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2002**; 56(2):147-152

Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **1996**; 380: 152-154

Donahue LR, Beamer WG. Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *Journal of Endocrinology* **1993**; 136(1): 91-104.

Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrinology Review* **1997**; 18: 774-800

Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* **1999**; 22: 141-146

Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocrinology Review* **1995**; 16: 322-353

Ehrmann DA, Schwarz PEH, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2002**; 87: 1669- 1673

Ehrmann DA. Relation of functional ovarian hyperandrogenism to noninsulin dependent diabetes mellitus. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology.***1997**; 11: 335-347

Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, Hanis CL, Hasstedt SJ. Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2002**; 87: 650-654

Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M, Levy JC, O'Rahilly S, Rao PV, Bennett AJ, Jones EC, Menzel S, Prestwich P, Simecek N, Wishart M, Dhillon R, Fletcher C, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Ellard S, McCarthy MI, Hattersley AT. Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *American Journal Of Human Genetics* **2001**; 69(3): 544-552

Fabsitz RR, Carmelli D, Hewitt JK. Evidence for independent genetic influences on obesity in middle age. *International Journal Of Obesity and Related Metabolic Disorders* **1992**; 16: 576-666.

Farooqi IS, O'Rahilly S. New advances in the genetics of early onset obesity. International Journal of Obesity **2005**; 29(10): 1149- 1152.

Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM,Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TT, Buchanan TA, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS. Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. *Diabetes* **2002**; 51: 1644-1648

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000. *JAMA* **2002**; 288: 1723–1727

Fontaine KR, Barofsky I. Obesity and health-related quality of life. *Obesity Reviews* **2001**; 2: 173-182.

Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* **2003**; 289: 187–193

Francke S, Manraj M, Lacquemant C, Lecoeur C, Lepretre F, Passa P, Hebe A, Corset L, Yan SL, Lahmidi S, Jankee S, Gunness TK, Ramjuttun US, Balgobin V, Dina C, Froguel P. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. *Human Molecular Genetic* **2001**; 10(24): 2751-2765

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **1998**; 395: 763-770

Friedman JM. A war on obesity, not the obese. *Science* **2003**; 299: 856–858

Fullerton SM, Bartoszewicz A, Ybazeta G, Horikawa Y, Bell GI, Kidd KK, Cox NJ, Hudson RR, Di Rienzo A. Geographic and haplotype structure of candidate type 2 diabetes-susceptibility variants at the calpain-10 locus. *American Journal Of Human Genetics* **2002**; 70: 1096-1106

Fumakoshi A, Shinozaki H, Masada M, et al. An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**; 210: 787–796.

Garant MJ, Kao WH, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL, Boerwinkle E, Shuldiner AR. SNP43 of CAPN10 and the risk of type 2 diabetes in African-Americans: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* **2002**; 51: 231-237

Garrow JS, Webster J. Quetelet's Index (W/H^2) as a measure of fatness. *International Journal Of Obesity and Related Metabolic Disorders* **1985**; 9: 147-153

Gassen, H. G.; Minol K. Gentechnik. Einführung in Prinzipien und Methoden. *Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Verlag; Jena / Stuttgart* **1996**; 4. Auflage

Ghosh S, Hauser ER, Magnuson VL, Valle T, Ally DS, Karanjawala ZE, Rayman JB, Knapp JI, Musick A, Tannenbaum J, Te C, Eldridge W und 19 andere. A large sample of Finnish diabetic sib-pairs reveals no evidence for a non-insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility locus at 2qter. *Journal of Clinical Investigation* **1998***;* 102: 704-709

Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Ruiz R, Fayez O, Galan JJ, Herreros JA, Real LM, Ruiz A. Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2003**; 88(11): 5529-5536

Gunn TM, Miller KA, He L, Hyman RW, Davis RW, Azarani A, Schlossman SF, Duke-Cohan JS, Barsh GS. The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* **1999**; 398 (6723): 152-156.

Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genetics* **1994**; 7: 246-339

Haddad L, Evans JC, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, Frayling TM, Wilkin TJ, Demaine A, Millward A, Hattersley AT, Conway G, Cox NJ, Bell GI, Franks S, McCarthy MI. Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2002**; 87: 2606-2610.

Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nature Genetics* **1998**; 20: 304-308

Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens K.J, Shephard JM, Williams SR und 21 andere. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genetics* **1996***;* 13: 161-166

Harlan WR. Epidemiology of childhood obesity. A national perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1993** 29; 699: 1-5

Hebebrand J, Friedel S, Schauble N, Geller F, Hinney A. Perspectives: molecular genetic research in human obesity. *Obesity Reviews* **2003**; 4(3): 139-146.

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. *Aktuelle Ernährungsmedizin* **1994**; 19: 259-265.

Hebebrand J, Hinney A, Klug J. Neue molekularbiologische Befunde zur Regulation des Körpergewichts. *Biospektrum* **1996**; 3; 30-32

Hebebrand J, Remschmidt H. Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Medizinische Klinik* **1995b**; 90: 403-410.

Hebebrand J, Remschmidt H. Genetische Aspekte der Adipositas. *Adipositas* **1995a**; 9: 20-24

Hebebrand J, Sommerlad C, Geller F, Görg T, Hinney A. The genetics of obesity: practical implications. *International Journal of Obesity* **2001**; 25, S10-S18

Hegele RA, Harris SB, Zinman B, Hanley AJ, Cao H. Absence of association of type 2 diabetes with CAPN10 and PC-1 polymorphisms in Oji-Cree. *Diabetes Care* **2001**; 24(8): 1498-1499

Hinney A und Hebebrand J. Neue Erkenntnisse zu genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation. *Pädiatrische Praxis* **2001**; 59: 373-379

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. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**; 83: 3737-3741

Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schafer H, Gudermann T, Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2003**; 88(9): 4258-4267.

Hinney A, Rosenkranz K, Roth H, Hebebrand J. Gene in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. *Adipositas* **1997**; 13: 6-12

Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, 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. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1999**; 84: 1483-1436

Hinney A, Ziegler A, Oeffner F, Wedewardt Ch, Vogel M, Wulftange H, Geller F, Stübing K, Siegfried W, Goldschmidt HP, Remschmidt H, Hebebrand J. Independent confirmation of a major locus for obesity on chromosome 10. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2005**; 85: 2962-2965

Hoffstedt J, Naslund E, Arner P. Calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced beta-3-adrenoceptor function in human fat cells. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2002a**; 87: 3362-3367

Hoffstedt J, Ryden M, Lofgren P, Orho-Melander M, Groop L, Arner P. Polymorphism in the Calpain 10 gene influences glucose metabolism in human fat cells. Diabetologia **2002b**; 45(2):276-282

Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* **2000**; 26: 163-175.

Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, Seino Y, Itoh M, Takeda J. Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2003**; 88: 244-247

Huebsch KA, Kudryashova E, Wooley CM, Sher RB, Seburn KL, Spencer MJ, Cox GA. Mdm muscular dystrophy: interactions with calpain 3 and a novel functional role for titin's N2A domain. *Human Molecular Genetics* **2005**;14(19): 2801-2811.

Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Nakamura T, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Yu L, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, Del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ, Bell GI. Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population. *Journal of Human Genetics* **2005**; 50: 92-98

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nature Genetics* **1997**; 16:303-306

James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obesity Research* **2001**; 4: 228S-233S

Kang ES, Nam M, Kim HJ, Kim HJ, Myoung SM, Rhee Y, Ahn CW, Cha BS, Lee HC. Haplotype combination of Calpain-10 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2006**; 17: [Epub ahead of print]

Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, Stubdal H, Theriault K, Siebert E, Chickering T, Morgenstern JP, Tartaglia LA, Lillie J. Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin. *The Journal of Biological Chemistry* **1999**; 274:24980-24986

Kellum JM, DeMaria EJ, Sugerman HJ. The surgical treatment of morbid obesity. *Current Problems in Surgery* **1998**; 35: 791-858

Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Moore KJ. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. *Cell* **1996**; 85: 281-290.

