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

Klinische Forschergruppe „Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation unter
besonderer Berücksichtigung von Essstörungen und Adipositas“
Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

Hauptgeneffekt auf die Entstehung extremer Adipositas bei Kindern und Jugendlichen durch funktionell relevante Mutationen des Melanocortin 4 Rezeptor- Gens

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

Constanze Martina Vogel
aus Frankfurt am Main

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps- Universität Marburg am

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. Maisch
Referent:	Prof. Dr. Hebebrand
Korreferent:	HD Dr. Rieder

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung **S.1**

1.1. Adipositas S.1

1.1.1. Klassifikation S.1

1.1.2. Epidemiologie S.2

1.1.3. Ätiologie S.2

1.1.4. Therapieansätze S.3

1.1.5. Syndromale Formen der Adipositas S.3

1.2. Zwillings- und Familienstudien S.3

1.3. „Thifty Genotype“ S.4

1.4. Regulation des Energiehaushaltes S.5

1.5. Monogene Formen der Adipositas bei der Maus und beim Menschen S.9

1.5.1. Übersicht S.9

1.5.2. Mausmodelle und ihre menschlichen Korrelate S.10

1.5.3. Weitere genetische Ansätze S.15

1.6. Das Melanocortin-System S.16

1.6.1. Übersicht S.16

1.6.2. Der Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R) S.17

1.6.3. Häufigkeit und Verteilung von *MC4R* Varianten S.18

1.7. Assoziations- und Kopplungsphänomen und statistische Ansatzpunkte S.28

1.8. Ziel der Arbeit S.29

2. Probandenkollektiv, Material und Methoden **S.30**

2.1. Untersuchungsmaterial und Probendenkollektiv S.30

2.1.1. Untersuchungsgut S.30

2.1.2. Rekrutierung der Probanden S.30

2.1.3. Beschreibung der Studiengruppen S.31

2.2. Verwendete Chemikalien und Geräte S.32

2.2.1. Spezielle Chemikalien S.32

2.2.2. Groß- und Kleingeräte S.33

2.3. Spezielle Methoden S.35

2.3.1. Gewinnung und Aufarbeitung der DNA-Proben S.35
2.3.1.1. Isolierung der genomischen DNA S.35
2.3.1.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung S.37
2.3.1.3. Verdünnung der DNA S.38
2.3.1.4. Herstellung von DNA-Mikrotiterplatten S.38
2.3.2. Amplifizierung der DNA S.38
2.3.2.1. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) S.38
2.3.2.2. Optimierung der PCR S.41
2.3.2.3. Reagenzien der PCR S.42
2.3.2.4. Standard-Primer der PCR S.43
2.3.2.5. Hybridisierungstemperatur der PCR S.44
2.3.2.6. Trennung des Vor- und Nach-PCR-Bereiches S.45
2.3.3. Gel-Elektrophorese S.45
2.3.3.1. Herstellung des Agarose-Gels S.45
2.3.3.2. Durchführung der Gel-Elektrophorese S.46
2.3.4. Restriktionsenzymverdau der DNA S.47
2.3.5. Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) S.48
2.3.5.1. Prinzip der SSCP S.48
2.3.5.2. Materialien und Durchführung der SSCP S.48
2.3.5.3. Färben und Trocknen des SSCP-Gels S.50
2.3.6. DNA-Sequenzanalyse S.51
2.3.6.1.Prinzip der Sequenzanalyse S.51
2.3.6.2. Durchführung der Sequenzanalyse S.51
2.3.6.3. Materialien der Sequenzanalyse S.52
2.3.6.4. Detektion von Mutationen und Polymorphismen mit dem DHPLC- System S.55
2.3.7.1. Prinzip des DHPLC S.55
2.3.7.2. Durchführung des DHPLC S.57
2.3.7. Statistische Analysen S.58
2.4. Zur Entstehung der Arbeit S.60

3. Ergebnisse **S.61**

3.1. Übersicht S.61

3.2. Mutationen des *MC4R* bei Indexpatienten S.64

3.3. Polymorphismen im *MC4R* S.83

3.4. Mutationen und Polymorphismen des *MC4R* bei Eltern der Indexpatienten S.86

3.5. Der Transmissions-Disequilibrium-Test S.88

4. Diskussion **S.91**

4.1. Detektierte Sequenzveränderungen des *MC4R* S.91

4.2. TDT und Auswirkungen der *MC4R* Mutationen S.94

4.3. Polymorphismen des *MC4R* S.97

4.4. Geschlechtsspezifische Auswertung S.98

4.5. Die Beteiligung des Melanocortin-Sytems an der Entstehung von Adipositas S.98

4.6. Phänotypische Effekte der *MC4R* Mutationen S.101

4.7. Prävalenz der *MC4R* Mutationen S.103

4.8. Wahl des Probandenkollektivs S.104

4.9. Ausblick S.105

5. Zusammenfassung **S.106**

Referenzen **S.107**

Anhang **S.120**

1. Einleitung

1.1. Adipositas

1.1.1. Klassifikation

Adipositas, auch extremes Übergewicht, ist ein aufgrund einer positiven Energiebilanz entstandenes Zuviel an Fettgewebe (Classen *et al.*, 1998). Eine Maßgröße für Adipositas stellt der Body Mass Index dar, der sich aus der Formel:

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

errechnet. Da der BMI mit 0,6 – 0,8 kg/m^2 relativ hoch mit dem Körpergewicht und mit ca. – 0,15 relativ niedrig mit der Körperhöhe korreliert (Gray *et al*., 1989; Rolland-Cachera *et al*., 1988; Watson *et al*., 1979), wird er häufig zur Abgrenzung von Unter-, Normal- und Übergewicht herangezogen. Die Weltgesundheitsorganisation WHO (1998) teilt die Gewichtsklassen beim Menschen in folgende Kategorien ein:

BMI Bereich (kg/m^2)	Klassifikation
BMI = 18,5 – 24,9	Normalgewicht
BMI = 25,0 – 29,9	Übergewicht
BMI = 30,0 – 34,9	Adipositas Grad I
BMI = 35,0 – 39,9	Adipositas Grad II
BMI > 40	Adipositas Grad III

***Tab.1.1.*: Einteilung des Body Mass Index nach der WHO (1998)**

Da der Body Mass Index jedoch entwicklungsabhängigen Schwankungen im Laufe des Lebens unterliegt, ist eine Bewertung des BMI nach alters- und geschlechtsabhängigen Perzentilen zu bevorzugen (Hebebrand *et al*., 1994; Anders *et al*., 1990). Zur Erfassung des Körperfettanteils werden Meßmethoden wie z.B. Hautfaltendickemessung, bioelektrische Impedanzmessung, Sonographie oder CT angewandt (Hebebrand *et al*., 1995). Die Fettgewebsverteilung wird mit Hilfe der waist-to-hip-ratio (Taillenumfang :

Hüftumfang) erfasst. Bei vorwiegenden Fettdepots (waist-to-hip-ratio bei Frauen > 0,85; bei Männern > 1,0 (WHO 1998)) besteht ein höheres Risiko für Folgeerkrankungen (Classen *et al*., 1998).

1.1.2. Epidemiologie

Nach Zahlen des Bundesgesundheitsamtes (Bundesgesundheitsamt 1994) wird davon ausgegangen, dass in Deutschland jeder zweite Erwachsene einen BMI von über 25 kg/m^2 hat. Die Prävalenz der Adipositas (BMI > 30 kg/m^2) wird auf 20% geschätzt. Aufgrund ihrer Häufigkeit stellt die Adipositas in der westlichen Gesellschaft ein sehr großes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar. Sie ist ein Risikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen wie Hypertonie, Gicht, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, und die damit verbundenen Gefäßerkrankungen wie Ateriosklerose. Auch ist sie mit verschiedenen Malignomen assoziiert (Burton *et al*., 1985). Nach der WHO steigt die Mortalität bei Personen mit einem BMI > 30 kg/m^2 gegenüber einem Normalgewichtigen deutlich an (WHO 1995).
Schätzungen zufolge betragen die durch Adipositas entstehenden Kosten in westlichen Kulturen etwa 2-7% der Kosten des jeweiligen Gesundheitssystems (Seidell *et al*., 1996). Nach einer Analyse des Bundesgesundheitsamtes betrugen die alleinigen Kosten der Adipositas ohne deren Komorbiditäten 1993 in Deutschland etwa 850 Millionen DM (BGA, 1994). Berücksichtigt man die Folgeerkrankungen und die steigende Prävalenz der Fettleibigkeit, so dürfte dieser Betrag heute bereits weitaus höher sein.

1.1.3. Ätiologie

Bei der Adipositas handelt sich, bis auf seltene Ausnahmen, um ein multifaktoriell entstandenes Erscheinungsbild, an dessen Entstehung und Verlauf genetische und psychologische Faktoren sowie Umwelteinflüsse eine Rolle spielen können. Erkenntnisse über die genetischen Ursachen von Fettleibigkeit haben in den letzten Jahren enorm zugenommen und ihnen wird immer mehr an Bedeutung beigemessen. Die Rolle der Erbanlagen bei der Entstehung der Adipositas wird vor allem bei entwicklungsgeschichtlicher Betrachtung deutlich. Erbanlagen, die mit einer vermehrten

Nahrungsaufnahme, einem verminderten Energieumsatz oder einer verbesserten Energiespeicherung in Form von Körperfett einhergehen, stellen in Zeiten limitierter Nahrungsressourcen einen Selektionsvorteil dar und konnten so genetisch fixiert werden. Dies wird auch als Theorie des „thrifty genotype“ bezeichnet (Neel *et al*., 1962 und 1998, siehe unten). Erst bei dem in der heutigen Zeit ständigen Nahrungsangebot in einigen Erdregionen können sich diese Erbanlagen als ungünstig für Gesundheit und Überleben erweisen (Deutsche Adipositasgesellschaft, 1998).

1.1.4. Therapieansätze

Die Adipositas kann gegenwärtig nach verschiedenen Ansätzen therapiert werden. Von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung wird eine kalorienreduzierte Mischkost empfohlen (DGE, 1991), auch vermehrte körperliche Aktivität (Wirth *et al*., 1998) und Verhaltenstherapie (Levitz *et al*., 1974) wirken sich vermutlich positiv auf den Gewichtsverlust aus. Ein weiterer Ansatz ist die Pharmakotherapie mit Substanzen, die im zentralen Nervensystem als Appetitzügler oder im Darm als Assimilationshemmer wirken (Weintraub *et al*., 1991; Sjöström *et al*., 1998). Als operative Maßnahme werden heute vor allem die vertikale Gastroplastik und das anpassbare Magenband verwendet (Schumpelick *et al*., 2000).

1.1.5. Syndromale Formen der Adipositas

Syndromale Adipositas ist bei bestimmten monogenen oder chromosomalen Störungen wie beispielsweise dem Prader-Labhart-Willi-Fanconi-Syndrom (Prader *et al*., 1956) zu finden. Syndrome dieser Art kommen in der Bevölkerung sehr selten vor (1:100.000 bzw. 1:20.000; Classen *et al*., 1998), sie zeigen aber, dass massives Übergewicht eine Folge von veränderten Genen sein kann.

1.2. Zwillings- und Familienstudien

Wie wichtig die Rolle der genetischen Faktoren bezüglich des Körpergewichtes ist, zeigen Untersuchungen mit Zwillingen, die in gemeinsamer oder unterschiedlicher

Umgebung aufgewachsen sind. Stunkard und Mitarbeiter legen nahe, dass gemeinsames Aufwachsen keinen oder nur geringen Einfluss auf den BMI hat (Stunkard *et al*., 1986 und 1990). Sie schreiben den genetischen Faktoren etwa 60- 80% der Varianz des BMI zu. Bouchard und Mitarbeiter (1990) untersuchten erbliche Effekte einer Gewichtszunahme bei Überernährung . Dabei wurden monozygote Zwillingspaare über etwa drei Monate mit einer Diät ernährt, die 1000 Kalorien über ihrem individuellen Kalorienbedarf lag. In dieser Zeit nahmen die Probanden unterschiedlich viel an Gewicht zu, wobei die Gewichtszunahme innerhalb der Zwillingspaare signifikant ähnlicher war als zwischen Probanden verschiedener Paare.
Eine Familienstudie von Moll und Mitarbeitern (1991) zeigte, dass 75 % der Varianz des BMI genetisch bestimmt sind. Nach den Ergebnissen von weiteren Familienuntersuchungen (Bouchard *et al*., 1993) liegen die Eltern-Kind BMI-Korrelationen für den BMI bei etwa 0,1 bis 0,2 kg/m^2 und die BMI-Korrelation zwischen leiblichen Geschwistern bei etwa 0,2 bis 0,4 kg/m^2.

1.3. „Thrifty Genotype“

Die Mehrzahl der bisher erstellten Segregationsanalysen zeigen Hinweise für einen Hauptgeneffekt auf den BMI (Moll *et al*., 1991; Sorensen *et al*., 1989; Stunkard *et al*., 1986). Warum genetische Veränderungen, welche ein Individuum für Übergewicht prädisponieren, häufig vorkommen, versucht das Modell der „thrifty genes“ zu erklären (Neel *et al*., 1962). Populationsstudien an Pima-Indianern zeigten, dass Menschen dieser Bevölkerungsgruppe, die in den USA leben, um durchschnittlich über 20 kg schwerer sind als solche, die in Mexiko leben (Ravussin *et al*., 1995). Der Gedanke liegt nahe, dass eine genetische Prädisposition zur Fettleibigkeit erst bei entsprechenden Umweltbedingungen zum Ausdruck kommt. Eine Erklärung dafür bietet die Hypothese des „Thrifty Genotype“. Diese „sparsamen Gene“, die ein Lebewesen zur Speicherung von Energie in Form von Körperfett verhelfen, waren in der Evolution bei Nahrungsmittelknappheit von Vorteil. Auch bei dem heutigen Nahrungsangebot in der westlichen Welt zeigen diese Gene ihren Effekt.
Entscheidend für die vorteilhaften Eigenschaften dieser Gene ist jedoch die Abwesenheit von schwerwiegenden Effekten, welche den Organismus beeinträchtigen. Krankheit, stark eingeschränkte Lebenserwartung oder Beeinträchtigung der Fertilität

stellen für Träger der verantwortlichen Gene einen selektiven Nachteil dar (Neel *et al*., 1962).

1.4. Regulation des Energiehaushaltes

Im folgenden werden im Überblick die Mechanismen der Körpergewichtsregulation beschrieben. Die heutigen Erkenntnisse darüber stützen sich vor allem auf molekularbiologische Untersuchungen und Tiermodelle, die im Anschluss erläutert werden.

Das Körpergewicht wird reguliert durch Energieaufnahme in Form von Nahrung und Energieverbrauch in Form von Stoffwechselvorgängen, Wärme und Bewegung. Beim Gesunden scheint der Organismus bestrebt zu sein, einen individuellen „Set-point" des Körpergewichtes beizubehalten. Wie effektiv dieses System der Homöostase funktioniert, zeigt die Beobachtung, dass ein durchschnittlicher Erwachsener im Laufe einer Lebensdekade nur eine geringe Gewichtszunahme von 100- 200 g/Jahr (Hebebrand *et al*., 1994) erfährt. In diesem Zeitraum nimmt er etwa 1 Millionen Kilokalorien auf. Angesichts der minimalen Gewichtszunahme wird deutlich, wie präzise Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch beim Gesunden aufeinander abgestimmt sind (Weigle *et al*., 1994). Jedoch ist bei adipösen Menschen, deren Gewichtsklasse über der 95. Perzentile einzuordnen ist, die altersabhängige Gewichtszunahme zusätzlich deutlich gesteigert (Hebebrand *et al*., 1994).

1978 beschrieben Coleman und Mitarbeiter das Vorhandensein eines löslichen Sättigkeitsfaktors im Blut von Mäusen (Coleman *et al*., 1978). Die Arbeitsgruppe hatte in Parabioseversuchen die Blutkreisläufe von adipösen *ob(obese)*- und *db(diabetes)*-Mäusen und normalgewichtigen Mäusen gekoppelt und eine Gewichtsabnahme der *ob*-Mäuse beobachtet. Die *db*-Mäuse hingegen behielten ihr Gewicht. Man vermutete, dass die Adipositas der *ob*- und der *db*-Mäuse durch Veränderungen unterschiedlicher Faktoren des gleichen Signalweges verursacht würde. Der Phänotyp der *db*-Mäuse schien einer Rezeptorveränderung, der Phänotyp der *ob*-Mäuse einer Signalfaktorveränderung zugrunde zuliegen. 1994 und 1995 wurden das der *ob*-Maus fehlende Hormon Leptin (Zhang *et al*., 1994) und sein Rezeptor (Tartaglia *et al*., 1995), welcher der *db*-Maus fehlt, kloniert. In den letzten Jahren wurden viele weitere zentrale

und periphere Faktoren beschrieben, die nun ein verfeinertes Bild der Regulation des Energiehaushaltes bieten.

Im Zentralen Nervensystem (ZNS) interagieren verschiedene Signalstoffe miteinander, die für die Regulation des Körpergewichtes verantwortlich sind. Der Hypothalamus, ein Teil des Zwischenhirns, spielt dabei eine besondere Rolle. Funktionelle Defekte dieses Hirngebiets sind bei Menschen und Nagetieren mit Adipositas assoziiert (Übersicht in Bray *et al*., 1984). Nach dem heutigen Verständnis sind dabei verschiedene Kerne des Hypothalamus wie der Nucleus arcuatus, Nucleus ventromedialis und Nucleus dorsomedialis von großer Bedeutung (Satoh *et al.*, 1998).

Leptin ist ein vom Fettgewebe produziertes Hormon, dessen Serumspiegel positiv mit dem BMI und der Körperfettmasse korreliert (Considine *et al*., 1996). Bei Abnahme von Körperfett und somit Gewichtsverlust sinkt der Leptinspiegel im Blut. Dies führt zu einer verminderten Aktivierung und Signalweitergabe durch Leptinrezeptoren an Neuropeptid Y (NPY)-exprimierenden Zellen im Nucleus arcuatus des Hypothalamus und somit zu einer Steigerung der NPY-Freisetzung (Schwartz *et al*., 1996; Stephens *et al*., 1995). NPY ist ein Peptid, welches die Nahrungsaufnahme stimuliert, wie Versuche mit zentraler Injektion von NPY in das ZNS von Ratten zeigten (Stanley *et al*., 1986). Die NPY-exprimierenden Neurone sind gleichzeitig für die Produktion des Agouti-related Protein (AGRP) verantwortlich. AGRP wird bei Nahrungskarenz und sinkendem Leptinspiegel vermehrt gebildet. Es wirkt antagonistisch auf Melanocortin 3 und 4 Rezeptoren und ist ein Homolog des peripher produzierten Agouti-Proteins (Ollmann *et al*., 1997). Durch die Hemmung der zentralen Melanocortin-Rezeptoren kommt es zu vermehrter Nahrungsaufnahme, was bei Mäusen mit *MC4R* Defizienz in extremen Maße deutlich wird (Huszar *et al*., 1997).

Eine ebenfalls wichtige Rolle spielen Pro-opiomelanocortin (POMC)-produzierende Zellen im Hypothalamus. Im Gegensatz zu den NPY/AGRP-Neuronen werden sie durch verminderte Erregung ihrer Leptinrezeptoren in der POMC-Produktion gehemmt (Schwarz *et al*., 1997). POMC ist ein Vorläuferpeptid, aus dem verschiedene Spaltprodukte gebildet werden, unter anderem auch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), ß-Endorphin und alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon (α-MSH), welches eine agonistische Wirkung auf Melanocortin-Rezeptoren hat (Smith *et al*., 1988). MC4R Agonisten führen zu einer Senkung der Nahrungsaufnahme und zu einer Steigerung des Energieverbrauchs, wie die zentrale Gabe von Agonisten in das Hirnventrikelsystem von Mäusen zeigte (Patterson *et al*., 1999). Antagonisten hingegen

stimulieren die Nahrungsaufnahme, senken den Sauerstoffverbrauch und führen zu einer Körpergewichtszunahme (Fan *et al*., 1997; Kask *et al*., 1999). Bei Zunahme des Fettgewebes steigt der Leptinspiegel und die NPY/AGRP-Neurone werden in ihrer Produktion gehemmt, die POMC-Neurone stimuliert. Beides führt zu verminderter Nahrungsaufnahme. Eine Übersicht zu diesem Regelkreis gibt Abbildung 1.

Auch andere Botenstoffe scheinen in der Energiehomöostase eine Rolle zu spielen. So sind Rezeptoren für das von der Bauchspeicheldrüse abhängig vom Blutzuckerspiegel produzierte Hormon Insulin ebenfalls im Nucleus arcuatus des Hypothalamus zu finden (Baskin *et al*., 1988). Eher kurzfristig regulatorisch auf die Nahrungsaufnahme wirken Dehnungsreize des Magens und Sinneswahrnehmungen der Nahrung, sowie periphere Signalgeber wie Cholezystokinin (Gibbs *et al*., 1986). Weitere Peptide des Verdauungstraktes wie Glucagon und Glucagon-like-peptide 1 (Van Dijk und Thiele, 1999) oder Ghrelin, der natürliche Ligand des Wachstumshormon Sekretin-Rezeptors (Tschöp *et al*., 2000) geben ebenfalls Informationen an das zentrale Nervensystem weiter und können so Einfluss auf die Körpergewichtsregulation nehmen.

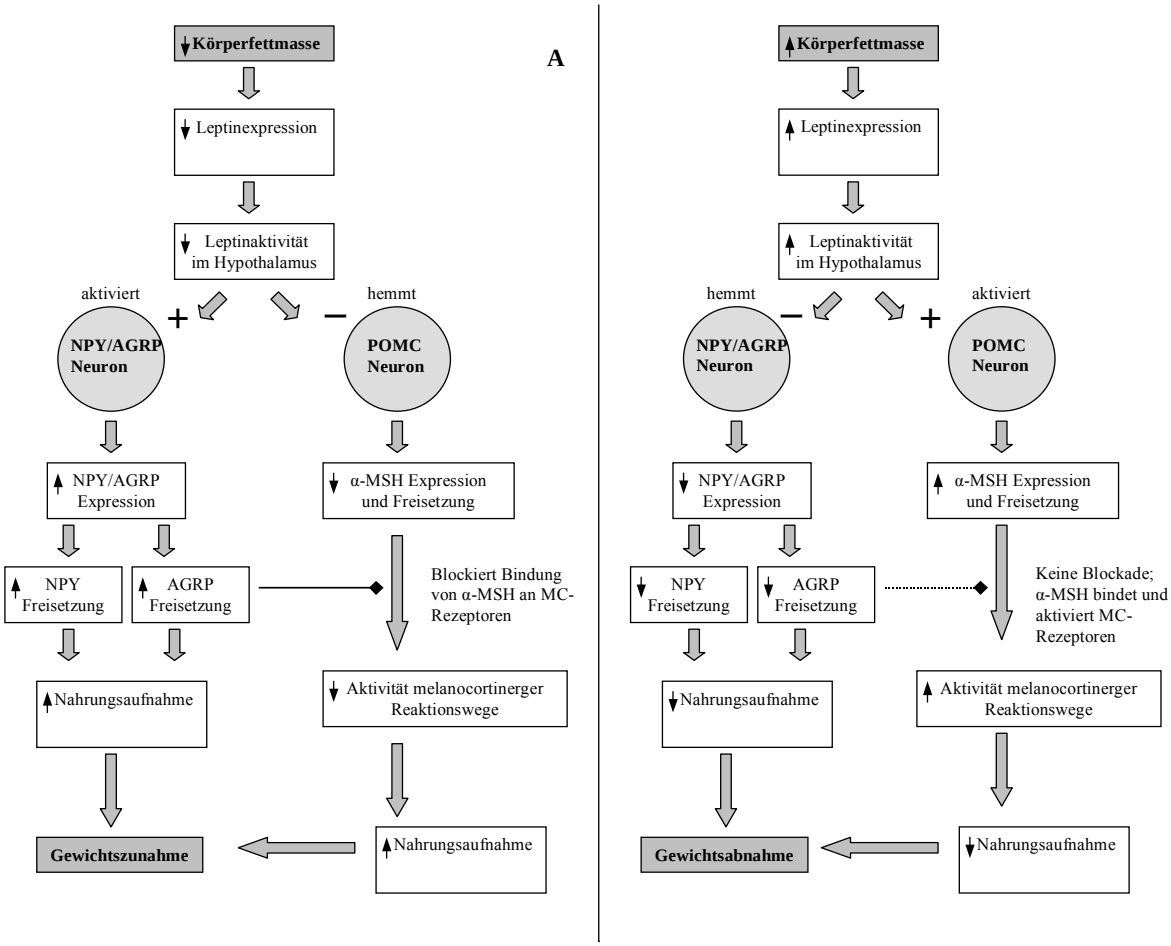


***Abbildung 1.1.*: Körpergewichtsregulation beim Menschen**

A: Regulationsmechanismen bei sinkender Körperfettmasse. NPY/AGRP-Neuronen und POMC-Neuronen befinden sich vorwiegend im Nucleus arcuatus des Hypothalamus, die in diesem Regelkreis dargestellte Hemmung der Melanocortin Rezeptoren findet im Nucleus paraventrikularis und anderen Hypothalamusgebieten statt. Durch zentrale Regulation reagiert der Körper mit Steigerung der Nahrungsaufnahme und Senkung des Energieverbrauchs (nicht dargestellt) auf Körpergewichtsverlust. **B**: Regulationsmechanismen bei steigender Körperfettmasse. Durch gesteigerte Leptinfreisetzung wird ein katabol wirkender Regelkreis eingeschlagen, der in sinkender Nahrungsaufnahme und gesteigertem Energieverbrauch (nicht dargestellt) resultiert. (Modifiziert nach Schwartz *et al*., 2000)

1.5. Monogene Formen der Adipositas bei der Maus und beim Menschen

1.5.1. Übersicht

Die Körpergewichtsregulation ist ein komplex geregeltes System, das an vielen Stellen anfällig für Störungen ist und aus dem Gleichgewicht geraten kann. Diese Beeinträchtigungen können ihre Ursache in den genetischen Informationen eines Menschen oder Tieres haben und für Adipositas prädisponieren. Besonders eindrucksvoll konnte dies anhand von Tiermodellen gezeigt werden.