Klinke und Silbernagel. Lehrbuch der Physiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York* **1994**; 2. Auflage

Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**; 83: 3078-3082

Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama, S, Yada T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca2+ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **2003**; 52: 948-956

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* **2000**; 404:635-643

Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Geller F, Ziegler A, Geiß HC, Hesse V, v. Hippel, Jaeger U, Johnsen D, Kiess W, Korte W, Kunze D, Menner K, Müller M, Niemann-Pilatus A, Remer Th, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Hebebrand J. Perzentile für den Body Mass Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatschrift Kinderheilkunde* **2001**; 8: 807–818

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 Genetics* **1998**; 19:155-157

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *American Journal Of Human Genetics* **1996**; 58: 1347-1363

Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C,Donlon TA. Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene. *American Journal of Human Genetics* **1999**; 64: 70-76

Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* **1990**; 18: 999-1005.

Lander E und Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* **1995** 11: 241-247

Lee JH, Reed DR, Li WD, Xu W, Joo EJ, Kilker RL, Nanthakumar E, North M, Sakul H, Bell C, Price RA. Genome scan for human obesity and linkage to markers in 20q13. *American Journal of Human Genetics* **1999**; 64: 196-209

Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1999**; 84: 165-169

Logie LJ, Brown AE, Yeaman SJ, Walker M. Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells. *Molecular Genetics and Metabolism* **2005**; 85: 54-60

Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* **1994**; 371: 799-802.

Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Walker M. Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes* **2002**; 51: 247-250

Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M, Shearer TR. Characterization and expression of calpain 10: a novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**; 276(30): 28525-28531

Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavioral Genetics* **1997**; 27(4): 325-351.

Malecki MT, Moczulski DK, Klupa T, Wanic K, Cyganek K, Frey J, Sieradzki J. Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *European Journal of Endocrinology* **2002**; 146: 695-699.

Marshall C, Hitman GA, Partridge CJ, Clark A, Ma H, Shearer TR, Turner MD. Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Molecular Endocrinology* **2005**; 19(1): 213-224

Martin ER, Monks SA, Warren LL, Kaplan NL. A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test. *American Journal Of Human Genetics* **2000** 67: 146-154

McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *The Journal of the American Medical Association* **1993**; 270(18):2207-12

Micic D. Obesity in children and adolescents--a new epidemic? Consequences in adult life. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* **2001**; 14(5):1345-1352; Diskussion 1365.

Mijailovic M, Mijailovic V, Micic D. Childhood onset of obesity: does an obese child become an obese adult? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* **2001**; 14(5):1335-1338; Diskussion 1365

Mijailovic V, Micic D, Mijailovi M. Effects of childhood and adolescent obesity on morbidity in adult life. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* **2001**; 14(5)5:1339-1344; Diskussion 1365

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **1988**; 16: 1215

Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA* **2004**; 291: 1238–1245

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 humany. *Nature* **1997**; 387: 903-908

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **1987**; 155: 335-350

Must A, Strauss RS. Risks and consequences of childhood and adolescent obesity. *International Journal Of Obesity and Related Metabolic Disorders* **1999**; 23(2):S2-11

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. *Nature Genetics* **1995**; 10: 135-142.

Nagle DL, McGrail SH, Vitale J, Woolf EA, Dussault BJ Jr, DiRocco L, Holmgren L, Montagno J, Bork P, Huszar D, Fairchild-Huntress V, Ge P, Keilty J, Ebeling C, Baldini L, Gilchrist J, Burn P, Carlson GA, Moore KJ. The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* **1999**; 398(6723): 148-152.

Neel JV. Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'? *American Journal of Human Genetics* **1962**; 14: 353–362

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* **1989**; 17: 2503-2516.

Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishina PM. A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* **1996**; 380: 534-538.

O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *American Journal Of Human Genetics* **1998**; 63: 259-66

Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD. Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Amercan Journal of Human Genetics* **1999**; 64: 397-413

Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes* **2002**; 51: 2658-2664

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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1999**; 84(10): 3686-3695.

Passarge E. Taschenatlas der Genetik. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York* **1994**; 1. Auflage

Paul DS, Harmon AW, Winston CP, Patel YM. Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochemical Journal* **2003**; 15;376(Pt 3):625-632

Pérusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2004 update. *Obesity Research* **2005**; 13(3): 381-490.

Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nature Genetics* **2001**; 27(1): 121-124.

Phan LK, Lin F, LeDuc CA, Chung WK, Leibel RL. The mouse mahoganoid coat color mutation disrupts a novel C3HC4 RING domain protein. *Journal of Clinical Investigation* **2002**; 110(10): 1449-1459.

Pietilainen KH, Kaprio J, Rissanen A, Winter T, Rimpela A, Viken RJ, Rose RJ. Distribution and heritability of BMI in Finnish adolescents aged 16y and 17y: a study of 4884 twins and 2509 singletons. *International Journal Of Obesity and Related Metabolic Disorders* **1999**; 23(2): 107-115.

Poskitt E. Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). Acta Pediátrica de México **1995**; 84:961-963

Poskitt EME. Which children are at risk of obesity? *Nutrition Research* **1993**; 13:83-93

Rasmussen SK, Urhammer SA, Berglund L, Jensen JN, Hansen L, Echwald SM, Borch-Johnsen K, Horikawa Y, Mashima H, Lithell H, Cox NJ, Hansen T, Bell GI, Pedersen O. Variants within the calpain-10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to type 2 diabetes, insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians. *Diabetes* **2002**; 51: 3561-3567

Rolland-Cachera MF. Body composition during adolescence: methods, limitations and determinants. *Horm Res* **1993**; 39: 25-40.

Rüger B. Induktive Statistik. Einführung für Wirtschafts- und Sozialwissenschaftler. *3. Auflage, bei Oldenbourg,* **1996**

Sachs L. Angewandte Statistik: Planung und Auswertung; Methoden und Modelle. *Springer Verlag Berlin*, Heidelberg, New York, **1974;** 4.Auflage

Salem M, Nath J, Rexroad CE, Killefer J, Yao J. Identification and molecular characterization of the rainbow trout calpains (Capn1 and Capn2): their expression in muscle wasting during starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry and Molecular Biology* **2005**; 140(1): 63-71

Schäfer H Biomathematik für Mediziner *Skript zur Vorlesung, Universität Marburg* **1995**.

Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH. Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *American Journal of Physiology* **1999**; 277: 1144-1151.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* **2000**; 404: 661-671. Review

Seidell JC. Time trends in obesity: an epidemiological perspective. *Hormone and Metabolic Research* **1997**; 29(4): 155-158

Shore AC, Evans JC, Frayling TM, Clark PM, Lee BC, Horikawa Y, Hattersley AT, Tooke JE. Association of calpain-10 gene with microvascular function. *Diabetologia* **2002**; 45: 899-904

Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *American Journal Of Human Genetics* **1999**; 65:1501-1507

Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S. Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. *American Journal Of Human Genetics***. 2004**; 74: 208-2222

Sorimachi H, Ishiara S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochemical Journal* **1997**; 328: 721-732

Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal Of Human Genetics* **1993;** 52: 506-516

Strachan und Read. Molekulare Humangenetik. *Spektrum akademischer Verlag GmbH; Heidelberg-Berlin-Oxford* **1996**

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genetics* **1998**;18(3): 213-215.

Stumvoll M, Fritsche A, Madaus A, Stefan N, Weisser M, Machicao F, Haring H. Functional significance of the UCSNP-43 polymorphism in the CAPN10 gene for proinsulin processing and insulin secretion in nondiabetic Germans. *Diabetes* **2001**; 50(9): 2161-2163

Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *New England Journal of Medicine* **1990**; 322: 1483-1487

Tao YX, Segaloff DL. Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity. *Endocrinology* **2003**; 144(10): 4544-4551.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J und andere. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **1995**; 83: 1263-1271