Das Klonieren und die Charakterisierung der für Übergewicht relevanten Genveränderungen in Mäusen und Ratten hat wesentlich für das Verständnis der Energiehomöostase beim Nager und beim Menschen beigetragen. Das Klonieren von *obese* (*ob*) (Zhang *et al*., 1994) und *diabetes* (*db*) Genen aus Mäusen (Tartaglia *et al*.,1995) verhalf zur Entdeckung des Adipozytenhormons Leptin und seinem Rezeptor (siehe oben). Ähnliche Genmutationen sind ebenso wie Veränderungen im *POMC* und im *MC4R* auch beim Menschen bekannt. Die Identifikation des *agouti* Gens (Bultman *et al*., 1992), des *agouti-related proteins* (*AGRP*) (Fong *et al*., 1997) und deren Einbindung in Mechanismen der Gewichtsregulation trugen zur Aufklärung von neuronalen Reaktionswegen bei, die das Melanocortinsystem kennzeichnen. Außerdem fand man weitere Genmutationen, die alleine ausreichen, um in Nagern Adipositas auszulösen. Dazu gehören Mutationen im *fat* Gen (Naggert *et al*., 1995) und im *tubby* Gen (Kleyn *et al*., 1996). Tabelle 1.2. zeigt eine Übersicht der bisher bekannten Gene, die im Mausmodell für die Entstehung der Adipositas verantwortlich sind und Bedeutung für das Verständnis der Fettleibigkeit beim Menschen haben.

Gen	Genprodukt	Chromosomale Lokalisation bei der Maus	Chromosomale Lokalisation beim Menschen	Erstmalige Klonierung
ob	Leptin (monogen)	6	7q31	Zhang *et al*., 1994
db	Leptinrezeptor (monogen)	4	1p31	Tartaglia *et al*., 1995
Mc4r	Melanocortin4 – Rezeptor (Knockout-Maus)		18q22	Gantz *et al*., 1993
Pomc	Pro-opiomelanocortin (Knockout-Maus)	12	2p23	Chang *et al*., 1980
tub	Phosphodiesterase (monogen)	7	11p15	Noben-Trauth *et al*., 1996/ Kleyn *et al*., 1996
agouti	Parakriner Signalfaktor (monogen)	2	20q12-13	Bultman *et al*., 1992
fat	Carboxy-peptidase E (monogen)	8	4q32	Naggert *et al*., 1995

***Tabelle 1.2.*: Gene, in denen Mutationen im Mausmodell zu Adipositas prädisponieren (modifiziert nach Rankinen *et al*., 2002)**. Monogene Mutationen bedeuten hier spontan entstandene genetische Veränderungen, während hingegen bei Knockout-Mäusen gezielt die Expression eines Genes verhindert wird (siehe 1.4.2.8.).

1.5.2. Mausmodelle und ihre menschlichen Korrelate

Übersicht

Als Ursache für Adipositas beim Menschen sind fünf monogene Formen bekannt. Die dafür verantwortlichen Gene kodieren verschiedene Proteine im Leptinregelkreis und im Melanocortinsystem: Leptin und sein Rezeptor (Montague *et al*., 1997; Strobel *et al*., 1998; Clement *et al*., 1998), Prohormonconvertase 1 (Jackson *et al*., 1997), POMC (Krude *et al*., 1998) und MC4R (z.B. Vaisse *et al*., 1998; Yeo *et al*., 1998; Hinney *et al*., 1999; Gu *et al*., 1999 und andere). Mit Ausnahme von *MC4R* sind Mutationen in diesen Genen in der Bevölkerung sehr selten und verursachen rezessive Formen der Adipositas, die mit endokrinen Abnormalitäten assoziiert sind (siehe unten).

Leptin

Leptin zirkuliert proportional abhängig von der Körperfettmasse im Blut (Considine *et al*., 1996) und triggert durch Regulation anderer Hormone und Neurotransmitter neuronale Antworten im Gehirn, die Appetit und Energieverbrauch modulieren und die Körperfettspeicherung stabilisieren (Schwartz *et al*., 2000). Durch Kälte oder Noradrenalin wird die Expression von Leptin gesenkt (Trayhum *et al*., 1995), durch Insulin (MacDougald *et al*., 1995), Glucocorticoide (DeVos *et al*., 1995) oder fettreiche Nahrung (Murakami *et al*., 1995; Trayhum *et al*., 1995) wird die Expression gesteigert.
Leptindefiziente Mäuse (*obese; ob/ob*) haben erhöhte POMC- und erniedrigte AGRP-mRNA-Spiegel im Hypothalamus. Sie zeigen eine erniedrigte Körpertemperatur, erhöhte Glucose- und Insulinspiegel, gesteigerte Nahrungsaufnahme (Hyperphagie), Verminderung der Aktivität und des Energieverbrauchs sowie eingeschränkte Immunfunktionen und Infertilität (Coleman *et al*., 1978). Bei den *obese*-Mäusen lässt sich dieser Befund durch Leptininjektion in das ZNS wieder aufheben (Mizuno *et al*., 1998; Shutter *et al*., 1997). Leptindefizienz ist beim Menschen sehr selten zu finden und resultiert ebenfalls in Hyperphagie, Hypometabolismus und in einer Reihe von neuroendokrinen Defekten einschließlich Infertilität, sowie erhöhten Cortisol- und Insulinspiegeln (Montague *et al*., 1997 und Ahima *et al*., 1996).

Leptinrezeptor

Mutationen im Leptinrezeptor (*db/db*) bei Mäusen resultieren in einem der *ob/ob*-Maus weitgehend ähnlichen adipösen Phänotyp (Li *et al*., 1998). Die Expression eines funktionsuntüchtigen Leptinrezeptors bei diesen Tieren bedeutet trotz intakter Leptinbildung eine Leptinresistenz, was zu einer ungehemmten Nahrungsaufnahme, einem Anwachsen des Fettdepots und konsekutiv weiter ansteigender Leptinsekretion führt (Coleman *et al*., 1978). Die erhöhte Leptin-Serumkonzentration wird auch als Kompensationsversuch der Leptinresistenz interpretiert (Maffei *et al*., 1995).
Homozygote Mutationen, die einen insuffizienten Leptinrezeptor verursachen, haben beim Menschen einen Phänotyp zur Folge, der durch früh manifeste Adipositas, fehlende pubertäre Entwicklung und reduzierte Wachstumshormon- und Thyreotropinspiegel gekennzeichnet ist (Clement *et al*., 1998).

Proopiomelanocortin

Im Nucleus arcuatus des Hypothalamus induziert Leptin die Expression von Pro-opiomelanocortin (POMC). Dieses Vorläufer-Polypeptid wird weiter gespalten in Eicosanoiode, adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und α-Melanozyten stimulierendes Hormon (α-MSH), welches den Agonist der neuronal vorherrschenden Melanocortin Rezeptoren, MC3R und MC4R, darstellt (Smith *et al*., 1988).

Mäuse mit *POMC*-Defizienz sind hyperphag und adipös und zeigen ein gesteigertes Körperlängenwachstum sowie Defekte in der Nebennierenentwicklung und der Hautpigmentierung. Bei einer Behandlung der Mäuse mit einem α-MSH-Agonisten zeigen diese einen deutlichen Gewichtsverlust (Yaswen *et al*., 1999). Auch beim Menschen ist die phänotypische Manifestation dieser genetischen Veränderung ähnlich. Krude und Mitarbeiter (1998 und 2000) beschreiben insgesamt vier nicht verwandte Patienten, die homozygote bzw. gekoppelte heterozygote Defekte im *POMC* haben und ein Syndrom zeigen, das durch Mangel an ACTH, rote Haarfarbe und früh manifeste Adipositas gekennzeichnet ist. Der ACTH-Mangel verursacht Störungen in der Nebennierenrindenentwicklung. Die rote Haarfarbe hingegen basiert auf einer Pigmentierungsstörung, die durch mangelnde α-MSH Stimulation der MC1-Rezeptoren in Melanozyten zustande kommt. Die Adipositas ist beim *POMC*-defizienten Menschen Ausdruck einer fehlenden Stimulation zentraler Melanocortinrezeptoren. Ein vergleichbarer Phänotyp wird bei Mäusen durch Veränderungen im *agouti* ausgelöst (siehe unten).

Agouti

Adipositas die aus verschiedenen dominanten Allelen im *agouti*- Lokus resultiert, unterscheidet sich wesentlich von dem der leptindefizienten Mäuse (Wolff *et al*., 1986) und erinnert an *POMC*-defiziente Tiere. Der *agouti*-Lokus ist physiologisch vor allem an der Regulation der Pigmentierung beteiligt, und in verschiedenen Säugetierspezies blockiert *agouti* unter positiver Kontrolle von Melanozyten- stimulierendem Hormon (MSH) die Synthese von Eumelanin, einem braunschwarzen Pigment (Lu *et al*., 1994). Dominante Mutationen, die eine ektopische Produktion des *agouti*-Proteins zur Folge haben, wie *agouti lethal yellow* (A^Y) und *agouti viable yellow* (A^{VY}), sind bei heterozygoten Nagern für einen Phänotyp verantwortlich, der durch gelbe Fellfarbe, erhöhte Nahrungsaufnahme, Hyperinsulinämie und Adipositas gekennzeichnet ist. Die adrenergen und reproduktiven Funktionen sind bei diesen Mäusen nicht verändert

(Wolff *et al*., 1973 und 1986; Frigeri *et al*., 1983). Bei A^Y-Mäusen wurde zusätzlich gesteigertes Körperlängenwachstum festgestellt. Homozygote Agouti-Mäuse erwiesen sich als nicht lebensfähig (Michaud *et al*., 1993). Lu und Mitarbeiter (1994) beschrieben die antagonistische Wirkung von *agouti* auf MC1 und MC4 Rezeptoren *in vitro*, wärend andere MC Rezeptoren nicht in gleichem Maße auf das *agouti*-Protein ansprachen. Die grundlegende Ursache für Adipositas wird dadurch erklärt, dass nun das fälschlicherweise im Gehirn produzierte agouti-Protein gleiche Wirkung wie das dort physiologisch vorkommende Agouti-related Protein (AGRP) zeigt und so antagonistisch auf zentrale Melanocortin 4 Rezeptoren wirkt (Rossi *et al*., 1998). Vergleicht man den Phänotyp dieser Mäuse mit dem der *MC4R*-defizienten Mäuse, wird deutlich, dass die Störung im Energiestoffwechsel in beiden Fällen auf Störungen der Melanocortin-Signalkette zurückzuführen ist.

Um die Rolle von Leptin bewerten zu können und um additive Effekte zu erfassen, kreuzten Boston und Mitarbeiter (1994) *Agouti yellow* (A^Y) und *ob/ob* Mäusen zu Doppelmutationsträgern (*ob/ob* A^Y-Mäusen). Diese Tiere mit MC4R Inhibition und Leptinmangel zeigten tatsächlich einen additiven Effekt bezüglich der Gewichtszunahme und des Serum-Insulinspiegels. Durch Fehlen des Leptingens in A^Y-Mäusen zeigten diese Tieren bei exogener Gabe von Leptin eine normale Leptinsensitivität, die sonst bei *agouti yellow*- Mäusen gesenkt ist. Boston und Mitarbeiter schließen daraus, dass Adipositas bei A^Y- Mäusen nicht die Folge von Veränderungen im Lepinhaushalt ist, sondern dass die Leptinresistenz als Folge einer Desensibilisierung entsteht, die durch ständig erhöhte Leptinspiegel zustande kommt.

Agouti-related Protein

Agouti- related protein (AGRP), auch agouti- related transcript (ART) genannt, wird im Zentralen Nervensystem (ZNS) vor allem im Nucleus Arcuatus des Hypothalamus und in der Medulla oblongata exprimiert. Es ist ein Homolog des peripher produzierten *agouti*- Proteins und ein Agonist der MC3 und MC4 Rezeptoren (Fong *et al*., 1997). AGRP ist einer der wichtigsten endogenen Liganden, welche den MC4R Tonus unter Veränderungen des Energiegleichgewichtes regulieren (Harrold *et al*., 1999). Bei intracerebroventrikulärer Injektion eines AGRP-Fragmentes in gesunde Mäuse steigern diese ihre Nahrungsaufnahme (Rossi *et al*., 1998). Die meisten AGRP Neurone enthalten auch NPY (Chen *et al*., 1999). Die Expression von AGRP mRNA wird durch die Aktivierung von Leptinrezeptoren auf der Zelloberfläche gehemmt (Wilson *et al*.,

1999; Mizuno *et al*., 1999). Überexpression dieses Proteins in transgenen Mäusen führt zu einer mit *MC4R*-Defizienz vergleichbaren Adipositas (Ollmann *et al*., 1997; Graham *et al*., 1997).

Mahogany

Das *mahogany*-Genprodukt wird als rezeptorähnliches Protein mit einer transmembranären Region beschrieben (Gunn *et al*., 1999; Nagle *et al*., 1999), das eine noch nicht vollständig geklärte Rolle im Melanocortinsystem spielt. Mutationen im *mahogany*-Lokus unterdrücken die Ausprägung des adipösen Phänotyps bei *agouti*-Mäusen (Miller *et al*., 1997). Es wurde außerdem ein Effekt des *mahogany*-Proteins auf die Energiehomöostase unabhängig vom Weg über das vermehrt produzierte *agouti*-Protein beschrieben (Dinulescu *et al*., 1998).

Melanocortin 4 Rezeptor

Die Beobachtungen bezüglich POMC, AGRP sowie den *agouti*-Mäusen lassen auf die wichtige Rolle des melanocortinergen Systems bei der Regulation des Körpergewichtes schließen. Lu *et al*. (1994) beschrieben die inhibitorische Wirkung des *agouti*-Proteins auf den Melanocortin 4 Rezeptor und legten die Vermutung nahe, dass die Symptome Adipositas und Hyperphagie der *agouti*-Mäuse auf diesen Mechanismus zurückzuführen sind. Fan *et al*. (1997) applizierten Melanocortinanaloga, welche agonistisch oder antagonistisch auf MC4R und auf MC3R wirkten, intrazerebroventrikulär bei Mäusen. Dabei führte die Applikation des Agonisten (MT II) zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme und die Applikation des Antagonisten (SHU 9119) zu einer Steigerung.

Um die Bedeutung des *MC4R* bei der Körpergewichtsregulation weiter zu untersuchen, stellten Huszar und Mitarbeiter (1997) *MC4R*-defiziente Mäuse (MC4R-Knockout-Mäuse; Mc4r-/-) her. Sie beobachteten, dass adulte homozygote männliche Mutationsträger durchschnittlich 50% schwerer waren als wildtypischen Kontrollen; adulte homozygote weibliche Tiere waren sogar doppelt so schwer wie die Kontrollen. Heterozygote *Mc4r*-Mutationsträger lagen mit der Ausprägung des Körpergewichtes zwischen den wildtypischen Formen und den homozygot *MC4R*-defizienten Mäusen. Die Mc4r-/- Mäuse zeigten gesteigerte Nahrungsaufnahme, die auch nach Gabe von einem α-MSH-ähnlichem Agonisten (MT II) nicht wieder sank (Marsh *et al*., 1999). Weiterhin hatten die Tiere ein gesteigertes Körperlängenwachstum sowie erhöhte

Insulin-, Glucose- und Leptinwerte. Im Gegensatz zu *obese*- und *diabetes*-Mäusen waren bei diesen Tieren keine Corticoiderhöhungen festzustellen (Dubuc *et al*., 1975; Coleman *et al*., 1977). Bei den Mc4r-/- Mäusen zeigt sich eine spät-manifeste Adipositas. Bei noch normalgewichtigen, jungen Mc4r-/- Mäusen zeigt sich eine Teilresistenz bezüglich einer Minderung der Nahrungsaufnahme nach Leptingabe, während ältere adipöse Mutationsträger kaum auf die Gabe von Leptin ansprachen (Marsh *et al*., 1999). Für die Entstehung der Adipositas bei Mc4r-/- Mäusen ist zum einen die gesteigerte Nahrungsaufnahme, zum anderen aber auch die verminderte metabolische Umsetzungsrate von Bedeutung. Selbst bei gleicher Kalorienzufuhr wie sie gesunde Mäuse wählen, nehmen Mc4r-/- Mäuse deutlich mehr an Gewicht zu. Eine noch größere Gewichtszunahme ist bei Mc4r-/- Mäusen mit freier Futterwahl zu beobachten (Marie *et al*., 2000). Ähnlich wie bei *agouti*-defizienten (A^{VY}) Mäusen (Figeri *et al*., 1988) und bei *Mc3r*-defizienten Mäusen (Chen *et al*., 2000) ist bei diesen Tieren die kalorische Effizienz erhöht. Aus diesen Beobachtungen heraus lässt sich folgern, dass der MC4R mit seinen Liganden eine wichtige Funktion bei der Regulation des Körpergewichtes übernimmt, wobei eine Stimulation des MC4R zu einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme führt.

Gantz und Mitarbeiter klonierten 1993 den menschlichen MC4R. Seitdem wurden von vielen Arbeitsgruppen homozygote und heterozygote Mutationsträger beim Menschen beschrieben, die einen adipösen Phänotyp, jedoch kaum weitere endokrinologische Auffälligkeiten aufwiesen. Eine Übersicht zeigen Tabellen 1.3. bis 1.5.

Weitere genetische Ansätze

Neben den bereits erwähnten stehen auch andere Gene im Verdacht, bei Veränderung ein Lebewesen für Adipositas zu prädisponieren. So sind Polymorphismen bei dem Entkopplungsprotein (UCP) des braunen Fettgewebes (Nagase *et al*., 1996), dem β_3-adrenergen Rezeptor (Clement *et al*., 1995), der Na/K-ATPase (Deriaz *et al*., 1994), dem Tumornekrosefaktor (Hotamisligil *et al*., 1995) sowie der Lipoproteinlipase (Jemaa *et al*., 1995) beschrieben worden, die mit der Entstehung der Adipositas in Zusammenhang gebracht werden. Ihre Relevanz für humane Adipositas ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.6. Das melanocortinerge System

1.6.1. Übersicht

Das melanocortinerge System beinhaltet G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und ihre Antagonisten Agouti-Protein und Agouti-related Protein (AGRP) sowie die agonistisch wirkenden Melanocortinpeptide (α-, β-, γ-MSH und ACTH), welche durch posttranslationales Abspalten aus POMC abgeleitet werden (siehe oben).
Bisher wurden fünf Melanocortinrezeptoren kloniert. Der MC1R wird fast ausschließlich in Melanozyten exprimiert und beeinflusst die Fellfarbe bei Mäusen und die Haar- und Hautpigmentierung beim Menschen (Cone *et al*., 1996). Der MC2R wird vorwiegend in der Nebennierenrinde exprimiert und moduliert dort den Effekt von ACTH auf die Glucocorticoidsynthese (Weber *et al*., 1995). MC3R und MC4R werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert, vor allem in Gebieten, deren Beteiligung an der Regulation des Energiehaushaltes bekannt ist. MC3R ist im Hypothalamus und im Limbischen System lokalisiert und wird von Neuronen des Ncl. Arcuatus exprimiert, welche zum Teil auch POMC produzieren (Roselli-Rehfuss *et al*., 1993; Bagnol *et al*., 1999). MC4R scheint im Gehirn weiter verteilt zu sein und wurde vor allem in Hypothalamus, Thalamus, Cortex und Hirnstamm identifiziert (Mountjoy *et al*., 1994). Der MC5R wird zum größten Teil in exokrinen Drüsen und in der Skelettmuskulatur exprimiert (Chen *et al*., 1997). Störungen der Melanocortinrezeptoren 1,2 und 5 resultieren in abnormer Pigmentierung, Störungen in der Nebennierenfunktion bzw. in der Funktion exokriner Drüsen. Es sind jedoch keine Störungen der Energiehomöostase zu beobachten. Gezieltes Unterbrechen der MC3R Expression in Knockout-Mäusen hat eine verminderte Aktivität der Tiere und eine Zunahme der Fettmasse zur Folge (Chen *et al*., 2000). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Mäusen mit inaktiviertem *MC4R*. Diese Tiere nehmen übermäßig viel Nahrung zu sich, was bei den *MC3R* Knockout- Mäusen nicht beschrieben wird (Huszar *et al*., 1997). Die Gabe von MC3 und MC4 Rezeptor Agonisten verursachen Anorexie und Gewichtsabnahme (Benoit *et al*., 2000).

1.6.2. Der Melanocortin 4 Rezeptor

Der Melanocortin 4 Rezeptor wird von einem Gen mit einem einzigen Exon kodiert, das beim Menschen auf Chromosom 18q22 lokalisiert ist. Der Rezeptor besteht aus 332 Aminosäuren und gehört zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit sieben transmembranären Regionen (Abb. II). Bei Erregung gibt der Rezeptor die Signale durch Aktivierung von Adenylatcyclase weiter (Gantz *et al*.,1993). Der MC4R wird fast im gesamten ZNS exprimiert (siehe oben). Der natürliche Agonist des MC4R ist das alpha-Melanozyten stimulierende Hormon (α-MSH), ein Spaltprodukt des POMC (Fan *et al*., 1997), als reverser Agonist bzw. Antagonist wirkt das AGRP (Ollmann *et al*., 1997).

Die Relevanz des MC4R auch beim Menschen konnte durch verschiedene molekulargenetische Untersuchungen gezeigt werden. Krude *et al*. (1998 und 2000) beschrieben insgesamt vier nicht verwandte Patienten mit Mutationen im *POMC*, deren Phänotyp ACTH-Mangel, rote Haarfarbe und früh manifeste Adipositas umfasst (siehe Abschnitt 1.4.2.4.). Der Agonistenmangel für die Melanocortinrezeptoren wird dabei für den Phänotyp der Probanden verantwortlich gemacht. Jackson *et al*. (1997) untersuchten eine Probandin mit dem Phänotyp Adipositas, hypogonadotropem Hypogonadismus, Hypocortisolismus und erhöhten Plasmaspiegeln an Proinsulin. Als Ursache dieses Phänotyps wurden zwei Mutationen im Prohormon *Convertase 1* detektiert. Dieses Prohormon spielt als Enzym bei der posttranslationalen Proteinmodifizierung von POMC und anderen Hormonen eine Rolle (Benjannet *et al*., 1991). Bei Fehlen oder Ausfall dieses Enzyms ist auch hier ein Ligandenmangel für die MC Rezeptoren zu beobachten, welcher den Phänotyp erklären könnte.

Der MC4R ist für eine physiologische Kontrolle der Nahrungsaufnahme wichtig. MC4R selektive Agonisten verursachen dosisabhängig Hypophagie und Gewichtsverlust, während MC4R selektive inverse Agonisten das Gegenteil bewirken und die anorektische Wirkung von Leptin abschwächen. Diese Beobachtungen wurden sowohl in Menschen als auch in Mäusen gemacht (Huzar *et al*., 1997 und Cone *et al*., 2000).

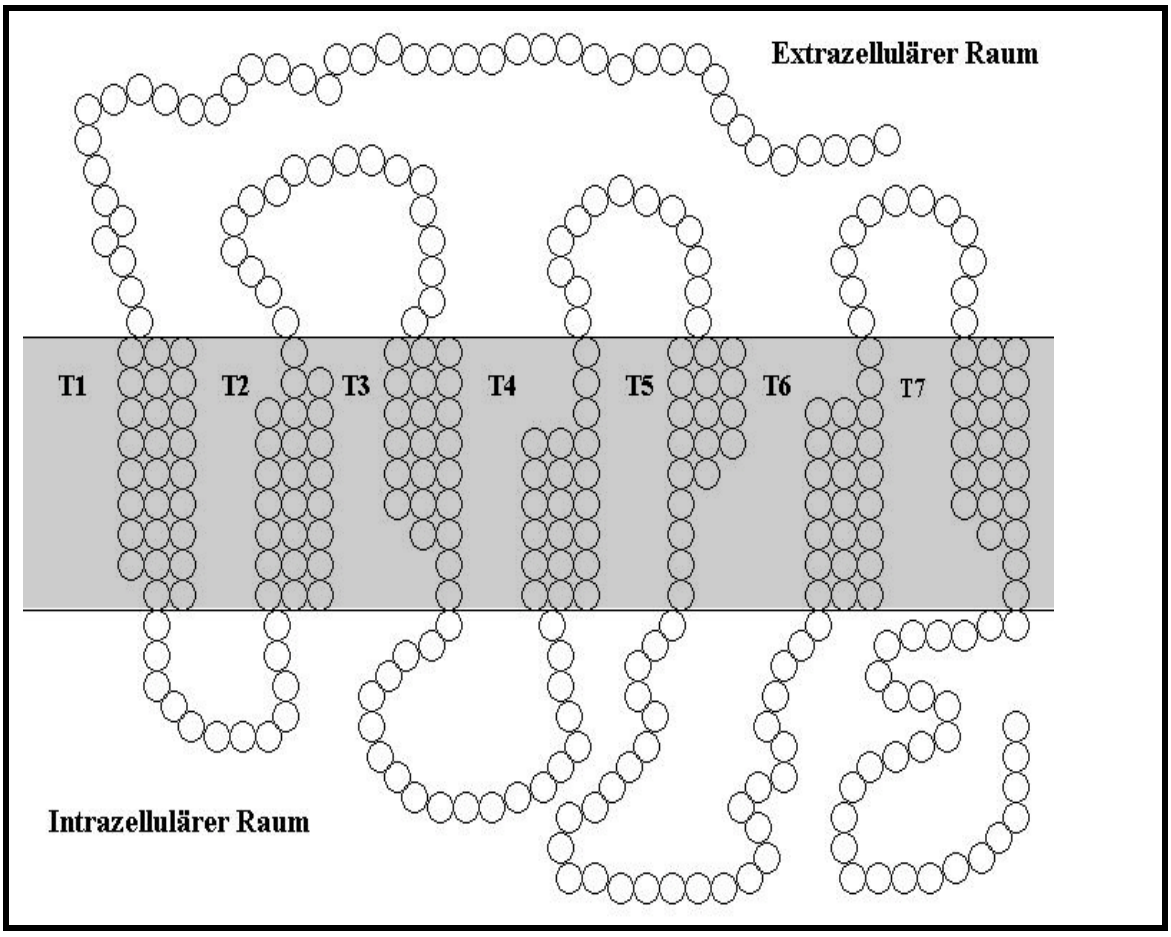


***Abbildung 1.2.*: Schematische Darstellung des Melanocortin 4 Rezeptors.** Der MC4R ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Regionen (T1 bis T7). Das intrazelluläre Ende enthält eine COOH-Gruppe, das extrazelluläre Ende eine NH_3-Gruppe. Auf Ebene der Lipiddoppelschicht der Zellmembran bildet der Rezeptor mit seinen Schleifen vermutlich ein zylinderförmiges Gebilde.
(Nach Gantz *et al*., 1993)

1.6.3. Häufigkeit und Verteilung von MC4R-Variationen

Bisher wurden acht Frameshift und drei Nonsense Mutationen im *MC4R* beschrieben (Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Gotoda *et al*., 1997; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Jacobson *et al*., 2002; Kobayashi *et al*., 2002; Marti *et al*., 2003; Mergen *et al*., 2001; Miraglia del Giudice *et al*., 2002; Ohshiro *et al*., 1999; Sina *et al*., 1999; Vaisse *et al*., 1998, 2000; Yeo *et al*., 1998 und 2003), die mit einer Frequenz von etwa 0,61 % in insgesamt über 3400 vollständig gescreenten adipösen Probanden vorkamen. Im untersuchten Kollektiv von insgesamt über 1600 normalgewichtigen Kontrollen wurden diese Mutationen nicht gefunden. Weiterhin wurden 45 Missense Mutationen dedektiert; die Frequenz dieser Mutationen betrug

2,15 % bei den adipösen Probanden (Branson *et al*., 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999, 2003; Jacobson *et al*., 2002; Kobayashi *et al*., 2002; Lubrano-Berthelier *et al*., 2003; Marti *et al.,* 2003; Mergen *et al*., 2001; Miraglia del Giudice *et al*., 2002; Vaisse *et al*., 1998, 2000; Yeo *et al*., 1998 und 2003). Zwei dieser Missense Mutationen wurden in etwa 2-3 % (Val-103-Ile) bzw. 1 % (Ile-251-Leu) sowohl im Kollektiv der Adipösen als auch der Normalgewichtigen in europäischer und nordamerikanischer Bevölkerung beschrieben (Hinney *et al*., 1999, 2003; Vaisse *et al*. 2000; Farooqi *et al*., 2000; Jacobson *et al*., 2002), funktionelle Studien zeigten keinen Unterschied zwischen diesen Polymorphismen und dem wildtypischen Rezeptor (Gu *et al*., 1999; Ho *et al*., 1999; Vaisse *et al*., 2000). Eine weitere Missense Mutation (Thr-112-Met) wurde sowohl in der Gruppe der adipösen Probanden als auch in der Gruppe der normalgewichtigen Probanden selten detektiert (Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999; Farooqi *et al*., 2000; Jacobson *et al*., 2002). Drei Missense Mutationen wurden bisher nur in normalgewichtigen Kontrollgruppen dedektiert (Ile-102-Thr, Phe-202-Leu, Asn-240-Ser), insgesamt beträgt die Frequenz der Mutationen bei gesunden Kontrollprobanden 0,37 %. Funktionelle Studien zu diesen Mutationen liegen bisher nur in zwei Fällen vor, die beide auf eine wildtypische Funktion des mutierten Rezeptors schließen lassen (Branson *et al*., 2003; Jacobson *et al*., 2002).

Bei fünfzehn Missense Mutationen wurde eine Teilaktivität *in vitro* nachgewiesen, die von leicht eingeschränkter Funktion bis hin zu fast kompletten Funktionsausfall reicht. Bei insgesamt neunzehn Mutationen, darunter acht frameshift und drei missense Mutationen, konnte ein totaler Funktionsausfall nachgewiesen werden, sieben Mutationen verhielten sich *in vitro* wie die wildtypische Form. Die übrigen wurden bisher noch nicht funktionell beschrieben (Branson *et al*., 2003; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 2003; Ho *et al*., 1999; Kobayashi *et al*., 2002; Lubrano-Berthelier *et al.,* 2003; Marti *et al*., 2003; Vaisse *et al*., 2000; Yeo *et al.,* 2003).

In Familienstudien zeigten Verwandte der adipösen Indexprobanden, welche die gleichen funktionell relevanten *MC4R* Mutationen hatten, meist ebenfalls einen adipösen Phänotyp (Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Kobayashi *et al*., 2002; Lubrano-Berthelier *et al*., 2003; Miraglia del Giudice *et al*., 2002; Sina *et al*., 1999; Vaisse *et al*., 1998 und 2000; Yeo *et al*., 1998 und 2003), was auf einen Hauptgeneffekt hinweist. Farooqi *et al*. (2000 und 2003)

detektierten in einer Familie fünf extrem adipöse homozygote Träger einer Missense Mutation (Asn-62-Ser), wohingegen die heterozygoten Familienmitglieder nicht adipös waren. Die Autoren schlossen daher auf eine in diesem Fall rezessive Form von Adipositas durch eine *MC4R* Mutation. Kobayashi *et al*. (2002) beschrieben einen weiteren homozygoten Träger einer *MC4R* Mutation. Es handelte sich hierbei um ein extrem adipöses japanisches Mädchen, welches auf beiden Allelen die Mutation Gly-98-Arg, welche *in vitro* zu funktionslosen Rezeptoren führt, aufwies. Eltern und Geschwister der Indexprobandin waren heterozygote Träger dieser Mutation und übergewichtig. Dieser Fall beschreibt eine Ko-dominate Form von Adipositas. Weitere homozygote Träger wurden in einer neueren Arbeit von Farooqi *et al*. (2003) beschieben: die Missense Mutationen Asn-97-Asp, Cys-271-Arg und Ile-316-Ser und erstmalig ein homozygoter Träger einer Frameshift Mutation: Codon 279 Insertion GT.

Für einen Überblick über die bisherigen Veröffentlichungen zeigen Tabelle 1.3. und 1.4. alle bisher erwähnten Mutationen; Tabelle 1.5. beschreibt die Referenzen.

Rezeptorvariante	***Funktion***	***Referenz***	***Heterozygote Variationsträger der Adipösen (Frequenz)***	***Heterozygote Variations-träger der Kontrollen (Frequenz)***
Thr-11-Ser	Wildtyp	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Thr-11-Ala	Partiell aktiv	Branson *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
		Farooqi *et al.* 2003	n = 1 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
Codon 16 - Insertion G	Funktions-verlust	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Trp-16-stop	Funktions-verlust	Marti *et al*. 2003	n = 1 (**0,006**)	n = 0 (**0**)
Arg-18-Cys	Wildtyp	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Ser-30-Phe	cAMP wie Wildtyp	Hinney *et al*. 2003	n = 2 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
Tyr-35-Stop	Funktions-verlust	Hinney *et al*. 2003	n = 5 (**0,006**)	n = 0 (**0**)
Asp-37-Val				
Pro-48-Ser	Funktions-verlust	Miraglia del Giudice *et al*. 2002	n = 1 (**0,005**)	-
Val-50-Met	Partiell aktiv	Dubern *et al*. 2001	n = 1 (**0,016**)	n = 0 (**0**)
Phe-51-Leu	ND	Branson *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Ser-58-Cys	Partiell aktiv	Dubern *et al*. 2001	n = 1 (**0,016**)	n = 0 (**0**)
Asn-62-Ser	Partiell aktiv	Farooqi *et al*. 2000 und 2003	n = 1 (**0,004**) (Homozygoter Träger)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al*. 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Codon 64 - Deletion C	ND	Jacobson *et al*. 2002	n = 1 (**0,5**)	n = 0 (**0**)
Pro-78-Leu	Partiell aktiv	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)[3]	n = 0 (**0**)
Ser-94-Arg	Funktions-verlust	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Val-95-Ile	Funktions-verlust	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Asn-97-Asp	Funktions-verlust	Farooqi *et al*. 2003	n = 1 (**0,002**) (Homozygoter Träger)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al*. 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Gly-98-Arg	Funktions-verlust	Kobayashi *et al*. 2002	n = 1(**1**) (Homozygoter Träger)	-

***Tabelle 1.3.*: Übersicht der bisher bekannten Melanocortin 4 Rezeptormutationen.** Angegeben sind die pharmakologische Relevanz der Mutationen (ND = bisher noch nicht definiert), die Referenz und die Anzahlen der jeweiligen Probanden**.** **Fettgedruckt** sind Frameshift und Nonsense Mutationen. [1] = Verringerte Ligandenbindung und Signaltransduktion; [2] = Erhöhte Bindung für α- MSH [3] = Aus dem Kollektiv der Eltern adipöser Probanden

Rezeptorvariante	***Funktion***	***Referenz***	***Heterozygote Variationsträger der Adipösen (Frequenz)***	***Heterozygote Variations-träger der Kontrollen (Frequenz)***
Ile-102-Ser	Partiell aktiv	Dubern *et al*. 2001	n = 1 (**0,016**)	n = 0 (**0**)
Ile-102-Thr	ND	Jacobson *et al*. 2002	n = 0 (**0**)	n = 1 (**2,1**)
Leu-106-Pro	Funktions-verlust	Yeo *et al*. 2003	n = 0 (**0003**)	n = 0 (**0**)
Codon 112 Insertion A	Funktions-verlust	Farooqi *et al.* 2003	n = 1 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al.* 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Thr-112-Met	Ähnlich Wildtyp	Branson *et al.* 2003	n = 2 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
		Gu *et al*. 1999	n = 0 (**0**)	n = 1 (**0,02**)
		Farooqi *et al.* 2000	n = 1 (**0,004**)	n = 0 (**0**)
		Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
		Jacobson *et al*. 2002	n = 3 (**1,4**)	n = 1 (**0,5**)
Ile-121-Thr	Partiell aktiv	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Ile-125-Lys	Funktions-verlust	Farooqi *et al.* 2003	n = 2 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al*. 2003	n = 3 (**0,009**)	n = 0 (**0**)
Ser-127-Leu	Partiell aktiv	Hinney *et al*. 2003	n = 2 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
		Lubrano-Berthelier *et al.* 2003	n = 1 (**0,006**)	-
Ile-137-Thr	[1]	Gu *et al*. 1999	n = 1 (**0,007**)	n = 0 (**0**)
Thr-150-Ile	[2]	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Arg-165-Trp	Partiell aktiv	Branson *et al.* 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
		Hinney *et al*. 2003	n = 2 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
		Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Arg-165-Gln	Partiell aktiv	Farooqi *et al*. 2000 und 2003	n = 1 (**0,004**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al.* 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Ile-170-Val	Partiell aktiv	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
		Dubern *et al*. 2001	n = 1 (**0,016**)	n = 0 (**0**)
Ala-175-Thr	Partiell aktiv	Farooqi *et al*. 2003	n = 1 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al.* 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Thr-178-Met	Ähnlich Wildtyp	Hinney *et al*. 2003	n = 0 (**0**)	n = 1 (**0,004**)
Gly-181-Asp	Funktions-verlust	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Met-200-Val	ND	Branson *et al.* 2003	n = 2 (**0,002**)	n = 0 (**0**)
Phe-202-Leu	ND	Jacobson *et al*. 2002	n = 0 (**0**)	n = 1 (**2,1**)
Codon 211 Deletion CTCT	Funktions-verlust	Farooqi *et al.* 2000 und 2003	n = 1 (**0,004**)	n = 0 (**0**)
		Hinney *et al*. 2003	n = 2 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al.* 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)

***Tabelle 1.3., Fortsetzung*: Übersicht der bisher bekannten Melanocortin 4 Rezeptormutationen.** Angegeben sind die pharmakologische Relevanz der Mutationen (ND = bisher noch nicht definiert), die Referenz und die Anzahlen der jeweiligen Probanden**. Fettgedruckt** sind Frameshift und Nonsense Mutationen. [1] = Verringerte Ligandenbindung und Signaltransduktion; [2] = Erhöhte Bindung für α- MSH [3] = Aus dem Kollektiv der Eltern adipöser Probanden

Rezeptorvariante	***Funktion***	***Referenz***	***Heterozygote Variationsträger der Adipösen (Frequenz)***	***Heterozygote Variations-träger der Kontrollen (Frequenz)***
Pro-230-Leu	Konstitutiv aktiv	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Asn-240-Ser	ND	Jacobson *et al*. 2002	n = 0 (**0**)	n = 1 (**2,1**)
Ala-244-Glu	Partiell aktiv	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
		Lubrano-Berthelier *et al.* 2003	n = 1 (**0,006**)	n = 0 (**0**)
Codon 244 Insertion GATT	Funktions-verlust	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Leu-250-Gln	Konstitutiv aktiv	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Codon 250 Deletion GA	Funktions-verlust	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Gly-252-Ser	Ähnlich Wildtyp	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Val-253-Ile	Funktions-verlust	Farooqi *et al.* 2000	n = 1 (**0,004**)	n = 0 (**0**)
		Marti *et al.* 2003	n = 1 (**0,006**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al*. 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Cys-271-Tyr	Funktions-verlust	Farooqi *et al*. 2000 und 2003	n = 1 (**0,004**)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al*. 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Cys-271-Arg	ND	Farooqi *et al*. 2003	n = 1 (**0,002**) (Homozygoter Träger)	n = 0 (**0**)
Asp-274-Serin	ND	Mergen *et al*. 2001	n = 2 (**5,0**)	-
Codon 279 Insertion GT	Funktions-verlust	Farooqi *et al*. 2000 und 2003	n = 2 (**0,008**) n = 1 (**0,004**) (Homozygoter Träger)	n = 0 (**0**)
Tyr-287-Stop	Funktions-verlust	Yeo *et al*. 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)
Pro-299-His	Partiell aktiv	Lubrano-Berthelier *et al.* 2003	n = 1 (**0,006**)	n = 0 (**0**)
Ile-301-Thr	Partiell aktiv	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
Ile-316-Ser	Partiell aktiv	Farooqi *et al.* 2003	n = 1 (**0,002**) n = 1 (**0,002**) (Homozygoter Träger)	n = 0 (**0**)
		Yeo *et al*. 2003	n = 1 (**0,003**)	n = 0 (**0**)

***Tabelle 1.3., Fortsetzung*: Übersicht der bisher bekannten Melanocortin 4 Rezeptormutationen.** Angegeben sind die pharmakologische Relevanz der Mutationen (ND = bisher noch nicht definiert), die Referenz und die Anzahlen der jeweiligen Probanden**.**

Fettgedruckt sind Frameshift und Nonsense Mutationen. [1] = Verringerte Ligandenbindung und Signaltransduktion; [2] = Erhöhte Bindung für α- MSH [3] = Aus dem Kollektiv der Eltern adipöser Probanden

Rezeptorvariante	***Funktion***	***Referenz***	***Heterozygote Variationsträger der Adipösen (Frequenz)***	***Heterozygote Variations-träger der Kontrollen (Frequenz)***
Ile-317-Thr	Ähnlich Wildtyp	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
Codon 320 Deletion T	Partiell aktiv	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)[3]	n = 0 (**0**)
C Deletion, 28 bp 3'vom Stopp	ND	Farooqi *et al*. 2000 und 2003	n = 1 (**0,004**)	n = 0 (**0**)

***Tabelle 1.3., Fortsetzung*: Übersicht der bisher bekannten Melanocortin 4 Rezeptormutationen.** Angegeben sind die pharmakologische Relevanz der Mutationen (ND = bisher noch nicht definiert), die Referenz und die Anzahlen der jeweiligen Probanden**.**

Fettgedruckt sind Frameshift und Nonsense Mutationen. [1] = Verringerte Ligandenbindung und Signaltransduktion; [2] = Erhöhte Bindung für α- MSH [3] = Aus dem Kollektiv der Eltern adipöser Probanden

Polymorphismus	***Funktion***	***Referenz***	***Anzahl der adipösen heterozygoten Variationsträger (Frequenz)***	***Anzahl der normal-gewichtigen heterozygoten Variationsträger (Frequenz)***
Val-103-Ile	Wildtyp	Branson *et al*. 2003	n = 11 (**0,012**)	n = 1 (**0,016**)
		Dubern *et al*. 2001	n = 1 (**0,016**)	n = 8 (**0,028**)
		Farooqi *et al*. 2000	n = 3 (**0,012**)	n = 1 (**0,019**)
		Gotoda *et al*. 1997	n = 8 (**0,042**)	n = 6 (**0,045**)
		Gu *et al*. 1999	n = 5 (**0,036**)	n = 2 (**0,040**)
		Hinney *et al*. 2003	n = 13 (**0,016**)	n = 9 (**0,036**)
		Marti *et al*. 2003	n = 1 (**0,006**)	n = 0 (**0**)
		Vaisse *et al*. 2000	n = 8 (**0,038**)	n = 8 (**0,031**)
				n = 3 (**0,027**)
Ile-251-Leu	Wildtyp	Branson *et al*. 2003	n = 5 (**0,005**)	n = 0 (**0**)
		Dubern *et al.* 2001	n = 1 (**0,016**)	n = 3 (**0,011**)
		Farooqi *et al.* 2000	n = 7 (**0,029**)	n = 3 (**0,056**)
		Hinney *et al*. 2003	n = 9 (**0,013**)	n = 7 (**0,021**)
		Marti *et al*. 2003	n = 2 (**0,013**)	n = 2 (**0,013**)
		Vaisse *et al*. 2000	n = 3 (**0,014**)	n = 3 (**0,008**)
A405C, silent	Wildtyp	Hinney *et al*. 2003	n = 0 (**0**)	n = 1 (**0,001**)
C408T, silent	Wildtyp	Branson *et al.* 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 0 (**0**)
G468A, silent	Wildtyp	Jacobson *et al*. 2002	n = 1 (**2,1**)	n = 0 (**0**)
C579T, silent	Wildtyp	Hinney *et al*. 2003	n = 1 (**0,001**)	n = 3 (**0,013**)
C593T, silent	Wildtyp	Vaisse *et al*. 2000	n = 1 (**0,005**)	n = 1 (**0,009**)
T636C, silent	Wildtyp	Jacobson *et al*. 2002	n = 1 (**2,1**)	n = 0 (**0**)

***Tabelle 1.4..*: Übersicht der bisher bekannten Polymorphismen und „Stummen" Mutationen des Melanocortin 4 Rezeptors.** Die Veränderungen sind ohne pharmakologische Relevanz. Angegeben sind die Referenzen und die Anzahlen der jeweiligen Probanden.

Referenz	*Anzahl und BMI (kg/m²) der Adipösen*	*Anzahl und BMI (kg/m²) der Kontrollen*	*Methoden der Variationssuche*
Branson *et al.* 2003	n= 469 BMI= 44,1 +/- 2,0	n= 25 BMI= 21,6 +/- 0,4	PCR, Sequenzierung
Dubern *et al*. 2001	n= 63 BMI= 32,4 +/- 4,9	n= 283 BMI= 22,0 +/- 1,7	PCR, Sequenzierung
Farooqi *et al.* 2000	n= 243 BMI= 4,17 Standard-Abweichungspunkte (SDS) oberhalb des Durchschnitts-BMI	n= 54 BMI= keine Angabe	PCR, Sequenzierung
Farooqi *et al.* 2003	n= 500 BMI= 4,2 +/- 0,8 Standard-Abweichungspunkte (SDS) oberhalb des Durchschnitts-BMI	n= 54 BMI= keine Angabe	PCR, Sequenzierung
Gotoda *et al.* 1997	n= 182 BMI> 28	n= 126 BMI< 22	PCR, RFLP- Analyse nach Einsatz von Schnittstellenbildenden Primern, Sequenzierung
Gu *et al*. 1999	Gruppe 1 : n=110 BMI> 50 Gruppe 2 : n=30 50>BMI> 30	Gruppe 1: n= 3 30> BMI> 25 Gruppe 2: n= 47 BMI< 25	PCR, RFLP- Analyse, SSCP, Sequenzierung
Hinney *et al*. 2003	n= 719 BMI= 34,4 +/- 6,6	Gruppe 1: n= 138 BMI= 17,1 +/- 0,8 Gruppe 2: n= 110 BMI= 22,0 +/- 1,0	PCR, RFLP- Analyse, SSCP, Sequenzierung
Jacobson *et al.* 2002	HERITAGE-Study : n = 18, BMI = 38,7 +/- 2,4 Memphis-Study: n = 29, BMI = 48,4 +/- 8,4 SOS-Study: n = 144, BMI = 43,1 +/- 3,4 Sibships: n = 73, BMI = 35,9 +/- 5,5	HERITAGE-Study : n = 48, BMI = 21,6 +/- 1,7 Memphis-Study: - SOS-Study: n = 140, BMI = 22,4 +/- 1,6 Sibships: n = 76, BMI = 22,7 +/- 2,2	PCR, RFLP- Analyse, SSCP, Sequenzierung
Kobayashi *et al*. 2002	n = 1 BMI = 62	-	PCR, RFLP- Analyse, Sequenzierung
Lubrano-Berthelier *et al.* 2003	n= 172 BMI= 32 +/- 6,3	-	PCR, Sequenzierung
Marti *et al.* 2003	n= 159 BMI= 37,6 +/- 0,9	n= 154 BMI= 22,3 +/- 0,3	PCR, SSCP, Sequenzierung

***Tabelle 1.5*.: Beschreibung der Referenzen.** Angegeben sind Anzahl und BMI-Kriterien der jeweiligen Probandengruppen und die Methoden der Mutationssuche.

Referenz	*Anzahl und BMI (kg/m²) der Adipösen*	*Anzahl und BMI (kg/m²) der Kontrollen*	*Methoden der Variationssuche*
Mergen *et al.* 2001	n= 40 BMI= keine Angaben	Keine	PCR, Sequenzierung
Miraglia del Giudice *et al.* 2002	n = 208 BMI = 3,64 +/- 1,9 SDS oberhalb der altersbezogenen Perzentilen	-	PCR, RFLP- Analyse, Sequenzierung
Vaisse *et al*. 2000	n= 209 BMI= 51,5 +/- 7,5	Gruppe1 : n=254 BMI= 20,0 +/- 2,0 Gruppe 2 : n= 112 BMI= 23,0 +/- 2,7	PCR, RFLP- Analyse, SSCP, Sequenzierung
Yeo *et al.* 2003	n= 350 BMI = 4,17 SDS oberhalb der altersbezogenen Perzentilen	n= 54 BMI= keine Angabe	PCR, Sequenzierung

***Tabelle 1.5., Fortsetzung*: Beschreibung der Referenzen.** Angegeben sind Anzahl und BMI-Kriterien der jeweiligen Probandengruppen und die Methoden der Variationssuche.

1.7. Assoziations- und Kopplungsphänomen und statistische Ansatzpunkte

Assoziation und Kopplung beschreiben zwei unterschiedliche statistische Ansätze: Kopplung ist eine Beziehung zwischen *Loci* oder zwischen *Locus* und *Phänotyp*, die Assoziation ist aber die Beziehung zwischen *Allelen* oder zwischen *Allel* und *Phänotyp*. Kopplung beschreibt also die Nachbarschaft von Loci und die daraus resultierende gemeinsame Segregation. Assoziation bedeutet, dass Personen in einer Population, die an einem Locus ein bestimmtes Allel besitzen, mit höherer Wahrscheinlichkeit als zufällig ein bestimmtes anderes Allel an einem weiteren Locus besitzen (Buselmaier *et al*., 1999). Assoziation zwischen einem Phänotyp und einem Allel kann man mit Fall-Kontrollstudien untersuchen. Dabei werden die Häufigkeiten eines bestimmten Allels in jeweils einer Gruppe von Patienten und gesunden Kontrollpersonen verglichen. Das Kopplungsungleichgewicht beschreibt die Verknüpfung eines bestimmten Allels mit einem gekoppelten Krankheitslocus in der Population. Ein Kopplungsungleichgewicht lässt sich im Hinblick auf eine Mutation beispielsweise dann finden, wenn viele der Patienten die chromosomale Region von einem gemeinsamen Vorfahren geerbt haben (Buselmaier *et al.,* 1999).

Assoziation eines Allels (A) zu einer Krankheit (K) kann nachgewiesen werden, wenn

a) das Allel A die Wahrscheinlichkeit erhöht, die Krankheit K zu entwickeln.
b) ein Kopplungsungleichgewicht die Ursache einer Assoziation ist und somit nahe dem A-Locus ein Gen gesucht werden kann, das bei erkrankten Menschen mutiert ist. Das Allel A welches in diesem Fall mit der Krankheit K assoziiert ist, kann in unterschiedlichen Populationen ein anderes sein.
c) erkrankte Personen und gesunde Kontrollen aus verschiedenen genetischen Bevölkerungsgruppen stammen, welche eine unterschiedliche Häufigkeit für das Allel A aufweisen (Populationsstratifikation) (Strachan *et al*., 1996).

Assoziationsuntersuchungen sind anfällig für falsch positive Befunde, die durch zusätzliche phänotypische Unterschiede zwischen den Probanden und Kontrollpersonen hervorgerufen werden, für welche die Kollektive nicht kontrolliert wurden. Weiterhin stellen die beschriebenen Stratifikationseffekte ein mögliches Problem dar. Um dies zu vermeiden, wurden Verfahren entwickelt, welche die nicht transmittierten Allele beider leiblicher Eltern als interne Kontrollen verwenden. Beim Transmissions-

Disequilibrium-Test (TDT, siehe auch Abschnitt 2.3.8.3.) wird ausgehend von heterozygoten Elternteilen getestet, ob das zu untersuchende Allel häufiger an Indexpatienten mit der Krankheit K transmittiert als nicht transmittiert wird (Spielmann *et al.,* 1993). Dieser Test entdeckt Kopplung nur dann, wenn gleichzeitig Assoziation vorliegt.

1.8. Ziel der Arbeit

Das melanocortinerge System weist mehrere wichtige Ansatzpunkte auf, die für eine genetische Beteiligung an der Entstehung der Adipositas sprechen. Die besondere Rolle von genetischen Veränderungen des MC4R bei der Entstehung humaner Adipositas wird durch viele vorausgegangene Studien deutlich, welche die quantitative Verteilung von MC4R Mutationen beschreiben.