Troiano RP, Flegal KM, Kuczmarski RJ, Campbell SM, Johnson CL. Overweight prevalence and trends for children and adolescents. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1963 to 1991. *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine* **1995**; 149(10): 1085-1091

Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, Kaushal R, Wolujewicz M, McGarvey ST, Tufa J, Viali S, Deka R. Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association. *American Journal Of Human Genetics* **2001**; 69(6): 1236-1244

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genetics* **1998**; 20; 113-114

Vlietinck R, Derom R, Neale MC, Maes H, van Loon H, Derom C, Thiery M. Genetic and environmental variation in the birth weight of twins. *Behavioral Genetics* **1989**; 19: 151-161

Wauters M, Mertens I, Considine R, De Leeuw I, Van Gaal L. Are leptin levels dependent on body fat distribution in obese men and women? *Eating and Weight Disorders* **1998**; 3(3): 124-130.

Weedon MN, Schwarz PE, Horikawa Y, Iwasaki N, Illig T, Holle R, Rathmann W, Selisko T, Schulze J, Owen KR, Evans J, Del Bosque-Plata L, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Bell GI, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. *American Journal Of Human Genetics***. 2003**; 73: 1208-1212

Weiss KM; Terwilliger JD. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nature Genetics* **2000**; 26: 151–157

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *WHO Technical Report Series* 894, Genf: **2000**.

Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Human Molecular Genetic* **1995**; 4(2): 223-230.

Wu B, Takahashi J, Fu M, Cheng H, Matsumura S, Taniguchi H. Variants of calpain-10 gene and its association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2005**; 68: 155-161

Xiang K, Fang Q, Zheng T, Jia W, Wang Y, Zhang R, Li J, Shen K. [The impact of calpain-10 gene combined-SNP variation on type 2 diabetes mellitus and its related metabolic traits.] *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **2001**; 18: 426-430

Yang X, Pratley RE, Baier LJ, Horikawa Y, Bell GI, Bogardus C, Permana PA. Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript level is due to a cumulative decrease in major isoforms. *Molecular Genetics and Metabolism* **2001**; 73(1):111-113

Yeo GSH, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genetics* **1998**; 20: 111-112

Zhang F, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **1994**; 372: 425-432

6.7 LEBENSLAUF

Persönliche Daten	
Name	Benjamin Antwerpen
Geburtsdatum	18.05.1974
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Schulausbildung	
1980-1984	Grundschule in Todtnau
1984-1993	Gymnasium in Schönau
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	
1993-1994	Zivildienst im St. Josef-Krankenhaus Freiburg
Ausbildung	
April 1996-März 2002	Studium der Medizin, Philipps-Universität Marburg/Lahn
April 1998	Physikum
März 1999	Erstes Staatsexamen
Famulaturen	1. Innere Medizin, St. Bonifatius-Hospital Lingen (Ems) 2. Anästhesie, St. Josef-Krankenhaus Freiburg 3. Herz- und Thoraxchirurgie, AKH Wien 4. Allgemeine Psychiatrie, AKH Wien 5. Praxis Frau Dr. Goecke-Dommers, Fachärztin für Innere Medizin, Marburg
April 1999-März 2000	Studium an der Universität Wien
Oktober 2000-Juni 2001	Praktischer Teil der Promotion in der Klinischen Forschergruppe
März 2002	Zweites Staatsexamen
April 2002-Februar 2003	Praktisches Jahr: 1. Tertial: Chirurgie, Inselspital Bern 2. Tertial: Anästhesie, St. Joseph-Stift Bremen 3. Tertial: Innere Medizin, St. Joseph-Stift Bremen
Mai 2003	Drittes Staatsexamen
August 2003-September 2004	Angestellt als Arzt im Praktikum, Abteilung für Anästhesie, Klinikum im Friedrichshain Berlin
Seit Oktober 2004	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie, Klinikum im Friedrichshain Berlin

Berlin, 24. Mai 2006

6.8 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer sind nachfolgende Damen und Herren, denen ich zu Dank verpflichtet bin:

Arnold[1], Aumüller[1], Barth[1], Basler[1], Baum[1], Beato[1], Bögemann[4], Candinas[3], Çetin[1], Christiansen[1], Daut[1], Doss[1], Egger[3], Feuser[1], Flechtenmacher[4], Fruhstorfer[1], Geller [1], Gemsa[1], Geus[1], Glinz[4], Gloor[3], Göke[1], Görg[1], Gotzen[1], Grimm[1], Grimm[2], Grzeschik[1], Gudermann[1], Habermehl[1], Happle[1], Hasilik[1], Hebebrand[1], Hinney[1], Holzinger[3], Husslein[2], Jaeger[4], Kalbfleisch[1], Kasper[2], Katschnig[2], Kern[1], Klenk[1], Klose[1], Koch[1], Koolman[1], Kretschmer[1], Krieg[1], Kunz[1], Lang[1], Lange[1], Lennartz[1], Leppek[1], Maisch[1], Martin[1], Moll[1], Moosdorf[1], Müller[1], Neubauer[1], Oertel[1], Peter[1], Remschmidt[1], Richter[1], Roggo[3], Röhm[1], Rothmund[1], Schachtschabel[1], Schäfer[1], Schlesinger[4], Schmid[3], Schneider[1], Schneyer[1], Schulte-Körne[1], Schulz[1], Seiler[3], Seitz[1], Slenczka[1], Slotwinski[4], Sommer[1], Steininger[1], Teyssen[4], Urbanek[2], Victor[4], Vohland[1], Voigt[1], von Wichert[1], Wagner[1], Wagner[3], Weihe[1], Werner[1], Westermann[1], Ziegler [1]

[1] in Marburg

[2] in Wien

[3] in Bern

[4] in Bremen

6.9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all denjenigen, die es mir durch ihre Hilfe ermöglicht haben, meine Dissertation an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. J. Hebebrand und Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt erfolgreich anzufertigen.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. J. Hebebrand, dem ehemaligen Leiter der Klinischen Forschergruppe, jetzt Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie an der Universität Duisburg-Essen, für die Bereitstellung des aktuellen Themas und für die gute und intensive Betreuung.

Dr. Anke Hinney danke ich ganz besonders herzlich für das immer gute Arbeitsklima und für die kontinuierliche und äußerst geduldige Betreuung und Beratung auch über die Zeit der praktischen Arbeit hinaus.

Prof. Dr. A. Ziegler, Prof. Dr. H. Schäfer und Dipl.-Stat. F. Geller danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung für diese Arbeit.

Während meiner Arbeit im Labor standen mir Anne, Gudrun, Elke und allen voran Gerti mit ihrer Erfahrung immer bei. Meinen Mitdoktorandinnen Anne Hoch und Constanze Vogel danke ich für die äußerst gute und amüsante Zusammenarbeit, besonders Anne. Weiterhin danke ich natürlich auch allen hier nicht namentlich genannten Mitgliedern des Instituts.

Meinen Eltern Monika und Hans danke ich schon lange von tiefem Herzen für ihre ständige Unterstützung in Ausbildung und Beruf, vor allem aber überhaupt im Leben. Ich hoffe aber doch schwer, dass sie das schon wissen.

Insbesondere möchte ich allen beteiligten Patientinnen und Patienten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, meinen Dank aussprechen.

Die Forschungsaktivitäten der Klinischen Forschergruppe werden von der Deutschen Forschergemeinschaft mitfinanziert. Danke.

6.10 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

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

Analyse von sechs Polymorphismen und zwei Mikrosatelliten im Calpain-10-Gen bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, ihren adipösen Geschwistern und ihren Eltern

in der Klinischen Forschergruppe der Klinik Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Hebebrand mit Unterstützung durch Frau 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 Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde zum Teil unter folgendem Titel und in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

No evidence for involvement of the calpain-10 gene “high-risk” haplotype combination for non-insulin-dependent diabetes mellitus in early onset obesity

Molecular Genetics and Metabolism **2002**; 76: 152-156

Berlin, im Mai 2006 Benjamin Antwerpen