Nicht alle Veränderungen im *MC4R* haben eine Auswirkung auf Expression, Aufbau oder Funktion des Rezeptors. Deshalb wurde in dieser Arbeit mittels molekulargenetischer Untersuchung von Familientrios (adipöses Kind mit Elternpaar) der Frage nachgegangen, ob Missense- oder Haploinsuffizienzmutation des *MC4R* auf adipöse Probanden überzufällig häufig weitervererbt wurden. Mittels des Transmissions-Disequilibrium-Tests sollte ein eventuelles Transmissions-ungleichgewicht nachgewiesen werden.

2. Probandenkollektiv, Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial und Probandenkollektiv

2.1.1. Untersuchungsgut

Als Untersuchungsgut diente EDTA-Blut, dass den Patienten bzw. deren Eltern von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe abgenommen wurde.

2.1.2. Rekrutierung der Probanden

Für die Studien zur Gewichtsregulation wurden die Patienten, deren Eltern und gegebenenfalls Geschwister der Patienten von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe rekrutiert (Übersicht Hinney *et al*., 1997):
1. Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kinder- und Jugendalters der Phillips-Universität Marburg
2. Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA, Berchtesgarden (Langzeittherapie für Jugendliche mit extremer Adipositas)
3. Klinik Hochried, Murnau (Spezialklinik zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas)
4. Spessartklinik Bad Orb

Mit den Patienten und ihren Eltern und gegebenenfalls Geschwistern wurden von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe semistrukturierte Interviews zur Gewichts-anamnese, Erfassung soziodemographischer Daten und organischer Erkrankungen durchgeführt. Außerdem wurden Fragen des Composite International Diagnostic Interviews (CIDI, Sektion Essstörungen; WHO, 1990) gestellt, um das Vorliegen einer Essstörung festzustellen. Jeder Patient wurde über die Studie anhand eines Informationsblattes aufgeklärt und unterzeichnete eine Einverständniserklärung. Bei Minderjährigen wurde diese von mindestens einem Erziehungsberechtigten eingeholt. Die personenbezogenen Daten wurden verschlüsselt und werden gemäß dem gültigen Datenschutzgesetz verwahrt. Ein positives Votum zur Durchführung der Studie liegt von der Marburger Ethik-Kommission vor.

Für die Aufnahme in die Studiengruppen mussten alle Probanden folgende Vorraussetzungen erfüllen:

1. Ausschluss organischer Erkrankungen, die das Körpergewicht beeinflussen
2. Ausschluss einer Dauermedikation, die das Körpergewicht beeinflusst (ausgenommen Kontrazeptiva)
3. Nikotinkonsum < 10 Zigaretten pro Tag

Untersucht wurden weiterhin die Eltern der extrem adipösen Kinder und Jugendlichen; für sie galten keine einschränkenden Kriterien für die Rekrutierung. Von der Familienuntersuchung ausgeschlossen wurden Trios, bei welchen Vater- und/ oder Mutterschaft nicht mit den Vererbungsregeln nach Mendel vereinbar waren. Dies wurde durch vorangegangene Untersuchungen mit „single nucleotide polymorphism“ (SNP) und Mikrosatelliten Analysen überprüft.

2.1.3. Beschreibung der Studiengruppen:

Es wurden zwei verschiedene Studiengruppen auf Mutationen und Polymorphismen im *MC4R* untersucht und die Transmission dieser Veränderungen von den Eltern auf die Kinder bestimmt.

Kinder und Jugendliche mit extremer Adipositas und deren Eltern:

Dieses Patientenkollektiv bestand aus 520 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen, die einen durchschnittlichen BMI von 32,5 ± 6,3 kg/m^2 aufwiesen und im Mittel 13,9 ± 2,7 Jahre alt waren. 59,6 % der Kinder waren weiblichen Geschlechtes. 65,5 % der adipösen Kinder und Jugendlichen lagen in ihren alters- und geschlechtsabhängigen BMI-Perzentilen ≥ 99 (Hebebrand *et al*., 1996). Alter und BMI der dazugehörigen Elternpaare wurden ebenfalls erfasst. Bei den Müttern lag der BMI bei durchschnittlich 30,4 ± 6,7 kg/m^2, das Alter bei 41,5 ± 5,5 Jahren, bei den Vätern war ein durchschnittlicher BMI von 30,4 ± 5,7 kg/m^2, und ein durchschnittliches Alter von 44,5 ± 6,2 Jahren festzustellen. Die Studiengruppen sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Studiengruppe	Geschlecht	Anzahl der Probanden	Durch-schnittlicher BMI (kg/m²)	Durch-schnittliches Alter (Jahre)
Adipöse Kinder und Jugendliche	w	310	32,5 ± 6,3	13,9 ± 2,7
	m	210		
Eltern der adipösen Kinder und Jugendlichen	w	520	30,4 ± 6,7	41,5 ± 5,5
	m	520	30,4 ± 5,7	44,5 ± 6,2

***Tab 1.1.*: Beschreibung der Studiengruppen.** Angegeben sind Geschlecht, Anzahl, BMI und Alter der rekrutierten Probanden und deren Eltern.

2.2. Verwendete Chemikalien und Geräte

2.2.1. Spezielle Chemikalien

In Tabelle 2.2. werden die verwendeten speziellen Chemikalien und deren Bezugsquelle aufgeführt:

Chemikalien	Hersteller
123 bp DNA- Marker	Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland (D))
Acrylamid- Bis- Acrylamid (37,5:1)	Roth (Karlsruhe, D)
Agarose NEEO	Roth (Karlruhe, D)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Auqua ad injectabile	Braun
Borsäure	Riedel- de- HaJn
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, D)
DNA- Polymerisationsmix (dNTP)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Essigsäure	Riedel-de-HaJn
Ethanol 100%, vergällt	Apotheke
Ethydiumbromid	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylen-ediamin-tetraacetic-acid (EDTA)	Roth (Karlsruhe, D)
Ficoll (Type 400)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)

Chemikalien	Hersteller
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
Formamid	Sigma (Deisenhofen, D)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, D)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
Magnesiumchlorid	MWG (Ebersberg, D)/ Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Salpetersäure	Merck (Darmstadt, D)
Salzsäure	Merck (Darmstadt, D)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe, D)
Tetra- methyl- ethylendiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen, D)
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7- deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
TrisHCl	Roth (Karlsruhe, D)
Xylene- Zyanol blau	Merck (Darmstadt, D)

Tab. 2.2.: **Spezielle Chemikalien und deren Bezugsquelle**

2.2.2. Groß- und Kleingeräte

In Tabelle 2.3. werden die verwendeten Groß- und Kleingeräte mit Beschreibung ihrer Funktion und Herstellerangabe aufgeführt.

Gerätebezeichnung	Funktion	Hersteller
ABI Sequenzer 373	Automatisches Sequenziergerät	ABI (Weiterstadt, D)
Scotsman AP- 10	Eismaschine	Frimont (Mailand, Italien)
Autoklav 3850	Autoklav	Tutthauer
Biofuge 13	Zentrifuge	Heraeus instruments (Hanau, D)
Drehschieberpumpe RZ- 2	Vakuumtrockner	Vaccubrand (Gießen, D)

Gerätebezeichnung	Funktion	Hersteller
Duomax 1030	Platten- Schwenkgerät	Heidoph
Finn- Pipette	Pipette	Labsystem (Helsinki, Finnland)
GDS- Kamerasystem	Kamera	Polaroid (Offenbach , D)
Geneamp PCR- System 2400	DNA- Thermocycler	Perkin Elmer (Weiterstadt, D)
Geneamp PCR- System 9600		
Genequant II	Photometer	Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Horizontalelektrophorese GE- A2	Elektrophorese für Agarosegele	AGS (Heidelberg, D)
Ikamag RH	Magnet- Rührgerät	IKA Labortechnik (Staufen, D)
JMBS 0.2 G	DNA- Gradientencycler	Hybraid
Labfuge	Zentrifuge	Heraeus instruments (Hanau, D)
Li- Cor 4200	Sequenziergerät	MWG (Ebersberg, D)
Megafuge 2.0	Kühlzentrifuge	Heraeus instruments (Hanau, D)
Mighty Bright	Ultraviolett (UV)- Lichtquelle	Hoefer (San Francisco, USA)
Mikroliterspritze 802, 25	Probenauftrag auf SSCP- Gele	Hamilton (USA)
Mikrowelle	Mikrowelle	Panasonic (Hamburg, D)
Milli- Qplus	Geräte zur Herstellung von Aqua bidest	Millipore (Saint-Quentin Yvelines Codex, F)
Milli- R010		
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipetus- akku	Elektrische Saugpipette	Hirschmann Labor- geräte (Eberstadt, D)
Power- Supply E 452	Stromaggregate für Horizontal- elektrophorese	Consort (Turnhout, Belgien)
Power- Supply E 734		

Gerätebezeichnung	Funktion	Hersteller
Power- Supply EPS 301	Stromaggregat für Horizontal- elektrophorese	Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Schüttelwasserbad 1083	Schüttelwasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Touch Down	DNA- Thermocycler	Hybraid, MWG (Ebersberg, D)
Transgenomic Wave	HPLC-Gerät	Transgenomic
Trockner FunktionLine	Trockner bis X °C	Heraeus instruments (Hanau, D)
Ultra Low Freezer	Eisschrank bis –80°C	New Brunswick Scientific
Vertikalelektrophorese SE 600	Elektrophorese für SSCP-Gele	Hoefer (San Francisco, USA)
Vortex MS1	Schüttelgerät	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Vortex RS1		IDL
Waage SBA,SBC	Waage	ScalTec Instruments (Heiligenstadt, D)

Tab. 2.3.: **Beschreibung der verwendeten Geräte**

2.3. Spezielle Methoden

2.3.1. Gewinnung und Aufbereitung der DNA-Proben

2.3.1.1. Isolierung der genomischen DNA

Aus den Blutproben der Probanden (siehe Kap. 2.1.) wurde die Isolierung der genomischen DNA mit der Aussalzungmethode nach einem modifizierten Protokoll von Miller *et al*. (1988) durchgeführt.

Dazu wurde in einem 50 ml Falcon- Röhrchen 10-20 ml antikoaguliertes EDTA- Blut mit 30 ml eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer (RCLB) vermischt und dann 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Leukozyten durch zehnminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (4.000 Umdrehungen pro Minute) und 4°C sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand mit den darin

enthaltenen Erythrozytentrümmern verworfen und das Leukozytensediment in 25 ml RCLB aufgenommen und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation des Gemisches bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C wurde das nun entstandene Pellet in 5,5 ml Pronase-Reaktionsmix gelöst und über Nacht bei 37°C im Wasserbad schüttelnd inkubiert, bis die Lösung klar war. Dann wurden zu dieser Lösung 5 ml SE- Puffer hinzugegeben und bei 55°C mindestens 10 Minuten lang im Wasserbad bei ständigem Schütteln inkubiert, um den proteolytischen Abbau zu beschleunigen. Im Anschluss wurden zur Ausfällung der Proteine 2,5 ml NaCl- Lösung (5M) zu der klaren Lösung zugegeben, umgehend 15 Sekunden lang gevortext und dann 15 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch wurden die durch die Salzlösung gefällten Proteine sedimentiert. Der die DNA enthaltende Überstand wurde nun in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem Ethanol (absolut) gefällt. Die ausgefällte DNA wurde mit einem Glashaken aufgenommen und kurz in eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in TE- Puffer (pH 8,0) bei 4°C über Nacht oder 1- 2 Stunden bei 50°C im Wasserbad gelöst.
Zur Extraktion der DNA aus dem Blut wurden die in Tabelle 2.4. aufgeführten Puffer verwendet:

Puffer	**pH- Wert**	**Reagenz**	**Endkonzentration (mM)**
Lysepuffer (RCLB, red cell lysis buffer)	7,6	Tris/HCl	10
		$MgCl_2$	5
		NaCl	10
SE- Puffer	8,0	NaCl	75
		EDTA	25
TE- Puffer	8,0	Tris/HCl	10
		EDTA	1

Tabelle 2.4. : **Puffer für die DNA- Extraktion**

Die Tabelle 2.5. zeigt die Zusammensetzung des bei der DNA-Extraktion verwendeten Pronase-Reaktionsgemisches an. Die Pronase E wurde von der Firma Sigma, Deisendofen, D, bezogen.

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

***Tabelle 2.5.*: Zusammensetzung des Pronase- Reaktionsgemisches**

2.3.1.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA, die aus den verschiedenen Blutproben gewonnen wurde, wurde photometrisch bestimmt, um im Anschluss einheitlich konzentrierte Verdünnungen herstellen zu können.
Die Messung der Extinktion der DNA erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die gelöste DNA wurde mit destilliertem Wasser 1:200 verdünnt und die Extinktion dieser Lösung im Photometer bestimmt. Der Berechnung der DNA- Konzentration lag folgende Formel zugrunde:

DNA- Konzentration (µg/ ml) = Verdünnung X 50 µg/ ml X E260

E260 = Extinktion bei 260 nm

So entspricht eine Extinktion von E260 = 1,0 einer DNA- Konzentration von 50µg/ml.
Die Konzentration der aufbewahrten DNA-Lösungen betrugen zwischen 300 und 1000 µg/ ml. Es wurde darauf geachtet, dass der DNA/ Protein- Quotient nicht unter einem Wert von 1,5 lag.

2.3.1.3. Verdünnung der DNA

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

2.3.1.4. Herstellung von DNA-Mikrotiterplatten

Um die weitere Verwendung der hergestellten DNA- Verdünnungen zu erleichtern, wurden Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Wells hergestellt. Dabei betrug die Endkonzentration der DNA ebenfalls 20 ng/µl. Die Lagerung der Mikrotiterplatten erfolgte bei –20°C.

2.3.2. Amplifizierung der DNA

2.3.2.1. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase- Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, *in vitro* beliebige DNA- Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen zu amplifizieren (Mullis *et al*., 1987). Man benötigt dazu zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA- Abschnittes hybridisieren, eine ausreichende Menge der vier Desoxynucleosid-triphosphate (dNTP) und eine spezielle, hitzebeständige DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus dem thermostabilen Bakterium *Thermo aquaticus*). Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von folgenden Schritten:
Zunächst wird der Ansatz auf etwa 93°- 95°C erhitzt, um die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge zu zerlegen. Die Denaturierungstemperatur ist um so höher, je höher der Gehalt an Guanin und Cytosin im zu amplifizierenden Bereich ist. Dann kühlt man auf eine primerspezifische Temperatur (50°-70°C) herunter, um die Anlagerung (Annealing) der Primer zu ermöglichen, wobei ein hoher Primerüberschuß vorliegt. Die Primer rahmen die Zielsequenz ein, indem sie an spezifischen Stellen der DNA binden und ein Primer das 5’ Ende auf dem einen DNA- Strang und der andere Primer das 3’

Ende auf dem anderen DNA- Strang definiert. Von diesen ausgehend werden nun bei 72°C (optimierte Temperatur der *Taq*-Polymerase) in beide Richtungen komplementäre DNA- Stränge mit Hilfe der *Taq*-Polymerase neu synthetisiert. Dies geschieht durch Einbau von Desoxynukeosidtriphosphaten (dNTPs) entlang der DNA- Vorlage. Die Dauer der einzelnen Schritte ist unterschiedlich und beträgt meist zwischen 30 Sekunden und einer Minute, sie werden zyklisch etwa 30 mal wiederholt. Schon nach dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer entspricht. Ihr Anteil erhöht sich mit jedem Zyklus auf das Doppelte, bis schließlich fast alle neu synthetisierten Abschnitte die richtige Länge haben. So lässt sich der definierte DNA- Abschnitt exponentiell amplifizieren. Nach 30 Zyklen beträgt der Vermehrungsfaktor etwa 2^n (n = Anzahl der Zyklen). Abbildung 2.1. zeigt ein Schema der PCR.

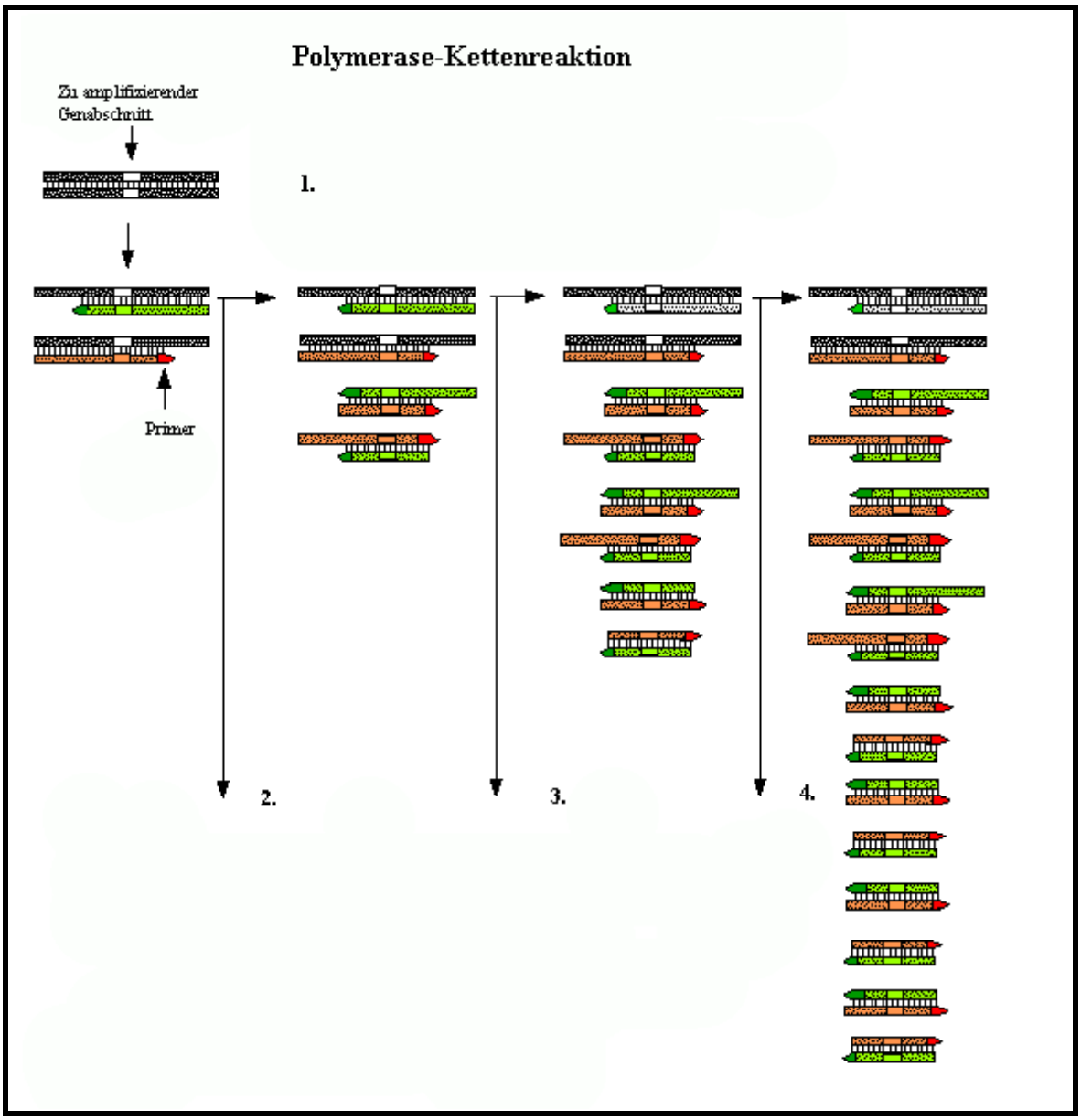


***Abbildung 2.1.*: Polymerase-Kettenreaktion (PCR). 1.**: Denaturierung der DNA-Doppelhelix und Anlagerung der Primer. **2.**: Die Verlängerung der Primer in Richtung Zielsequenz. **3.** und **4.**: Die neu gebildeten DNA-Stränge dienen in den Folgezyklen wieder als Matrizen, so dass die Zielsequenz wieder von den Primern flankiert und exponentiell vermehrt wird (modifiziert nach esg-www.mit.edu:8001/esgbio/rdna/pcr.html).

Die Primer werden synthetisch hergestellt und haben eine Länge von etwa 20 Basen. Um eine optimale Ausbeute zu erzielen, sollte der Guanin/Cytosin-Gehalt der Primer zwischen 40% und 60% liegen. Komplementäre Sequenzen der Primer untereinander sollten vermieden werden, um Primerdimer-Artefakte zu minimieren. Außerdem sollten

die Primer nicht mehr als drei Guanin- bzw. Cytosin-Basen an ihrem 3' Ende enthalten und nur in aufgereinigter Form verwendet werden.

2.3.2.2. Optimierung der PCR

Da *MC4R* aus nur einem Exon mit 999 kodierenden Basenpaaren besteht, wurden zwei Primerpaare so gewählt, dass jeweils zwei sich teilweise überlappende PCR-Fragmente entstanden, die zusammen den gesamten kodierenden Bereich des Gens beinhalteten.
Zur Optimierung der PCR wurden die in Tabelle 2.6. aufgeführten Puffer verwendet:

10x Puffer Nr.	**pH-Wert**	**Reagenzien und deren Konzentrationen**		
		Tris/HCl (mM)	**MgCl2 (mM)**	**KCl (mM)**
1	8,3	100	15	250
2	8,3	100	15	750
3	8,3	100	35	250
4	8,3	100	35	750
5	8,8	100	15	250
6	8,8	100	15	750
7	8,8	100	35	250
8	8,8	100	35	750
9	9,2	100	15	250
10	9,2	100	15	750
11	9,2	100	35	250
12	9,2	100	35	750

Tabelle 2.6.: **Puffer für die PCR- Optimierung**

2.3.2.3. Reagenzien der PCR

Um bei der PCR ein Produkt der gewünschten Sequenz ohne unspezifische Nebenprodukte herzustellen, werden die Bedingungen der PCR optimiert. Dafür geht man von einem 25 µl Ansatz aus. In die Cups werden je 2,5 µl verdünnte DNA (20 ng/µl) vorgelegt. Die weitere Zusammensetzung des Reaktionsansatzes hängt von verschiedenen Faktoren ab. So beeinflusst während der PCR die Konzentration von positiv geladenen Ionen den Denaturierungsprozeß der DNA und die Hybridisierungstemperatur. Dies beruht vor allem auf der Verminderung der elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den DNA-Strängen, da sich die Kationen an den positiv geladenen Phosphatgruppen der DNA anlagern. Die Magnesiumkonzentration ist bedeutsam für die Aktivität der *Taq*-Polymerase. Bei niedriger Konzentration besteht die Möglichkeit der Inaktivierung der *Taq*-Polymerase, eine hohe Konzentration kann die Bildung unspezifischer DNA-Amplifikate fördern. Da die Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP's) Magnesium-Ionen binden, ist die Konzentration an freiem Magnesium abhängig von der Konzentration der dNTP's. Auch der optimale Gehalt an Kalium-Ionen ist je nach Oligonukleotidprimer und Zielsequenz verschieden. Zur Optimierung der PCR wurden deshalb verschiedene Konzentrationen von Mg^{2+}-Ionen durch Zugabe von MgCl und verschiedene Konzentrationen von K^{+}-Ionen durch Zugabe des polymerasespezifischen Puffers getestet. Als Primerausgangskonzentration wurden 0,1–0,2 µMol Primer in dem jeweiligen Reaktionsansatz eingesetzt und je nach Spezifität des PCR- Produktes variiert. Eine zu hohe Primerkonzentration birgt das Risiko einer nicht- spezifischen Anlagerung an die DNA- Matrize (mispriming), die dann zum Erhalt von unspezifischen PCR- Produkten führt. Die Polymerase- Kettenreaktion wurde auf Eis pipettiert. Die *Taq*-Polymerase wurde dem Reaktionsgemisch zuletzt zugefügt. Tabelle 2.7. zeigt die eingesetzten Mengen der Reagenzien sowie deren Endkonzentrationen im Reaktionsansatz, die sich für beide Fragmente als geeignet herausstellten.

Reagenz	Zugabe pro 25µl Ansatz	Endkonzentration im Reaktionsmix
DNA (20 ng/ µl)	2,5 µl (50 ng)	2 ng/µl
Puffer	2,5 µl	10 %
MgCl	3,5 µl	14 %
dNTP (20 mM)	0,25 µl (5 pmol)	0,2 pmol/µl
Forward- Primer (25pmol/ µl)	0,25 µl (6,25 pmol)	0,25 pmol/µl
Reverse- Primer (25pmol/ µl)	0,25 µl (6,25 pmol)	0,25 pmol/µl
Taq- Polymerase	0,2 µl	0,032 U/µl
Aqua ad injectable	15,55 µl	62,2 %

***Tabelle 2.7.*: Die bei der PCR verwendeten Reagenzien**

2.3.2.4. Standard-Primer der PCR

Das Exon des *MC4R* wurde in zwei Fragmenten amplifiziert, wofür die in Tabelle 2.8. beschriebenen Primerpaare verwendet wurden. Mit dem Buchstaben F wurden jeweils die Vorwärts-Primer, mit dem Buchstaben R die Rückwärts-Primer bezeichnet. Die Sequenzen sind in Richtung 5' → 3' angegeben.
Alle angegebenen Primer wurden von der Firma ARK bezogen.

Fragment	Primer	Sequenz	Konzentration
1	MC4R- 1F	ATC AAT TCA GGG GGA CAC TG	25 pmol/ µl
	MC4R- 1R	GAC AGC ACT ACT ATC TGA GT	25 pmol/ µl
2	MC4R- 2F	ATG CTC TCC AGT ACC ATA ACA	25 pmol/ µl
	MC4R- 2R	TGC AGA AGT ACA ATA TTC AGG	25 pmol/ µl

Tab 2.8.:* Beschreibung der verwendeten Primerpaare für die Implifikation des *MC4R (Hinney *et al*., 1999)

2.3.2.5. Hybridisierungstemperatur der PCR

Für die Berechnung der Hybridisierungstemperatur (Annealing-Temperatur) diente folgende Formel als Grundlage (Mullis *et al*., 1987):

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

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

Die Hybridisierungstemperaturen von Forward- und Reverse-Primer sollten im Idealfall übereinstimmen. Stimmen sie nicht vollständig überein, so ist die optimale Temperatur in der Nähe des Mittelwertes beider errechneter Werte zu erwarten. Wurden bei den Temperaturen viele unspezifische PCR-Produkte amplifiziert, wurde die Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten so lange erhöht, bis die unspezifischen DNA-Amplifikate verschwanden. Eine Annealing-Temperatur von 60° C erwies sich für beide Fragmente als optimal.
Die Amplifizierung der DNA wurde im DNA- Thermozykler (Geneamp PCR-System 2400 bzw. 9600, Perkin Elmer) durchgeführt. In Tabelle 2.9. werden die einzelnen Temperaturschritte bei der Polymerase- Kettenreaktion beschrieben.

Schritte der PCR	Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
Denaturierung	180 Sekunden	94° C	1 x
Denaturierung	30 Sekunden	94° C	30 x
Annealing	30 Sekunden	60° C	
Kettensynthese	30 Sekunden	72° C	
Kettensynthese	180 Sekunden	72° C	1 x

Tabelle 2.9.*: Temperaturschritte bei der PCR zur Implifikation des *MC4R

Nach abgelaufener PCR schloss sich eine Kühlungsphase an, bei der das Produkt auf 4°C heruntergekühlt wurde, um dessen Qualitätsverlust bei Lagerung gering zu halten.

2.3.2.6. Trennung des Vor- und Nach-PCR-Bereiches

Da die Polymerase-Kettenreaktion eine Methode ist, die sehr empfindlich auf DNA-Verunreinigung reagiert, wurden die Arbeitsbereiche vor und nach der PCR räumlich getrennt. Im Vor-PCR-Bereich wurde die DNA extrahiert und die Reaktionsgemische für die PCR angesetzt. Alle Reagenzien wurden aliquotiert, um einer Kontamination vorzubeugen. Im Nach-PCR-Bereich wurde die DNA-Amplifikation und die Auswertung der PCR durchgeführt. Um eine mögliche Verunreinigung zu kontrollieren, lief bei jeder PCR eine Wasserprobe mit.

2.3.3. Gel-Elektrophorese

2.3.3.1. Herstellung eines Agarose-Gels

Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese können Nucleinsäusefragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend durch Färbung sichtbar gemacht werden. Zur Herstellung des dafür benötigten horizontal liegenden 2,5%igen Agarose-Gels wurden 5 g Agarose mit 200 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Zugabe von 20 µl Ethidium-Bromid (1%ige Lösung) wurde das Gemisch geschüttelt und in die Gel-Elektrophorese-Kammer gegossen. In die Kammer wurden nun Kämme eingesetzt, die als Platzhalter für die später benötigten Geltaschen dienten. Nach dem Erstarren der Gele konnten diese für die Elektrophorese weiterverwendet werden.
Tabelle 2.10. zeigt die bei der Agarosegelelektrophorese verwendeten Puffer, welche vor ihrer Verwendung nicht autoklaviert wurden:

Puffer	Reagenz	Endkonzentration
10 x TAE- Puffer	Tris/HCl	0,04 M
	100% Eisessig	0,114 %
	EDTA	0,01 M
Ladungspuffer	Bromphenolblau	15 % (w/v)
	Ficoll (Typ 400)	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)

Tabelle 2.10.: **Puffer für die Agarosegelelektrophorese**

2.3.3.2. Durchführung der Gel-Elektrophorese

Um die PCR-Produkte ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde das Wanderungsverhalten der anionisch geladenen Nucleinsäuren im elektrischen Feld ausgenutzt. Sie wurden in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und wanderten nach Anlegen einer Gleichspannung (100-200V) in Richtung Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente von ihrer Größe abhängig. Je größer die Anzahl der Basenpaare des Fragmentes, desto langsamer kann es durch die Gelmatrix wandern. Die Porenweite der Gelmatrix ist von der Konzentration der Agarose abhängig. Da bei dieser Arbeit Fragmente mit einer Basenpaarlänge zwischen 200 und 600 aufgetrennt wurden, wurde eine 2,5%ige Agarosekonzentration für die Gele gewählt.

Die Agarose-Gele wurden in einer horizontalen Gel-Elektrophorese-Kammer, welche mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war, nach ihrer Beladung an die Spannung angelegt. Je 15 µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl Ladungspuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Der Ladungspuffer diente dabei der Beschwerung der Fragmente, um eine Herausdiffusion zu verhindern und der Abschätzung der Laufweite des PCR-Produktes. In eine flankierende Geltasche wurde 1 µl eines Größenmarkers (123 bp DNA ladder, Gibco BRL) aufgetragen, um die Fragmentlänge der Produkte abschätzen zu können. Eine zufällige Diffusion der DNA-Fragmente wird durch die Gelmatrix verhindert und ermöglicht so die Ausbildung von Banden, welche durch den in die DNA-Helix interkalierten Farbstoff Ethidium-Bromid unter UV-Licht als orange-floureszierende Bande sichtbar gemacht werden können.

2.3.4. Restriktionsenzymverdau der DNA

Da die PCR-Produkte des *MC4R* jeweils eine Länge von über 600 Basenpaaren hatten, mussten sie für die Mutationsdetektion mittels SSCP, deren Optimum bei unter 300 bp liegt, weiter gespalten werden. Die dafür verwendeten Restriktionsenzyme (Restriktions-endonukleasen) stammen aus Prokaryonten und ihre biologische Aufgabe besteht in der Spaltung fremder DNA-Moleküle. Sie erkennen spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix und schneiden beide Stränge der Helix an spezifischen Stellen. Die meisten dieser Enzyme erkennen Sequenzen aus vier bis acht Basenpaaren und spalten in dieser Region in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung. Die erkannten Sequenzen sind dabei oft Palindrome, sie zeigen also von beiden Seiten abgelesen die gleiche Sequenz, und die Schnittstellen sind meist symmetrisch angeordnet. Durch die Auswahl eines Enzyms können die durch den Verdau entstehenden DNA-Fragmentlängen variiert werden. Mit Hilfe des Online-Programms „Web-Cutter“ (www.medkem.gu.se/cutter/webcutter) der Göteborg University, Schweden, wurden geeignete Restriktions-endonucleasen ausgewählt.
Der Restriktionsverdau wurde in einem Reaktionsvolumen von 30 µl durchgeführt. Zu 15 µl des jeweiligen PCR-Produktes wurden jeweils 0,2 µl des entsprechenden Enzyms, 3 µl Puffer und *aqua bidest* bis zu einem Endvolumen von 30 µl pipettiert. Dieses Gemisch wurde 12 Stunden lang bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur im Wasserbad inkubiert. Das Fragment *MC4R*-1 (617 Basenpaare) wurde mit den Enzymen *Eco81I* und *SspI* verdaut, und so in drei kürzere Fragmente (222, 217 und 176 Basenpaare) gespalten. Das Fragment *MC4R*-2 (622 Basenpaare) wurde mit dem Enzym *MspI* ebenfalls in drei kürzere Fragmente (167, 223 und 232 Basenpaare) geschnitten. Die verwendeten Restriktionsenzyme werden mit ihrer Konzentration, ihrer Bezugsquelle und den eingesetzten Puffern in Tabelle 2.11. aufgeführt.

Enzym	Puffer	Konzentration	Hersteller
Eco 81 I	Y+/ Tango™ (mit BSA)	10 U/ µl	Fermentas (Vilnius, Litauen)
Ssp I	Y+/ Tango™ (mit BSA)	10 U/ µl	Fermentas (Vilnius, Litauen)
Msp I	Puffer grün	10 U/ µl	Eurogentec (Seraing, Belgien)

***Tab. 2.11.:* Beschreibung der Enzyme, die zur Spaltung der *MC4R* Fragmente verwendet wurden**

2.3.5. Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP)

2.3.5.1. Prinzip der SSCP

Die Einzelstrang-Konformationsanalyse (single-stranded conformation polymorphism/ analysis, SSCP/A) wurde erstmalig von Orita *et al*. (1989) beschrieben. Diese Methode dient der Erkennung von Sequenzveränderungen in bestimmten Genabschnitten. Dabei wird die Eigenschaft der DNA ausgenutzt, in Einzelstrangform eine bestimmte dreidimensionale (Tertiär-) Struktur einzunehmen, die auf der Primärstruktur des jeweiligen Stranges beruht und somit spezifisch für die entsprechende Basenabfolge ist. Schon bei Veränderung einer einzigen Base in dieser Abfolge ist in den meisten Fällen eine andere Tertiärstruktur als beim Wildtyp zu beobachten.
Je nach Tertiärstruktur wandern die Einzelstränge unterschiedlich schnell entlang des Spannungsgradienten durch ein Polyacrylamid-Gel. DNA-Einzelstränge mit gleicher Basensequenz legen also in einer bestimmten Zeit eine bestimmte Wegstrecke im Gel zurück und werden somit in gleicher Höhe des Gels nach einer Färbung sichtbar. Bei Primärstrukturveränderungen ändert sich die Laufeigenschaft des Stranges und nach der Färbung wird ein Bandenmuster sichtbar, welches sich deutlich von dem des Wildtyps unterscheidet. Da von dem veränderten Bandenmuster umgekehrt jedoch nicht auf die zugrundeliegende Änderung in der Primärstruktur geschlossen werden kann, folgt als weiterer Schritt die Sequenzierung des Genabschnitts, um die Basenänderungen zu spezifizieren. Die SSCP ist eine sehr sensitive Methode, mit der bis zu 95 % der Mutationen in entsprechend amplifizierten Genabschnitten entdeckt werden können. Eine Vorraussetzung ist jedoch die maximale Amplifikatlänge von 200 Basenpaaren (Hayashi, 1992).

2.3.5.2. Materialien und Durchführung der SSCP

Das bei der SSCP verwendete Gel wurde aus gebrauchsfertigen Lösungen Acrylamid (40 %ige Lösung) und Bisacrylamid (2 %ige Lösung) in einem Ansatz von 50 ml hergestellt (siehe Tabelle 2.12.). Die Zugabe von 500 µl Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10 %) und 34 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) zum Acryl-Bisacryl-Gemisch wurde die Polymerisation gestartet und das noch flüssige Gemisch in eine vertikale

SSCP-Apparatur (SE 600, Hoefer) mit einer Schichtdicke von 0,75 mm gegossen. Als Platzhalter für die benötigten Geltaschen diente dabei ein eingesetzter Kamm. Nach einer Auspolymerisationszeit von zwei Stunden konnte das Gel mit den Proben beladen werden.

Lösung	Menge pro 50 ml Ansatz
Acrylamid (40 %)	18,75 ml (15 %)
Bis-Acrylamid (2 %)	7,5 ml (0,3 %)
10 x TBE	2,5 ml
Aqua bidest	Zu 50 ml

Tabelle 2.12.: **Zusammensetzung des Ansatzgemisches für ein 15 %iges SSCP-Gel**

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils zu 3 µl PCR-Produkt 8 µl Ladungspuffer und 5 µl *aqua bidest* pipettiert und bei 95° C fünf Minuten lang denaturiert. Nach der Denaturierung wurde der Proben-Mix umgehend auf Eis gestellt, um das Renaturieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Von jedem Proben-Mix wurden jeweils 7 µl in die entsprechenden Taschen des SSCP-Gels aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Einzelstränge erfolgte unter optimierten Bedingungen in einer Elektrophorese-Kammer. Ein optimales Ergebnis der SSCP lässt sich durch die Variation von Lauftemperatur, Laufdauer, angelegte Spannung, Puffersystem und Zusammensetzung der Gelmatrix erreichen. Dabei wird die Sensitivität der Methode durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Lauftemperaturen (4° C und Raumtemperatur) erhöht (Orita *et al*., 1989). Durch Vorversuche und unter Berücksichtigung bereits zugrunde liegender Arbeiten mit *MC4R* Amplifikaten wurden die in Tabelle 2.13. beschriebenen SSCP-Bedingungen angewandt.

Fragment	Lauftemperatur	Verwendetes Gel	Laufzeit	Angelegte Spannung
MC4-R1	Raumtemperatur	15 % Polyacryalmid	20 h	150 V
	4° C	15 % Polyacryalmid	20 h	310 V
MC4-R2	Raumtemperatur	15 % Polyacryalmid	20 h	150 V
	4° C	15 % Polyacryalmid	20 h	310 V

Tabelle 2.13.: **Optimierte SSCP-Bedingungen**

Tabelle 2.14. zeigt die bei der Einzelstrang- Konformationsanalyse (SSCP) verwendeten Puffer.

Puffer	Reagenz	Endkonzentration
10 x TBE- Puffer (pH-Wert 8)	Tris/HCl	108 g/l
	Borat	55 g/l
	EDTA	8,3 g/l
	Deionisiertes Formamid	20 %
Ladungspuffer	Glycerin	1 %
	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylenzyanol	0,25 %
	EDTA (0,5 M)	4 %

Tabelle 2.14.: **Puffer für die SSCP**

2.3.5.3. Färben und Trocknen des SSCP-Gels

Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgte eine Silberfärbung der Gele mit Silber und deren Trocknung. Die Silberfärbung wurde nach einem modifizierten Protokoll von Budowle *et al.* (1991) durchgeführt:

1. Fixieren des Gels in 500 ml Ethanol (10 %)/ Eisessig (0,5 %)-Lösung für mindestens fünf Minuten.
2. Oxidation durch zehnminütige Schwenkung in 500 ml 1 %iger Salpetersäure und anschließender Waschvorgang mit *aqua bidest*.

3. Färbung für 20-30 Minuten in einer 12 mM Silbernitrat-Lösung, bei der sich Silberionen an die DNA anlagerten. Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit *aqua bidest*.
4. Entwicklung in einer 280 mM $NaCO_3$-Lösung mit 0,019 % Formaldehyd, bei der das Silber reduziert wurde.
5. Entwicklungsstop mit 10 %iger Essigsäure. Um Geleinrisse beim Trocknen zu vermeiden, folgte eine Schwenkung in 3 %igem Glyzerin.

Beim anschließenden Trocknen der Gele wurden diese auf Filterpapier in einem Vakuum-Geltrockner (Vaccubrand, Gießen) bei etwa 37° C etwa eine Stunde lang getrocknet.

2.3.6. DNA-Sequenzanalyse

2.3.6.1. Prinzip der Sequenzanalyse

Die Dideoxy-Sequenzierung, auch Ketten-Abbruch- oder Sanger-Methode (Sanger *et al*., 1977) genannt, nutzt enzymatische Mechanismen um DNA-Ketten unterschiedlicher Länge zu synthetisieren. Dabei stoppt die Replikation an einer der vier Basen und bestimmt so die resultierende Fragmentlänge. Es werden vier Reaktionsgemische mit folgendem Inhalt angesetzt:
1. DNA-Vorlage (Matrize), eine radioaktiv oder mit einem Farbstoff markierte Primersequenz und DNA-Polymerase. So wird eine neue DNA-Strang-Synthese an dem Punkt, an dem der Primer an die Vorlage hybridisiert, ermöglicht.
2. Vier Deoxynucleotid Triphosphate (dATP, dTTP, dCTP und dGTP), um den DNA-Strang zu verlängern.
3. Ein *Di*deoxynucleotid Triphosphat, das sich dadurch von den Deoxynucleotiden unterscheidet, dass ihm nicht nur eine, sondern beide Hydroxylgruppen fehlen, was zum Abbruch der DNA-Ketten Verlängerung führt. Das erste Reaktionsgemisch enthält beispielsweise *di*dATP, das zweite *di*dTTP, das dritte *di*dCTP und das letzte *di*dGTP.
Im zuletzt genannten Beispiel ist in dem ersten Reaktionsgefäß das Verhältnis von dATP zu *di*dATP so eingestellt, dass *di*dATP an beliebiger Stelle für eine Adenin-Position in der DNA-Matrize eingebaut wird. Im Endeffekt entstehen ganz

unterschiedlich lange Fragmente, deren Enden eine Adenin-Position in der DNA-Vorlage bedeuten. Auf diese Art wird jede einzelne Adenin-Base der Matrize durch einen Kettenabbruch gekennzeichnet. Die Fragmente werden mittels Elektrophorese getrennt, und bei einem mitlaufenden Marker wird ihre Position digital aufgezeichnet und ausgewertet, so dass man die determinierenden Sequenzen erhält. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein automatisches Sequenziergerät (LiCor 4200) der Firma MWG verwendet. Es wurden Primer mit einer kovalent angehängten Fluoreszenzmarkierung eingesetzt, die während der Elektrophorese mit einem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt wurden. Die so entstehenden Signale wurden mit einem Detektor elektronisch gemessen und mit dem Computer weiter verarbeitet.

2.3.6.2. Durchführung der Sequenzanalyse

Von dem zu sequenzierenden PCR-Produkt wurden zunächst 15 µl mit 5 µl Ladungspuffer (siehe Tabelle 2.10.) auf ein 2,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt, um den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt als Bande darzustellen. Anschließend wurde die DNA mit einer Pipettenspitze aus der entsprechenden Bande des Gels ausgestochen und in ein PCR-Reaktionsgemisch gegeben, um sie erneut zu amplifizieren. Der 100 µl Ansatz des Reaktionsgemisches enthielt dabei jeweils 2 µl (50 pmol) des Forward-s- (sequenzierungs-) und des Reverse-s-Primers, 10 µl 10 X Puffer, 2 µl MasterMix, 1 µl (20 pmol) dNTP und 0,4 µl *Taq*-Polymerase. Die Temperaturschritte bei der Amplifikation im Thermozycler glichen denen der PCR mit Standard-Primern (Tabelle 3.2.).

2.3.6.3. Materialien der Sequenzanalyse

M13- Primer:

Die in Tabelle 2.10. beschriebenen M13- Primer sind fluoreszenzmarkiert und wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Primer	Sequenz	Markierung	Konzentration
M13 universal CS (-43)	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	5' IRD 700	25 pmol/ µl
M13 reverse CS (-49)	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	5' IRD 800	25 pmol/ µl

***Tab. 2.15.*: M13- Primer für die DNA- Sequenzierung**

S- Primer:

Zur Herstellung der DNA-Matrize für die Sequenzierung wurden die in Tabelle 2.16. beschriebenen S-Primer benötigt. Sie wurden von der Firma ARK bezogen.

Primer	Sequenz	Konzentration
MC4R- 1sF	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTA TCA ATT CAG GGG GAC ACT G	25 pmol/ µl
MC4R- 1sR	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG GAC AGC ACT ACT ATC TGA GT	25 pmol/ µl
MC4R- 2sF	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTA TGC TCT CCA GTA CCA TAA CA	25 pmol/ µl
MC4R- 2sR	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG TGC AGA AGT ACA ATA TTC AGG	25 pmol/ µl

***Tab. 2.16.*: S- Primer zur Herstellung der DNA- Matrize für die Sequenzierung**

Die bei dieser PCR verwendeten Sequenzierungs-Primer (siehe Tabelle 2.16.) enthielten zusätzlich zu einer der Standard-Primer identischen Sequenz an ihrem 5'-Ende die Sequenz eines universellen M13-Primers (siehe Tabelle 2.15.). Die entstandenen Amplifikate hatten so eine zum M13-Primer komplementäre Sequenz, welche die Verwendung eines universellen M13-Sequenzierungs-Primers ermöglichte.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Protokoll des Herstellers (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Um im Anschluss ihre Konzentration zu bestimmen, wurden jeweils 4 µl der DNA-Amplifikate mit 4 µl

Ladungspuffer auf ein 2,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt. Ein in einer flankierenden Geltasche mitlaufender low DNA mass ladder (2 µl) diente als Maßstab bei der Intensitätsbestimmung der Banden unter UV-Licht. Die Konzentrationen der DNA-Amplifikate konnten so nach Herstellerangaben (Gibco BRL, Eggenstein) abgeschätzt werden. Eine Minimalkonzentration von XX wurde für die Sequenzierung vorausgesetzt.

Zur Sequenzreaktion wurden für jedes DNA-Fragment zwei getrennte Reaktionsgemische für den Forward- und Reverse-Primer angesetzt. Tabelle 2.17. zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze. Jeweils 2,5 µl des Gemisches wurden mit 1 µl Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin versetzt. Die Thermozycler-Bedingungen der nachfolgenden Sequenzierung zeigt Tabelle 2.18. Durch Zugabe von 2,5 µl Formamid loading dye wurde die Sequenzierung nach Ablauf der Zyklen im Thermocycler gestoppt.

Reagenz	**Eingesetzte Menge in 12 µl Inkubationsansatz**
DNA	75 ng
Forward- oder Reverse-Primer	1 pmol
DMSO	0,7 µl
Aqua bidest	Bis zu einem Volumen von 12 µl

Tabelle 2.17.: **Zusammensetzung des Inkubationsansatzes für die Sequenzreaktion**

Temperatur	**Dauer**	**Zyklenanzahl**
94° C	3 Min.	1
94° C	30 Sec.	25
57° C	30 Sec.	
70° C	30 Sec.	
72° C	3 Min.	1

Tabelle 2.18. : **Thermozykler-Bedingungen für die Sequenzreaktion**

Um die entstandenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde ein 6 %iges Long-Ranger-Sequenzgel (FMC, USA) verwendet. Seine Zusammensetzung beschreibt Tabelle 2.19. Das Gel wurde in eine Form (41 cm Kantenlänge und 0,25 mm Plattenabstand) gegossen, nachdem die Polymerisation des Gels durch Zugabe von 260 µl APS (10 %) und 37,5 µl TEMED gestartet wurde. Nach einer Auspolymerisationszeit von mindestens zwei Stunden konnte das Gel mit den Proben beladen werden.

Reagenz	Eingesetzte Menge in 37,5 ml Ansatz
Long Ranger (50 %)	4,5 ml (6 %)
10 X TBE	15,75 g (7 M)
Urea	3,75 ml (10 %)
Aqua bidest	Zu 37,5 ml

Tabelle 2.19.: **Zusammensetzung des Long-Ranger-Sequenzgels**

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

2.3.7. Detektion von Mutationen und Polymorphismen mit dem DHPLC-System

2.3.7.1. Prinzip des DHPLC

Mit Hilfe des DHPLC-Systems („denaturing, high pro.. liquid chromatography“) kann eine schnelle, automatische Suche nach Variationen in DNA erfolgen. Beim WAVE® System (Transgenomic, Cheshire, UK) wird ein Schmelzprofil der Doppelstrang-DNA erstellt, welches als charakteristische Spitzen („Peaks“) dargestellt wird. Da bei

heterozygoten Variationsträgern ein Verhältnis von 1:1 von Wildtyp-DNA und veränderter DNA vorliegt, bilden sich durch Hybridisierung des PCR-Produktes bei 95° C und langsamer Abkühlung Homoduplexe (Paarung komplementärer Basen) und Heteroduplexe (Paarung nicht komplementärer Basen). Werden die DNA-Stränge langsam wieder erwärmt, so erreichen die heteroduplexen Fragmente eher ihre Denaturierungstemperatur als die homoduplexen Fragmente. Dieses Verhalten wird zeitlich bei einer bestimmten Extinktionsrate gemessen und mit einem Standart verglichen. DNA-Proben mit homozygoten Mutationen müssen zuvor mit wildtypischer DNA vermischt werden. Abbildung 2.2. zeigt die Schmelzprofilerstellung mit dem WAVE® System. Die Schmelztemperaturen für die optimale Separation von Homo- und Heteroduplexen für die einzelnen PCR Produkte wurden mit der WAVEmaker software, Version 4.0, Transgenomic, erstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde das WAVE® System als neue Methode der Mutationssuche angewandt und mit den Ergebnissen der SSCP verglichen.

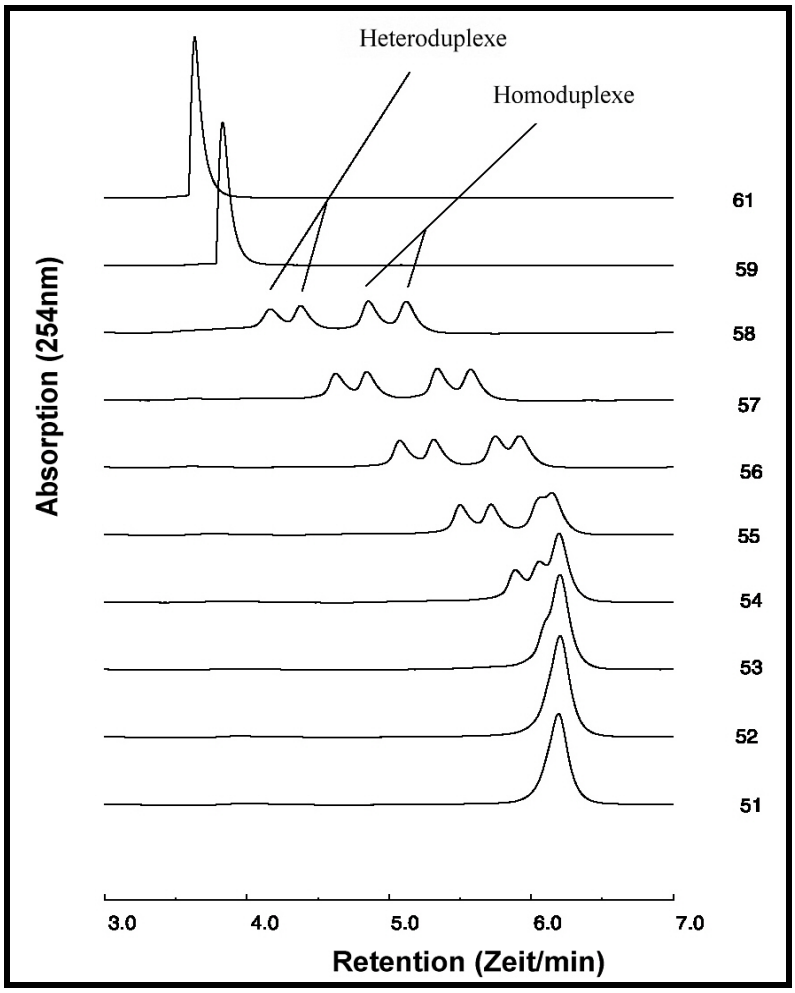


***Abbildung 2.X.*: Temperaturabhängige Auflösung von Homoduplexen und Heteroduplexen mit DHPLC (WAVE®).**

Gezeigt ist die Retention von DNA-Fragmenten. Im Beispiel ist das Ergebnis einer Trägerin einer Mutation auf dem X-Chromosom zu sehen. Ohne mutiertes Allel wären nur die homoduplexen Spitzen des Wildtyps zu sehen. Bei niedrigen Temperaturen (am rechten Bildrand angegeben) ist kein Unterschied zwischen mutierten und nicht mutierten Allelen zu sehen. Ab einer Temperatur von 54° C beginnen die heterozygoten DNA-Fragmente an der Stelle der fehlerhaften Basenpaarung zu denaturieren (modifiziert nach Taylor *et al*., 1998 und 2000).

2.3.7.2. Durchführung der DHPLC

Für die Durchführung der HPLC wird eine PCR-Reaktion gemäß Protokoll durchgeführt (siehe 2.3.2.3.), hier wird eine DNA-Menge von 12 ng verwendet. Die Zyklusanzahlen und die jeweiligen Temperaturen entsprechen ebenfalls dem PCR-Protokoll (siehe 3.2.2.1.). Dem letzten Schritt (fünf Minuten bei 72° C) schließt sich hier jedoch ein weiterer an, bei dem die DNA nochmals bei 94° C denaturiert wird und

anschließend langsam auf Raumtemperatur heruntergekühlt wird. Im nächsten Schritt werden fünf µl der PCR- Produkte in vorgewärmte spezifische Säulen (DNASep Column, Transgenomic) geladen und diesen mittels einem linearen Acetonitril Gradienten des Laufpuffers (0,1 M Triethylammonium Acetat Puffer (TEAA), pH-Wert 7,0) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min entzogen. Durch optimierte Schmelzdomänen wird ein Profil der jeweiligen Probe erstellt.

Für die Analyse des *MC4R*-1 Fragmentes wurden die PCR Produkte aus den Säulen mit ansteigender Konzentration des Puffers B (0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril) von 54 % auf 59 % in 30 Sec., und von 59 % auf 68 % in 4,5 Min. entzogen. Die Optimaltemperatur für die Schmelzdomänen des *MC4R*-1 Fragmentes betrug dabei 61° C. Für das *MC4R*-2 Fragment wurden zwei Temperaturen, 59° C und 60° C, verwendet. Der aufsteigende Transport aus den Säulen wurde bei diesem Fragment mit einer steigenden Konzentration des Puffers A (0,1 M TEAA) von 54 % auf 59 % in 10 Sec., und von 59 % auf 68 % in 4,5 Min. bewirkt. Die Dauer eines Probendurchlaufs mit 96 Proben beträt etwa 14-15 Stunden. Bei jedem Durchlauf im WAVE® -Gerät wurde eine bekannte Wildtypprobe als Maßstab mituntersucht. Die Kapillaren des Gerätes wurden nach jedem Probendurchlauf automatisch mit Laufpuffer gereinigt. PCR- Amplifikate mit mehr als einem Peak oder undeutlichem Bild in der WAVE® Analyse wurden sequenziert. Ebenso alle PCR- Produkte, die in der SSCP oder WAVE® Analyse vom Muster des Wildtyps abweichende Bilder zeigten.

Ein in der SSCP- Methode als Ile-251-Leu Polymorphismus gedeutetes Allel erwies sich dabei als Träger einer zusätzlichen Frameshift Mutation (codon 250 Deletion GA).

2.3.8. Statistische Analysen

Es wurden folgende Hypothesen angenommen:

H_0 = Die Verteilung der Allele ist unabhängig von dem Phänotyp

H_1 = Die Verteilung der Allele ist abhängig von dem Phänotyp (Assoziation)

Der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT)

Der TDT nutzt die Information der elterlichen Allele, die nicht an das erkrankte Kind weitervererbt wurden. Zum anderen nutzt er zusätzlich die Kopplungsinformation bei der Verteilung der elterlichen Allele bei der Vererbung (Segregation) (Spielman *et al*., 1993). Die Ergebnisse der Allelverteilung werden in die T/NT- Tabelle nach Ott eingetragen (siehe Tabelle 2.20.), aus dieser Tabelle wird die TDT-Statistik berechnet.

	Transmittiert		
Nicht transmittiert		Allel A	Nicht Allel A
	Allel A	a	b
	Nicht Allel A	c	d

***Tab. 2.20*.: Vierfeldertafel des TDT (Ott, 1989)**

Informativ sind dabei nur Familien, in denen mindestens ein Elternteil am Markerlocus für das mutmaßlich mit der Krankheit assoziierte Markerallel heterozygot ist. Das Problem der Populationsschichtung wird in diesem Testverfahren umgangen, indem nur Trios (Proband und seine Eltern) untersucht werden. Die elterlichen nicht transmittierten Allele dienen dabei als „interne Kontrollen".
Ob eine signifikante Assoziation vorliegt, kann mit dem χ^2 -Test überprüft werden:

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

Zu beachten sind dabei folgende Nachteile des TDT:

a) Auch beim TDT können Assoziationen, die durch Kopplungsungleichgewichte verursacht werden, nicht von solchen unterschieden werden, bei denen der Marker selbst eine funktionelle Relevanz hat und somit ein prädisponierender Faktor ist.
b) Der TDT ist arbeitsaufwendiger als übliche Fall-Kontrollstudien, da aus den Familien jeweils drei Mitglieder typisiert werden müssen.

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

2.4. Zur Entstehung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist als Teil eines Projektes zu betrachten, das sich mit Kandidatengenen beschäftigt, welche eine potentielle Rolle bei der Entstehung von Adipositas spielen. Neben dieser Arbeit wurden weiterhin zusammen mit den Codoktoranden Anne Hoch und Benjamin Antwerpen die Kandidatengene Calpain-10 und Ghrelin auf Mutationen im vorhandenen Probandenkollektiv untersucht. Angefertigt wurden diese Arbeiten im molekulargenetischen Labor der DFG-Klinischen Forschergruppe der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Universität Marburg unter der Laborleitung von Dr. Anke Hinney und unter der Leitung von Prof. Dr. Johannes Hebebrand.
Einführung und Optimierung der DHPLC- Methode mit dem WAVE® -Gerät wurde hauptsächlich von Gerti Gerber, Biologisch-technische Assistentin der Klinischen Forschergruppe, übernommen.

Die Auswertungen der biometrischen Daten wurden von Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie und Epidemiologie (Prof. Dr. Andreas Ziegler, Dipl.-Stat. Frank Geller, Prof. Dr. Helmut Schäfer) durchgeführt.
Die funktionellen pharmakologischen Studien zu den in dieser Arbeit neu detektierten Mutationen wurden vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Gudermann und seinen Mitarbeitern Sarah Hohmann und Dr. Claudia Hess übernommen.

3. Ergebnisse

3.1. Übersicht

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, das der Melanocortin 4 Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes spielt (siehe Einleitung). In welcher Form Veränderungen des *MC4R* die Entstehung von Adipositas begünstigen können, ist bisher nicht vollständig geklärt. Molekulargenetische Screening-Untersuchungen auf *MC4R* Varianten bei verschiedenen Probandengruppen konnten jedoch Ergebnisse zu Frequenzen und Genprodukten einiger Varianten aufweisen. Bisherige Arbeiten zeigen eine Mutationsfrequenz des *MC4R* bei adipösen Probandengruppen von durchschnittlich 2-5 %, bei Kontrollgruppen konnten diese Mutationen nur in seltenen Fällen detektiert werden (Branson *et al*., 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Gotoda *et al*., 1997; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Marti *et al*., 2003; Mergen *et al*., 2001; Vaisse *et al*., 2000; Yeo *et al*., 2003). In bisher nur einer Studie (Jakobson *et al*., 2002) war die Frequenz der gefundenen Mutationen sowohl bei der adipösen Studiengruppe als auch bei der Kontrollgruppe mit etwa 1,5 % gleich. Die Frequenz der bisher entdeckten Polymorphismen Val-103-Ile (Branson *et al*., 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000; Gotoda *et al*., 1997; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Marti *et al*., 2003; Vaisse *et al*., 2000;), Ile-251-Leu (Branson *et al*., 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Marti *et al*., 2003; Vaisse *et al*., 2000;), sowie die stummen Mutationen A405C, C408T, G468A, C579T, C593T, T636C (Branson *et al*., 2003; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Jacobson *et al*., 2002; Vaisse et al., 2000) wurden bei den adipösen Probandengruppen mit durchschnittlich 2-6 %, bei den Kontrollgruppen mit durchschnittlich 3-7 % angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den extrem adipösen Kindern und Jugendlichen und deren Eltern *MC4R* in seiner gesamten kodierenden Sequenz systematisch auf Mutationen untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen von 520 adipösen Kindern und Jugendlichen sind zum einen als Fortsetzung einer bereits veröffentlichten Arbeit (Hinney *et al*., 1999) der Klinischen Forschergruppe zu betrachten, durch die nun insgesamt 808 extrem adipöse Kinder und Jugendliche untersucht wurden, zum anderen wurden erstmalig die Elternpaare der 520 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen molekulargenetisch auf Variationen im *MC4R*

untersucht. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf Befunde der 520 neu untersuchten Familientrios aus dem Kollektiv der Klinischen Forschergruppe.

Insgesamt wurden im Patientenkollektiv von 520 adipösen Kindern und Jugendlichen sowie deren Eltern 24 Mutationsträger (davon 11 Indexpatienten) und 13 verschiedene Mutationen detektiert, wobei drei Mutationen bei jeweils zwei Indexpatienten und jeweiligem Elternteil vorkamen. Drei der Indexpatienten wiesen zwei Mutationen gleichzeitig auf (Ser-127-Leu + Arg-165-Trp sowie in zwei Fällen Tyr-35-Stop + Asp-37-Val), ebenso zwei Elternteile (in beiden Fällen Tyr-35-Stop + Asp-37-Val). Zusätzlich wurden zwei bei den Eltern detektierte Mutationen nicht auf die Indexpatienten weitergegeben.

Unter den 11 Patienten der 520 adipösen Kindern und Jugendlichen konnten 11 *MC4R* Varianten (Ser-30-Phe, Tyr-35-Stop, Asp-37-Val, Val-95-Ile, Ile-121-Thr, Ser-127-Leu, Arg-165-Trp, Deletion an Codon 211, Ala-244-Glu, Deletion an Codon 250, Ile-317-Thr) gefunden werden, welche Veränderungen am Genprodukt hervorrufen, sowie eine stumme Mutation (C579T) und zwei verschiedene stumme Mutationen bei insgesamt vier Elternteilen (A405C und C579T). Sechs Indexpatienten und ebenso viele Elternteile wiesen bereits bekannte Mutationen (Ser-30-Phe, Tyr-35-Stop, Asp-37-Val, Arg-165-Trp, Deletion an Codon 211, Ile-317-Thr aus Hinney *et al*., 1999) auf. Es wurden außerdem fünf bisher nicht beschriebene Varianten des *MC4R* (s. u.) bei den adipösen Kindern und Jugendlichen und ihren Eltern sowie zwei neue Varianten (Ser-94-Arg und Deletion T an Codon 320) nur bei den Elternteilen gefunden (eine Übersicht zu den Mutationen zeigen die Tabellen 3.1. und 3.2.). Es wurden bei 14 adipösen Indexpatienten und 48 Eltern bereits bekannte Polymorphismen (Val-103-Ile und Ile-251-Leu) des *MC4R* detektiert. Alle in dieser Arbeit gefundenen Mutationsträger waren heterozygot.

Alle im Folgenden beschriebenen Mutationen und Polymorphismen wurden mit der SSCP-Methode bei 4° C (siehe S.19, Methodenteil) als Auffälligkeiten erkannt und durch Sequenzierung (Sequenzer) spezifiziert. Mit Hilfe des WAVE® Systems wurden bei sequenzierten Varianten der Patienten die übrigen Familienmitglieder auf diese Veränderung hin untersucht. Bei dem WAVE® System wird doppelsträngige DNA in einer Länge von 50-2000 Basenpaaren effizient getrennt. Die UV Detektion des WAVE® Systems ist bis auf 0,5 ng DNA/Peak genau und somit sensitiver als andere Methoden, die Vorraussetzung zur Anwendung des WAVE® Systems ist

jedoch die Kenntnis über die wildtypische Basenabfolge. Eine Sequenzierung zur Spezifizierung der Mutation ist auch bei dieser Methode unumgänglich. Eine in der SSCP als Polymorphismus interpretierte DNA-Probe ergab bei der WAVE® Analyse eine Missense-Mutation (Gly-181-Asp). Bei einer anderen Probe wurde mittels Wave® System eine Deletion von zwei Basenpaaren (Codon 250/251) zusätzlich zum Polymorphismus (Ile-251-Leu) gefunden, was bei der Auswertung der SSCP-Gele nicht zu erkennen war.

Mutation	**Phänotyp des Mutationsträgers**				**Trans-mittierender Elternteil**	**BMI-Perzentile des trans-mittierenden Elternteils**
	Geschlecht	**Alter (J.)**	**BMI (kg/m^2)**	**BMI-Perzentile**		
Ile-317-Thr	m	17	36,5	100.	Vater	86.
Deletion 211	w	20	42,0	100.	Mutter	100.
Deletion 211	w	7	32,4	100.	Mutter	100.
Ser-127-Leu	w	11	48,5	100.	Mutter	100.
Arg-165-Trp					Vater	86.
Tyr-35-Stop	m	8	26,2	98.	Vater	Nicht bekannt
Asp-37-Val						
Tyr-35-Stop	w	13	43,3	100.	Vater	100.
Asp-37-Val						
Val-95-Ile	w	14	43,0	100.	Mutter	85.
Deletion 250	w	13	27,9	99.	Vater	88.
Ala-244-Glu	w	11	31,3	100.	Vater	96.
Ile-121-Thr	w	10	28,1	100.	Mutter	88.
Ser-30-Phe	w	9	28,8	100.	Vater	44.

Tab. 3.1.: **Indexpatienten, deren Mutation von einem Elternteil transmittiert wurde**

Mutation	Phänotyp des elterlichen Mutationträgers			
	Geschlecht	Alter	BMI (kg/m^2)	BMI-Perzentile
Deletion 320	w	61	29,4	86.
Ser-94-Arg	m	42	32,5	96.

***Tab. 3.2.*: Beschreibung der elterlichen Mutationsträger, die das mutierte Allel nicht weitergegeben haben**

3.2. Mutationen im *MC4R* bei Indexprobanden

„Frameshift"-Mutationen

Drei der insgesamt 10 gefundenen Mutationen (Codon 211 Deletion CTCT, Codon 250 Deletion GA und Codon 320 Deletion T) werden als „frameshift"-Mutationen bezeichnet. „Frameshift"-Mutation bedeuten die Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren, die in ihrer Anzahl kein Vielfaches von drei sind und somit eine Leserasterverschiebung in der DNA-Sequenz verursachen.

Codon 211 Deletion CTCT:

Mittels SSCP wurde bei der Untersuchung des PCR-Fragmentes *MC4R*-2 bei zwei Patienten und jeweils einem Elternteil (siehe Tabelle 3.1.) eine spezifische Veränderung des Basenmusters identifiziert. Abbildung 3.1. zeigt das im Vergleich zum Wildtyp veränderte Basenmuster. Durch die anschließende Sequenzanalyse der entsprechenden DNA konnte eine Deletion (Verlust eines DNA-Abschnittes) der Basen CTCT an Stelle des Codons 211 spezifiziert werden (siehe Abbildung 3.2.). Diese Mutation verursacht einen Abbruch des DNA-Leserasters im für die fünfte transmembranäre Domäne des Rezeptors kodierenden Bereich. Die Codon 211 Deletion CTCT ist bereits beschrieben worden (Hinney *et al*., 1999 und Farooqi *et al*., 2000) (siehe auch Tabelle 1.3. der Einleitung).

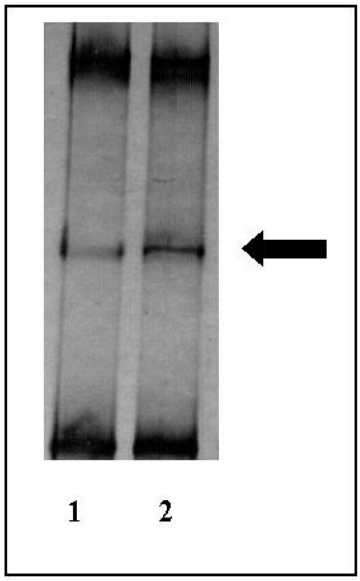


***Abbildung 3.1.*: SSCP-Gel der Deletion CTCT an Codon 211.** Der Pfeil zeigt die im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahn 1) versetzte Bande bei der Probe des Mutationsträgers (Laufbahn 2).

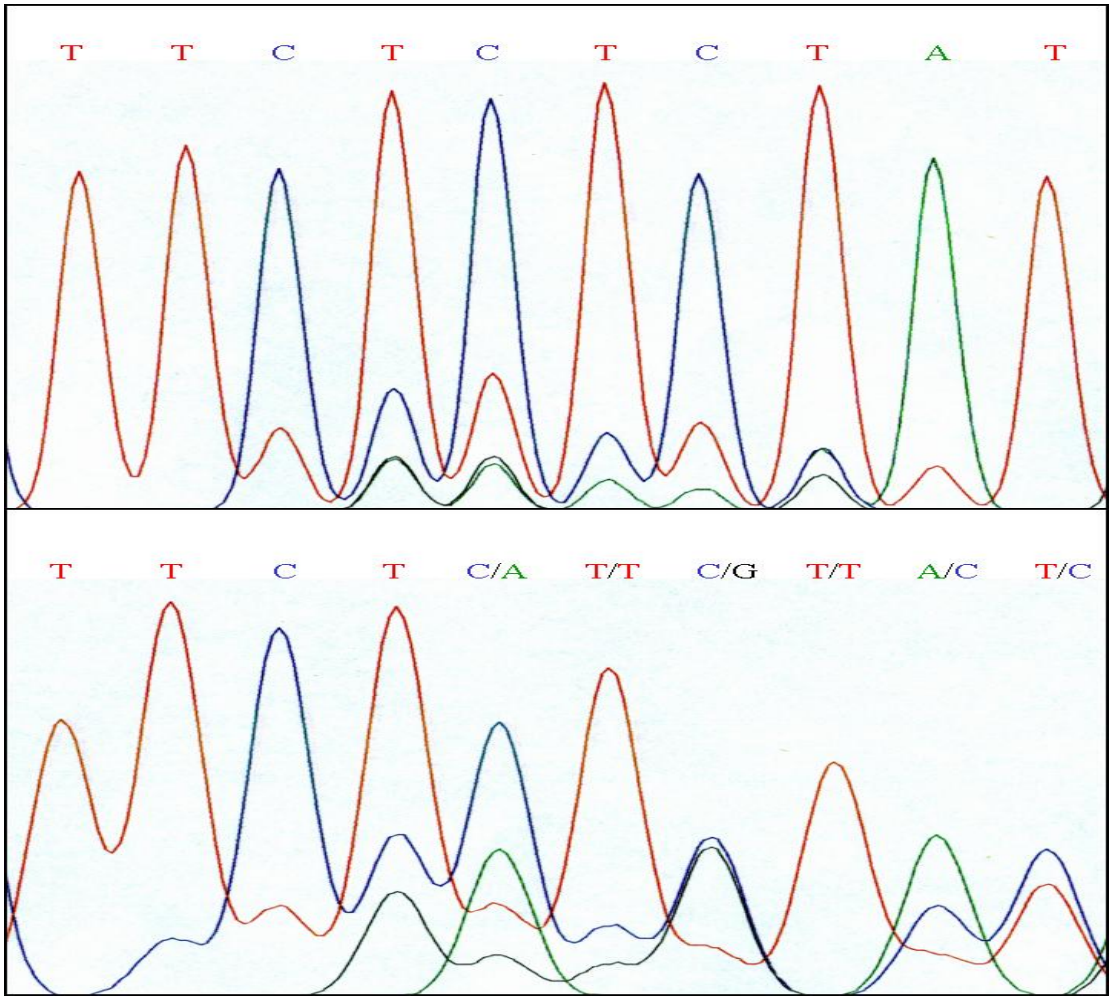


***Abbildung 3.2.*: Sequenzanalyse der CTCT Deletion an Basenstellen 631-634 (Codon 211).** Im oberen Teil der Abbildung ist die Basensequenz eines Wildtyps zu sehen, in der unteren Bildhälfte ist die Sequenz des Mutationsträgers der CTCT Deletion dargestellt. Erkennbar wird die Leserasterverschiebung durch die fehlenden vier Basen auf einem Allel.

Codon 250 Deletion GA:

Bei einer Patientin und deren Vater (siehe Tabelle 3.1.) wurden mittels SSCP und nachfolgender Sequenzanalyse des *MC4R*-2 eine Deletion der Basen GA an Stelle des Codons 250 entdeckt. Diese Mutation verursacht, ähnlich der anderen „frameshift"-Mutation, einen Abbruch des DNA-Leserasters. Betroffen ist der Bereich, welcher für die sechste transmembranäre Domäne des *MC4R* kodiert. Abbildungen 3.3. und 3.4. zeigen die Ergebnisse der SSCP und der Sequenzanalyse.

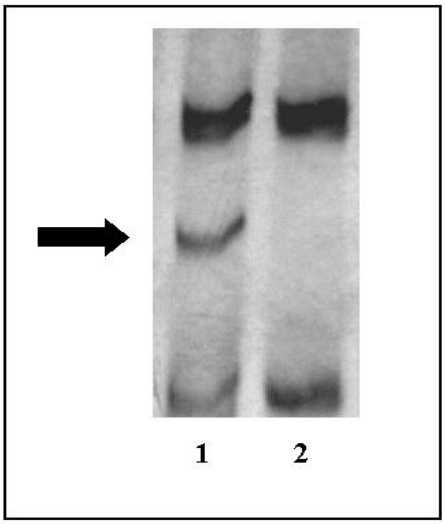


***Abbildung 3.3.*: SSCP der Deletion GA in Codon 250.** Die zusätzliche Bande, welche durch das mutierte Allel entsteht, ist durch einen Pfeil markiert (Laufbahn 1). Im Vergleich in Laufbahn 2 das Bandenmuster des Wildtyps.

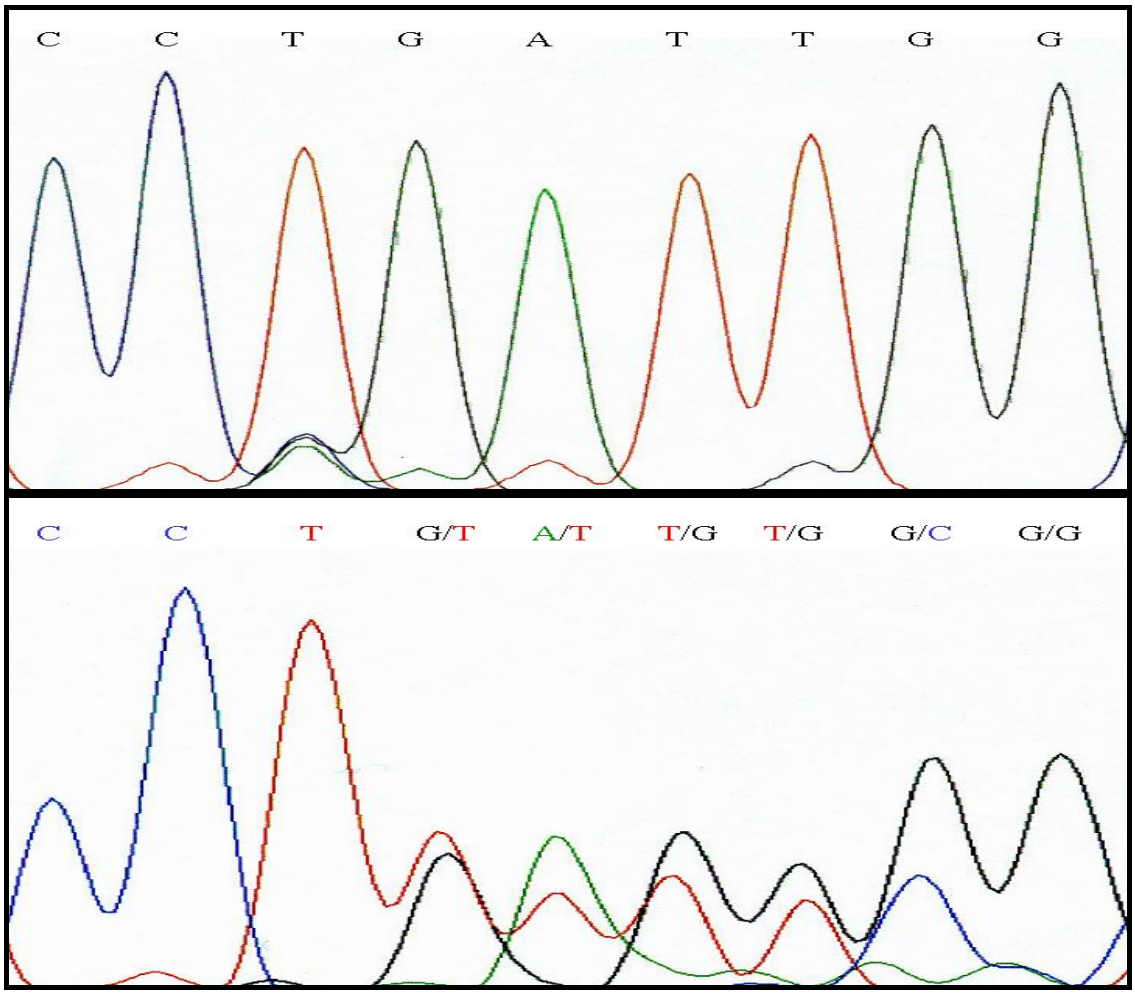


***Abbildung 3.4.*: Sequenz der Deletion GA an Codon 250.** Der obere Teil der Abbildung zeigt die wildtypische Sequenz, der untere Teil stellt das Sequenzierungsergebnis eines Trägers der Deletion GA an Codon 250 dar. Die durch den Wegfall der beiden Aminosäuren bedingte Verschiebung des DNA-Leserasters ist deutlich zu erkennen.

Codon 320 Deletion T:

Bei der Mutter eines Indexpatienten wurde eine Deletion der Base T an Stelle des Codons 320 gefunden, welches ursprünglich für die Aminosäure Tyrosin im intrazellulären Endteil des Rezeptors kodiert. Diese Deletion wurde nicht auf den Indexprobanden transmittiert. Die Ergebnisse des SSCP-Gels und der Sequenzierung zeigen die Abbildungen 3.5. und 3.6., die BMI- Perzentile der Mutter ist in Tabelle 3.2. beschrieben.

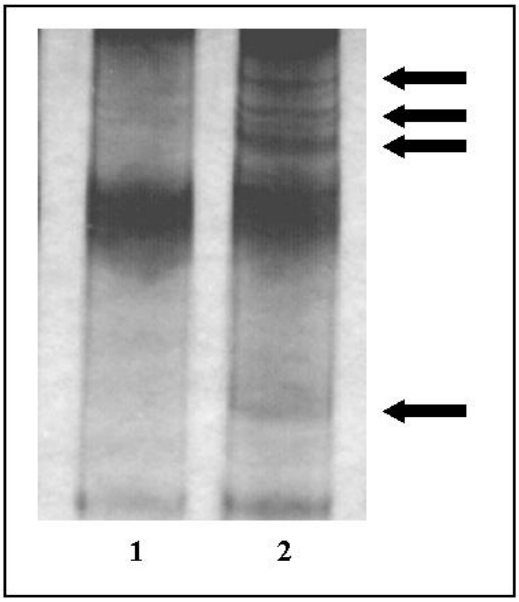


Abbildung 5.5.: **Nachweis der Deletion T Codon 320.** Das SSCP-Gel mit Probenauftrag des MC4R-2 Fragmentes zeigt zusätzliche Banden (durch Pfeile markiert) in Lauftasche 2 im Vergleich zum Wildtyp in Lauftasche 1. Dabei handelt es sich um eine Deletion der Base T in Codon 320. Diese Frameshift-Mutation wurde bei der Mutter (Tabelle 3.2. des Ergebnisteils) eines Indexprobanden detektiert. Auf den Indexprobanden wurde diese Deletion nicht transmittiert.

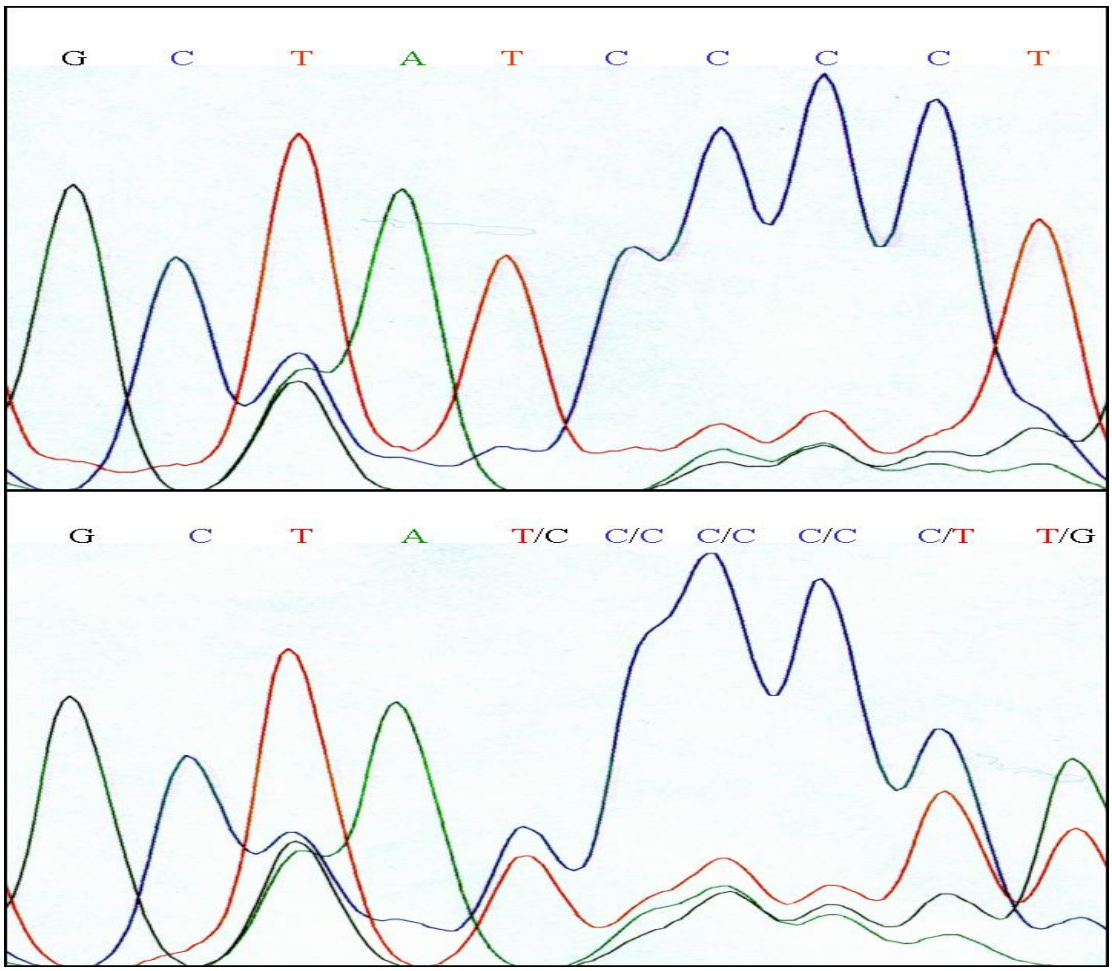


Abbildung 3.6.**: Sequenzierungsergebnis der Trägerin der Deletion T an Basenstelle 960 (Codon 320), Fragment *MC4R*-2.** In der oberen Abbildung ist die Frequenz des Wildtyps zu erkennen, in der unteren Abbildung sieht man die Leserasterverschiebung auf einem Allel, die durch die Deletion einer Base entstanden ist.

„Nonsense“-Mutation

Eine weitere Mutation (Tyr-35-Stop) des *MC4R* wird als nonsense-Mutation bezeichnet, da das durch die Mutation neu entstandene Codon als Stop-Codon gelesen wird. Zugrunde liegt ein Basenaustausch (Cytosin→Adenin) an Position 105 der Nukleotidsequenz. Physiologisch bezeichnen Stop-Codons bei jedem DNA-Ablesevorgang das Ende des abzulesenden Abschnitts. In diesem Fall verursacht das entstandene Stop-Codon einen nicht vorgesehenen Abbruch der durch den DNA-Ablesevorgang entstehenden Aminosäurekette an ihrem N-terminalen Ende (an Position 35). Bei zwei Indexpatienten des neu untersuchten Kollektivs und deren Vätern wurde diese erstmalig 1999 beschriebene Mutation (Hinney *et al*., 1999) gefunden. Alle vier Personen zeigten neben der Tyr-35-Stop Mutation eine Missensemutation an Codon 37 (Aminosäureaustausch von Aspartat zu Valin), welche auf einer Punktmutation (Adenin→Thymin) beruht. Bei diesen in Verbindung auftretenden Mutationen ist von einem Haplotypen auszugehen (Hinney *et al*., 1999). Abbildung 3.7. zeigt die auffällige Bandenmusterveränderung bei der SSCP des Fragmentes *MC4R*-1, Das Ergebnis der Sequenzanalyse ist in Abbildung 3.8. dokumentiert.

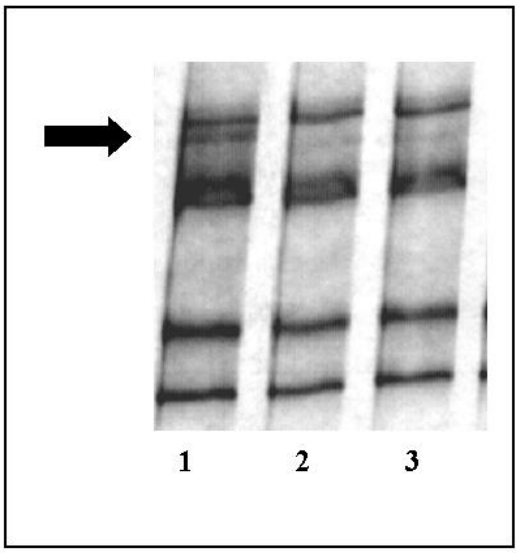


***Abbildung 3.7.*: SSCP der gekoppelt vererbten Mutationen Tyr-35-Stop und Asp-37-Val.** Der Pfeil markiert das veränderte Basenmuster des Mutationsträgers (Laufbahn 1) im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahnen 2 und 3).

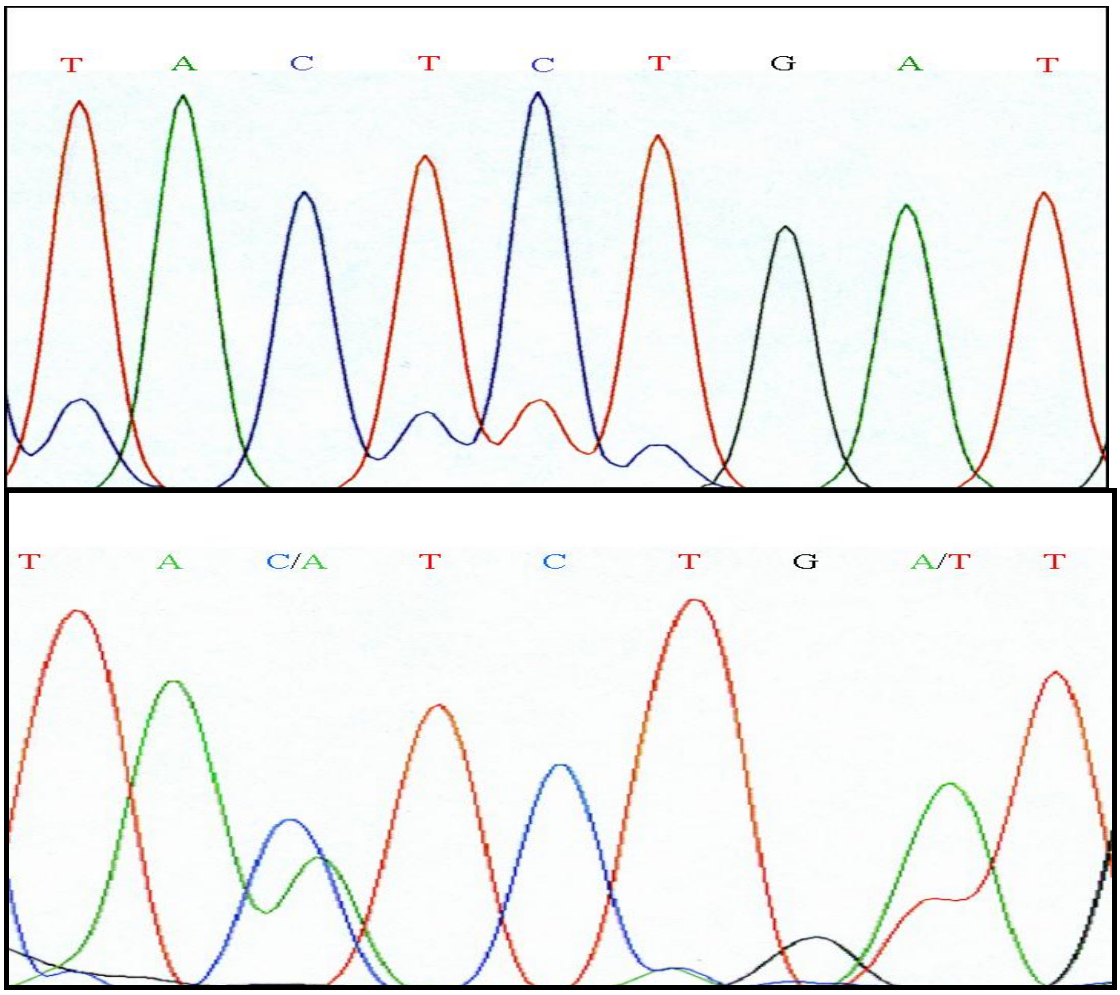


Abbildung 3.8. **: Sequenzierungsergebnisse des Trägers zweier Mutationen (Tyr-35-Stop und Asp-37-Val).** Die obere Abbildung zeigt die Sequenz des Wildtyps. In der unteren Abbildung ist ein heterozygoter Träger zweier Punktmutationen dargestellt. Es hat ein Austausch der Basen Cytosin zu Adenin an Stelle 105 (Codon 35) stattgefunden, und ein weiterer Austausch der Basen Adenin zu Thymin an Stelle 110 (Codon 37).

„Missense“-Mutationen

Bei acht Patienten und jeweils einem Elternteil wurden Missense-Mutationen festgestellt. Eine Missense-Mutation drückt aus, dass das neu entstandene Codon für eine andere Aminosäure als das ursprüngliche Codon kodiert. Einen Überblick über die phänotypischen Merkmale der Mutationsträger gibt Tabelle 3.1., Tabelle 1.3. der Einleitung zeigt bereits beschriebene Mutationen weiterer Arbeitsgruppen im Überblick.

In Verbindung auftretende Mutationen:

Bei zwei immer in Verbindung auftretenden Mutationen stehen diese im Verdacht, einen Haplotyp zu formen, also gekoppelt vererbt zu werden. Bei Betrachtung der transmittierenden Elternteile zeigt sich, ob ein Doppelmutationsträger beide Mutationen von einem Elternteil oder jeweils eine Mutationen von Vater und Mutter vererbt bekommen hat. Dieses elterliche Transmissionsmuster macht deutlich, ob zwei Veränderungen gehäuft in Verbindung vererbt werden. Bereits erwähnt wurden die gekoppelt auftretenden Mutationen Tyr-35-Stop und Asp-37-Val (siehe oben).
Eine Patientin (siehe Tabelle 3.1.) zeigte Compound-Heterozygotie für zwei Mutationen. Sie war Trägerin der Mutationen Ser-127-Leu (von der Mutter transmittiert) und Arg-165-Trp (vom Vater transmittiert). Somit liegt kein Haplotyp vor. Die folgenden Abbildungen 3.9. und 3.11. zeigen die Ergebnisse der SSCP von Fragment *MC4R*-1 (Ser-127-Leu) und Fragment *MC4R*-2 (Arg-165-Trp) der gleichen Patientin. Abbildungen 3.10 und 3.12 zeigen die Sequenzierungsergebnisse.

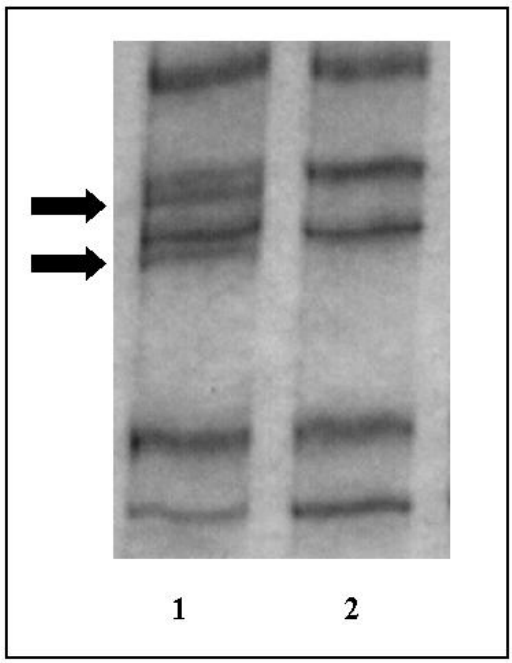


Abbildung 3.9.: SSCP der Doppelmutationsträgerin mit den Varianten Ser-127-Leu und Arg-165-Trp, Fragment MC4-R-1. In dieser Abbildung ist die Mutation Ser-127-Leu auf Fragment MC4-R-1 zu erkennen. Die Pfeile markieren die auffälligen Zusatzbanden, die beim Probenlauf der Mutationsträgerin (Laufbahn 1) im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahn 2) imponieren.

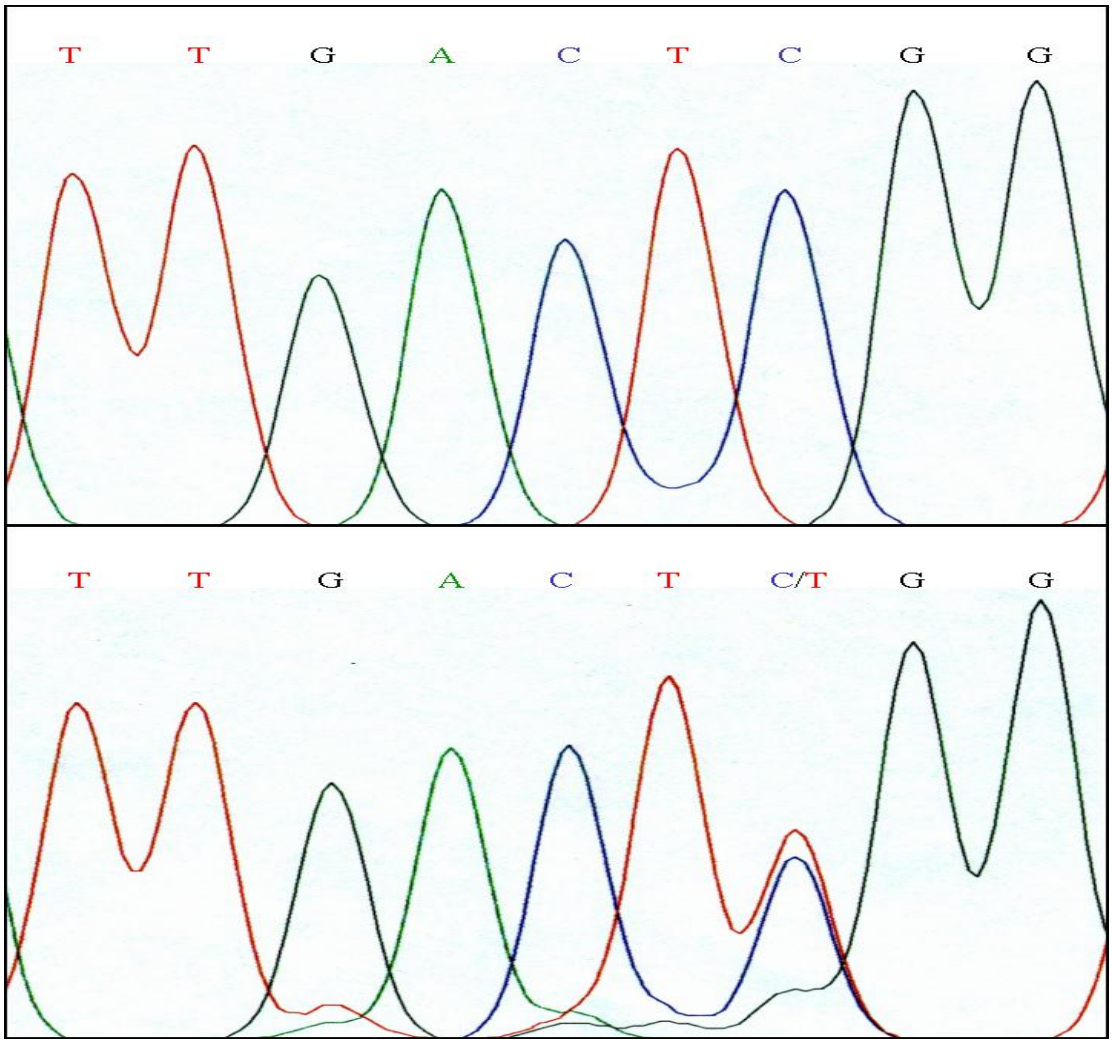


***Abbildung 3.10.*: Sequenzierungsergebnis der Mutationsträgerin Ser-127-Leu, Fragment *MC4R*-1.** In der oberen Abbildung ist die Sequenz des Wildtyps zu erkennen, in der unteren wird der Basenaustausch (C→T) an Stelle 380 (Codon 127) auf einem Allel deutlich. Die Mutter der bereits oben erwähnten Doppelmutationsträgerin ist heterozygot für diese Mutation und hat sie auf ihre Tochter transmittiert (siehe Tabelle 3.1. im Ergebnisteil).

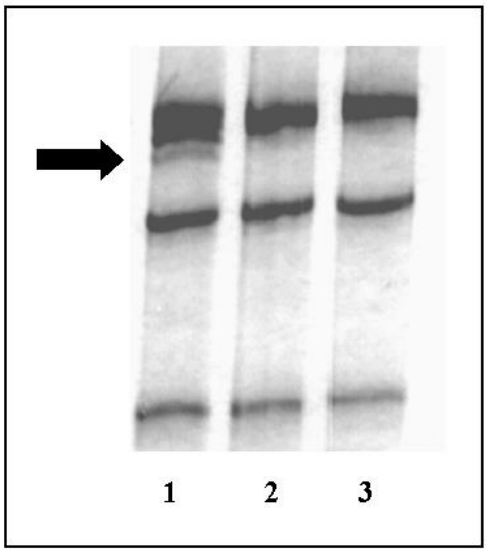


***Abbildung 3.11.*: SSCP der Doppelmutationsträgerin mit den Varianten Ser-127-Leu und Arg-165-Trp, Fragment MC4-R-2.** In diesem Fragment wird die Mutation Arg-165-Trp gezeigt. Die Zusatzbande in Laufbahn 1 (Mutationsträgerin) wird durch einen Pfeil markiert, Laufbahnen 2-3 zeigen im Vergleich das Bandenmuster des Wildtyps.

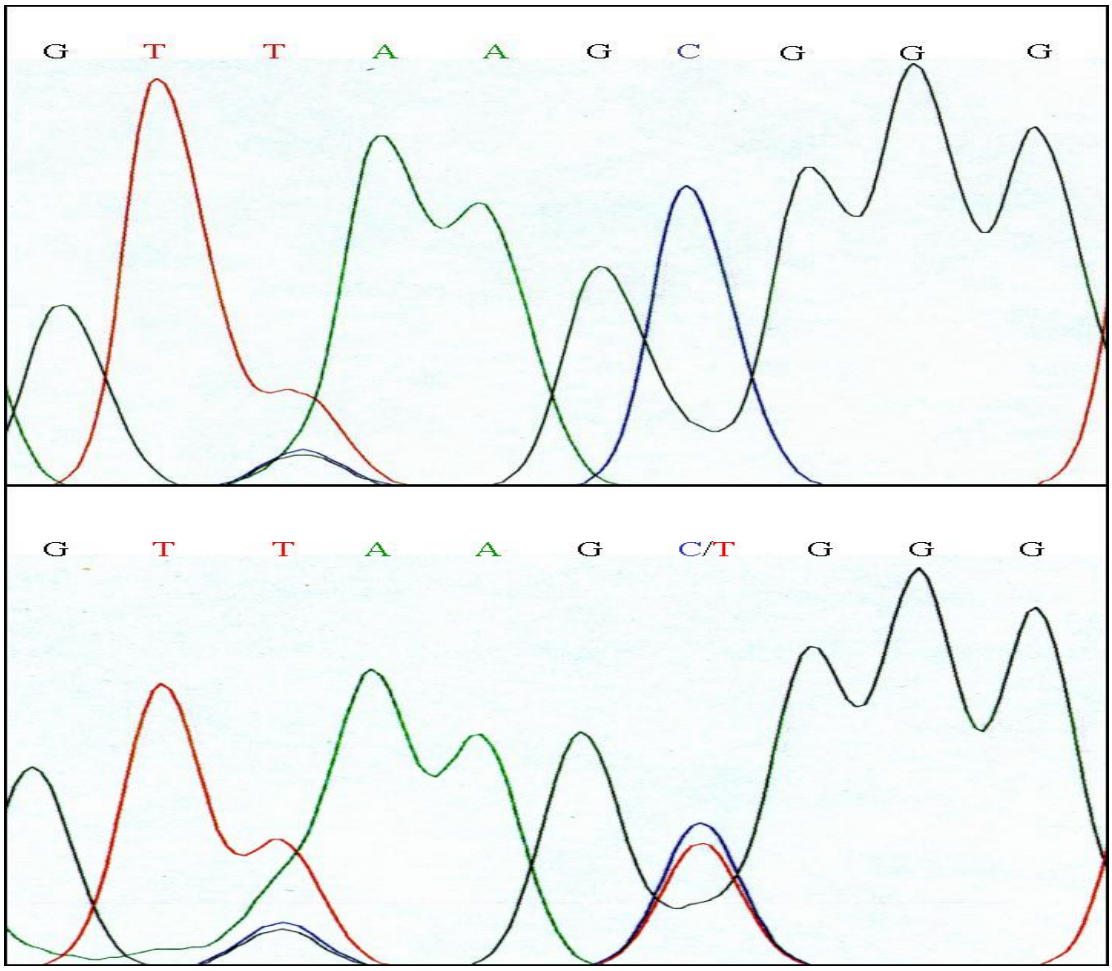


Abbildung 3.12. **: Sequenzierungsergebnis des Mutationsträgers Arg-165-Trp, Fragment *MC4R*-2.** Durch einen Punktaustausch von C zu T an Basenstelle 493 (Codon 165) auf einem Allel kommt der heterozygote Aminosäureaustausch zustande (unteres Bild). Zum Vergleich ist im oberen Bild das Ergebnis der Sequenzanalyse des Wildtyps dargestellt. Der väterliche Mutationsträger hat diese Mutation auf die Indexpatientin transmittiert (siehe Tabelle 3.1. im Ergebnisteil). Die Tochter ist außerdem Trägerin der Ser-127-Leu Mutation auf *MC4R*-2 Fragment, welche sie von der Mutter übernommen hat (siehe Tabelle 3.1. im Ergebnisteil).

Die folgenden gezeigten Missense Mutationen wurden bei den Patienten und/ oder bei den Eltern der Patienten dedektiert. Eine Übersicht ist in Abschnitt 3.1. und in den Tabellen 3.1. und 3.2. gegeben.

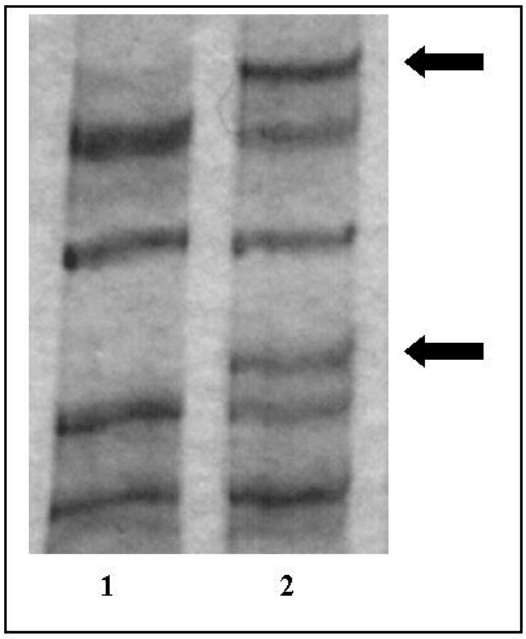


***Abbildung 3.13.*: Nachweis der Ser-30-Phe Mutation mittels SSCP.** Das SSCP-Gel des MC4-R-1 Fragmentes zeigt in Laufbahn 2 zusätzliche Banden im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahn 1). Es handelt sich um einen Basenaustausch (T→G), welcher einen Aminosäurenaustausch (Serin→Phenylalanin) an Stelle des Codons 30 bewirkt. Diese Mutation wurde bei einem Indexprobanden und dessen Vater gefunden.

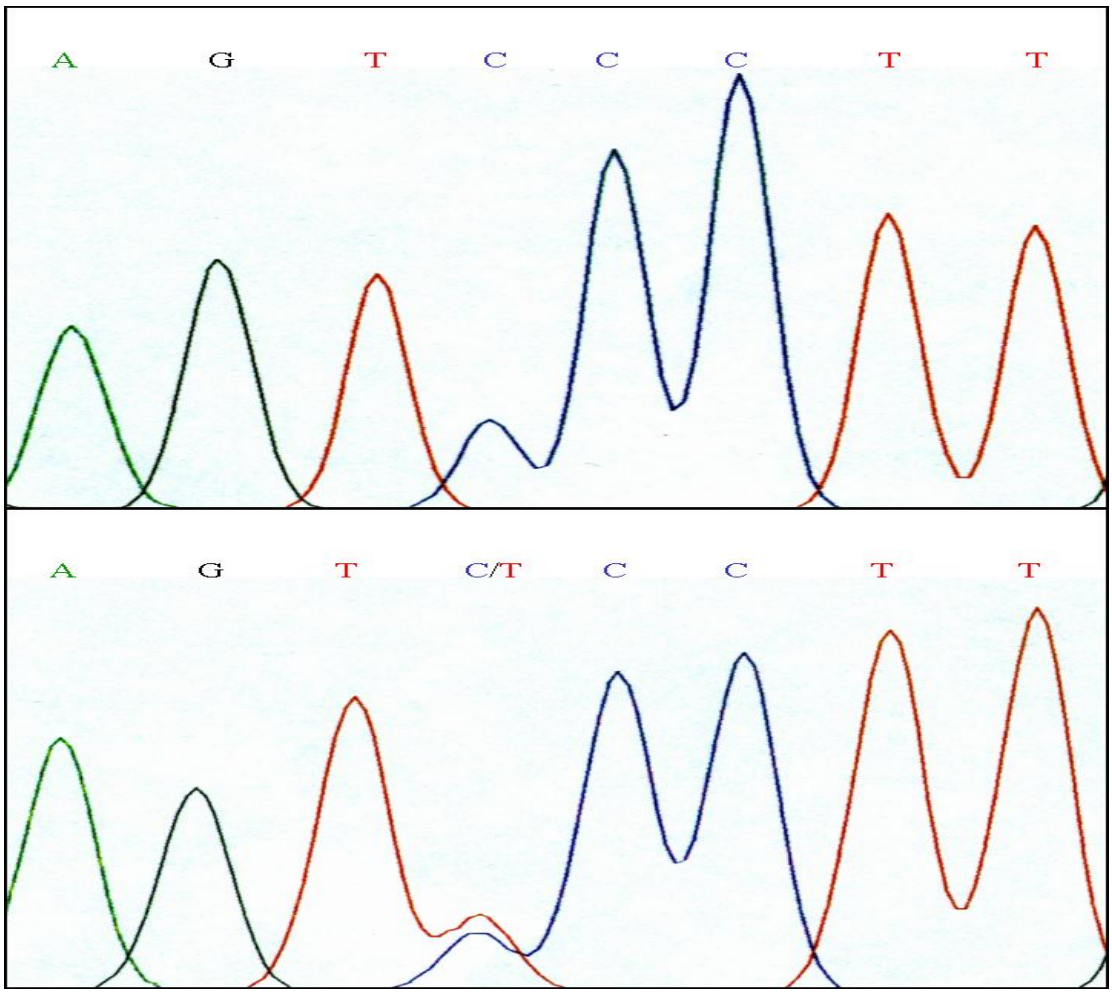


***Abbildung 3.14.*: Sequenzierungsergebnis des Trägers der Ser-30-Phe Mutation.** Der Austausch von Cytosin zu Thymin an Basenstelle 89 (Codon 30) auf einem Allel ist in der unteren Abbildung zu erkennen. Die wildtypische Sequenz zum Vergleich zeigt die obere Abbildung.

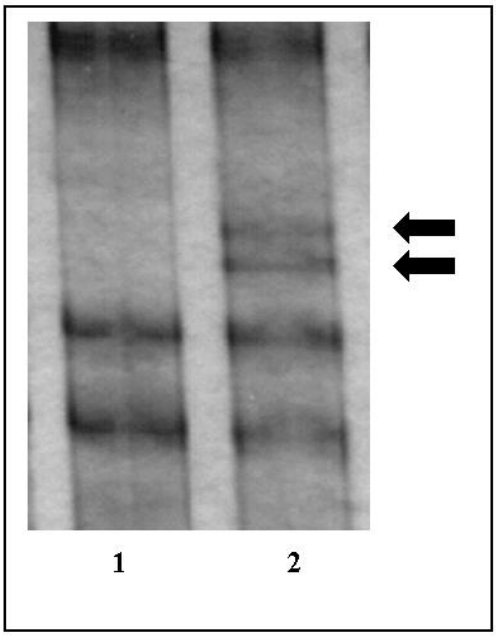
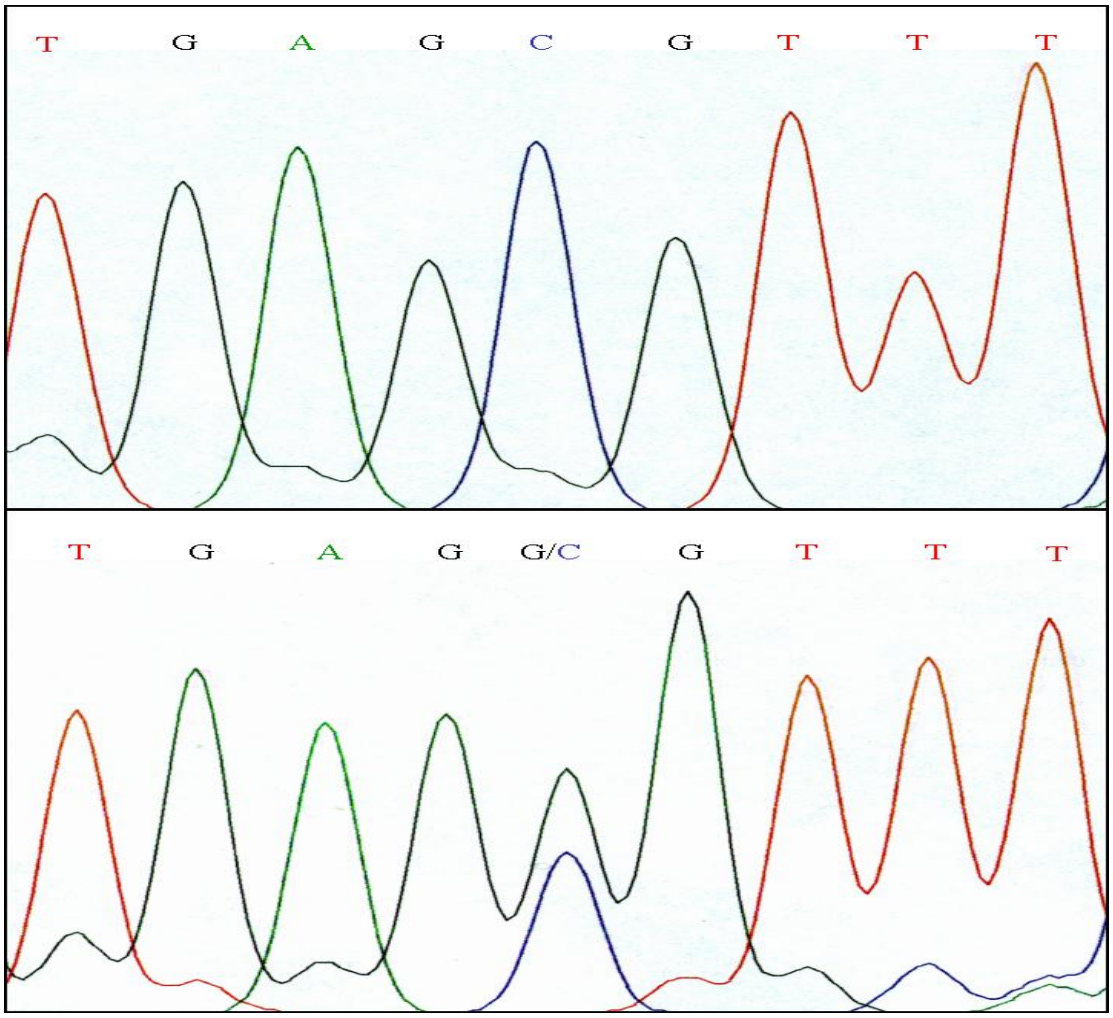


***Abbildung 3.15.*: Nachweis der Ser-94-Arg Mutation mittels SSCP.** Der SSCP-Nachweis des MC4-R-1 Fragmentes zeigt im Vergleich zu dem wildtypischen Bandenmuster (Laufstrecke 1) zusätzliche Doppelbanden (durch zwei Pfeile markiert) in der Laufbahn 2 mit der Probe des Mutationsträgers. Es handelt sich um einen Basenaustausch (C→G), welcher einen Aminosäureaustausch (Seronin→Arginin) in Codon 94 bewirkt. Diese Variante wurde nur bei dem Vater eines Indexprobanden (siehe Tabelle 3.2.) gefunden. Auf den Indexprobanden wurde diese Veränderung nicht transmittiert.



***Abbildungen 3.16.*: Sequenzierungsergebnis der Ser-94-Arg Mutation.** In der oberen Abbildung ist die Sequenz des Wildtyps zu erkennen, in der unteren wird der heterozygote Mutationsträger dargestellt. Auf einem Allel hat eine Punktmutation (C→G) stattgefunden.

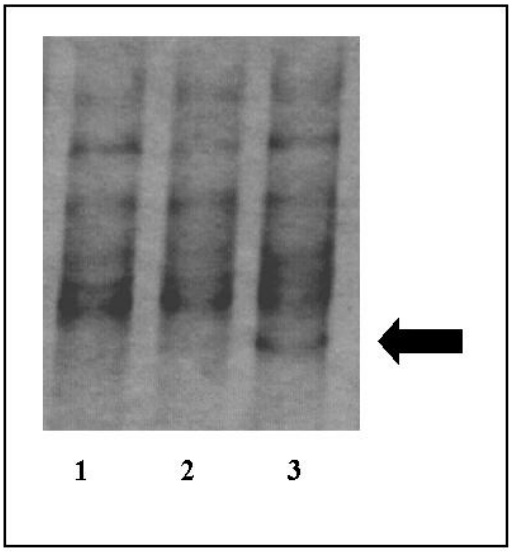


Abbildung 3.17.: Punktmutation (G zu A), welche einen Aminosäure-austauch von Valin zu Isoleucin in Codon 95 bewirkt. Durch den Pfeil hervorgehoben ist die zusätzliche Bande der Probe des Mutationsträgers (Laufbahn 3). Zum Vergleich das Bandenmuster von wildtypischen DNA-Proben in Laufbahnen 1-2.

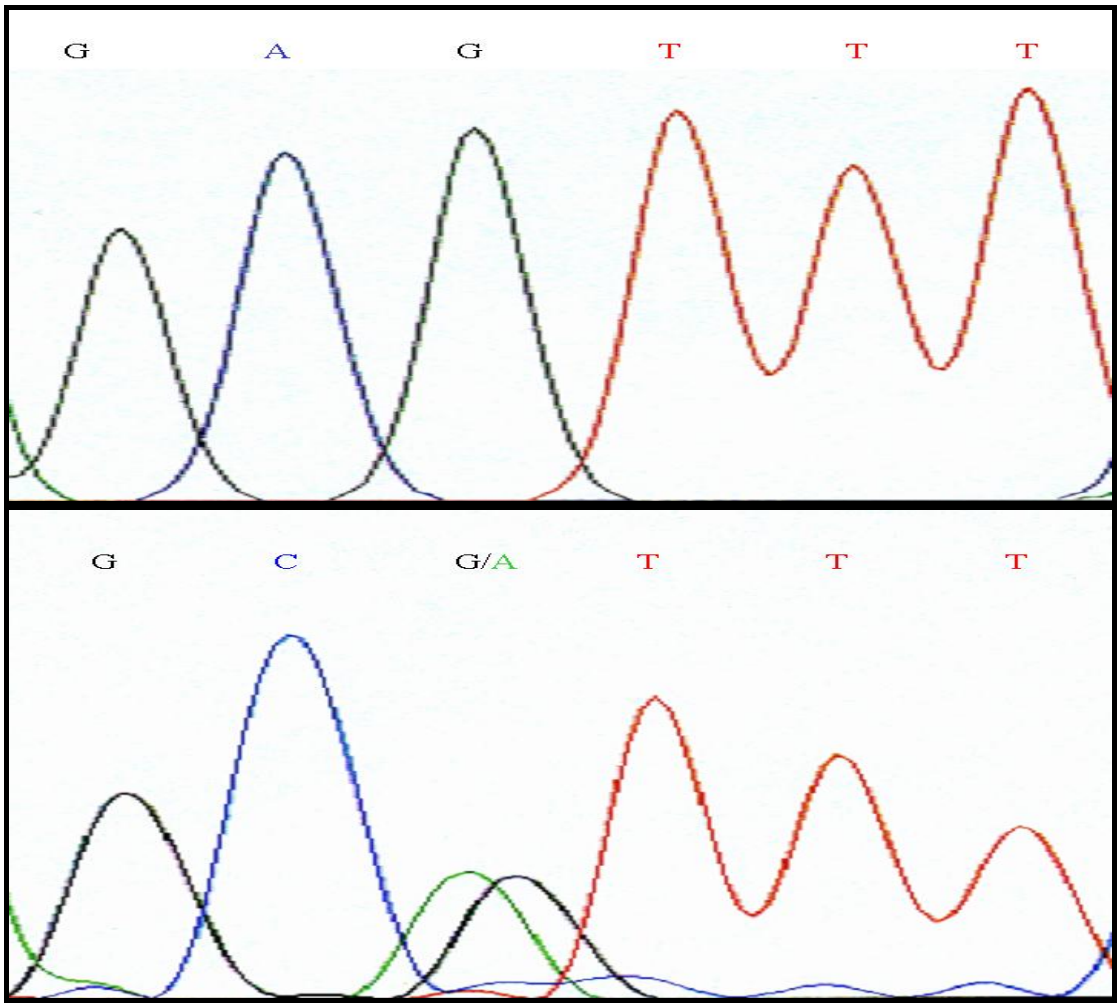


***Abbildung 3.18*: Sequenzierungsergebnis der Mutation Val-95-Ile.** In der unteren Abbildung ist im Vergleich zur oberen (Wildtyp) an Stelle der Base Guanin auf dem einen Allel zusätzlich die Base Adenin auf dem anderen Allel zu erkennen. Der Patient ist also heterozygot für eine G→A Mutation.

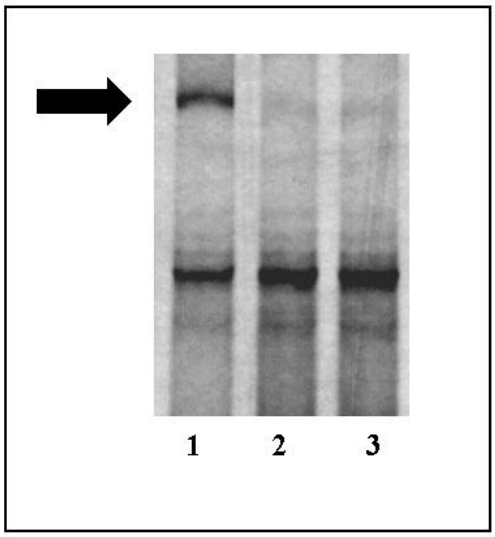


***Abbildung 3.19.*: Darstellung des SSCP-Ergebnisses der Ile-121-Thr Mutation.** Dem Aminosäureaustausch in Codon 121 von Isoleucin zu Threonin liegt eine Punktmutation (Basenaustausch T→C) zugrunde. In der Abbildung ist das Ergebnis der SSCP des MC4-R-1 Fragmentes gezeigt, wobei die zusätzliche Bande der Probe des Mutationsträgers in Laufbahn 1 imponiert. Zum Vergleich ist in Laufbahnen 2-3 das Bandenmuster der Wildtyp-Proben zu sehen.

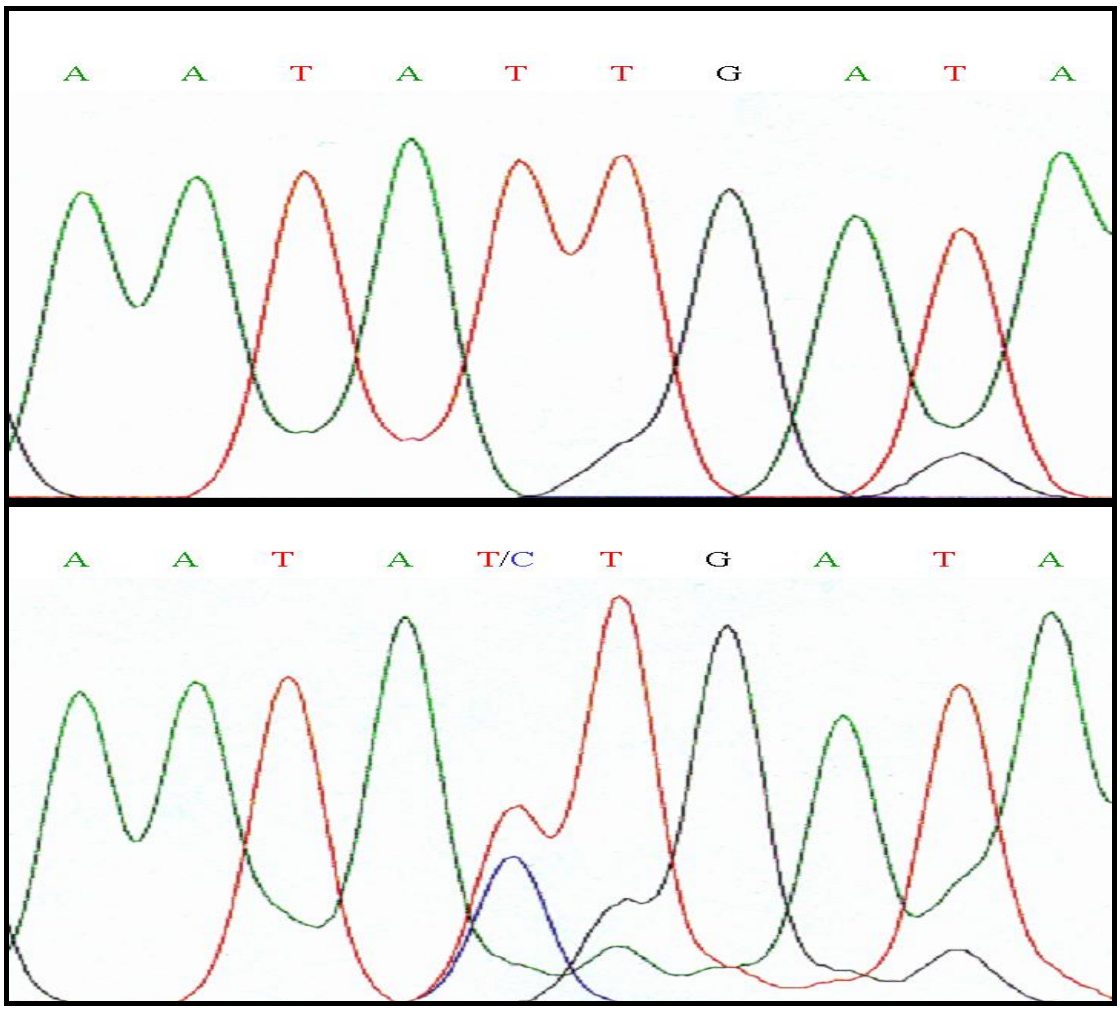


***Abbildung 3.20.*: Sequenz von Ile-121-Thr.** Die obere Abbildung zeigt die wildtypische Sequenz, die untere den heterozygoten Mutationsträger, bei dem ein Basenaustausch von T→C stattgefunden hat.

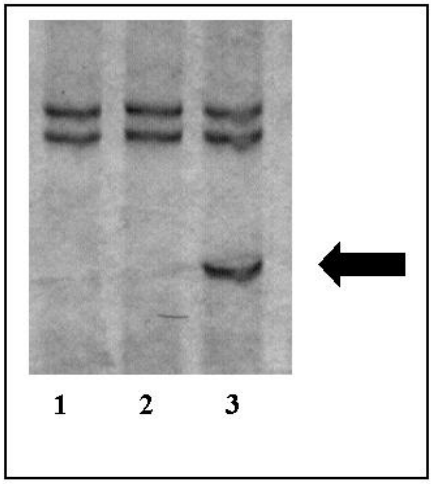


***Abbildung 3.21.:* Nachweis der Ala-244-Glu Mutation.** Die durchgeführte SSCP des MC4-R-2 Fragmentes führte bei einer Probandin zur Detektion einer Mutation im MC4-R Gen. Es handelt sich dabei um einen Basenaustausch (C→A), der zu einer Änderung der Aminosäuresequenz (Alanin→Glutamat) an Codon 244 führt. Die Bandenmuster 1-2 entsprechen den Wildtyp-Proben, in Lauftasche 3 wurde die Probe der Mutationsträgerin aufgetragen. Man erkennt eine zusätzliche Bande (durch einen Pfeil markiert). Der Phänotyp der Indexprobandin mit dem veränderten Allel ist in Tabelle 3.1. des Ergebnisteils beschrieben.

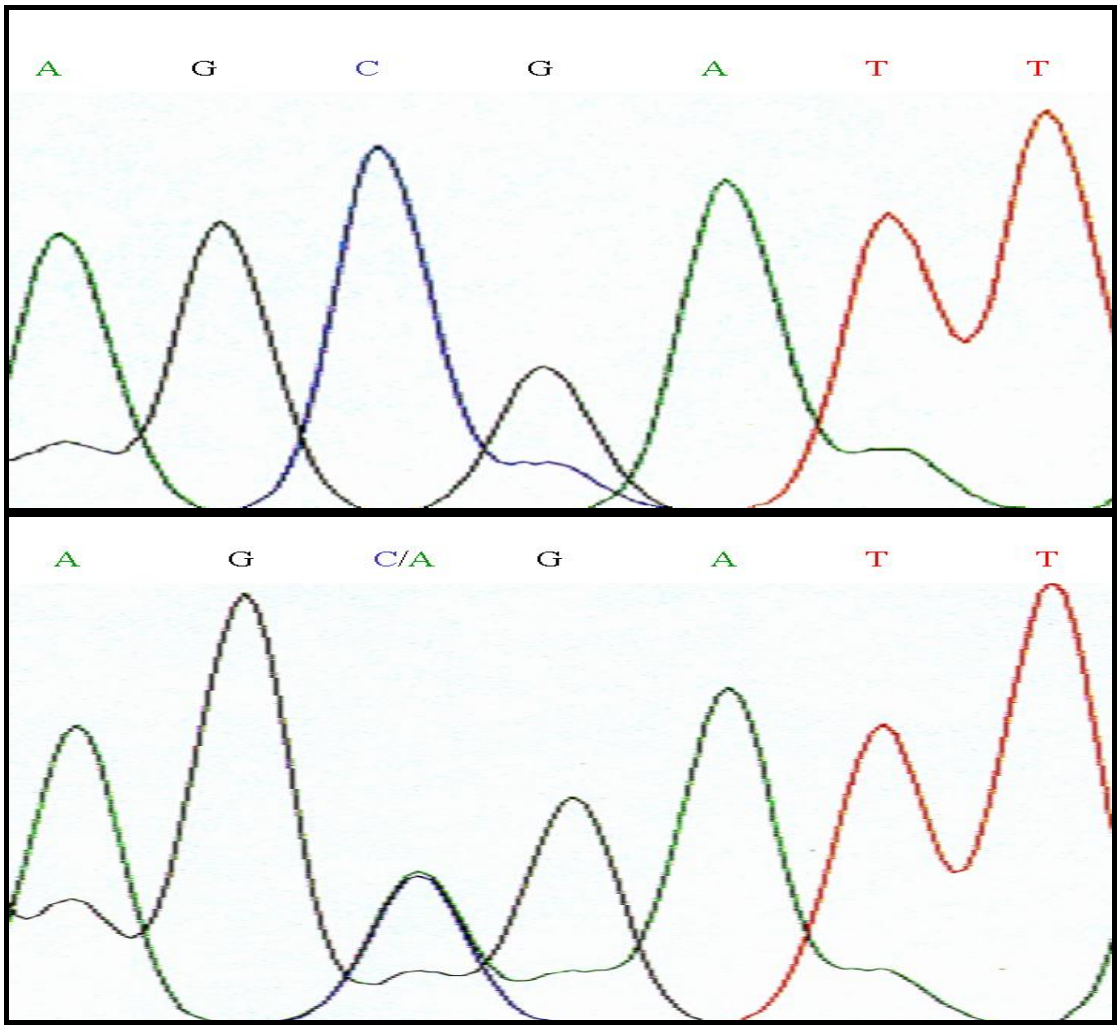


***Abbildung 3.22.:* Sequenz von Ala-244-Glu.** Der Basenaustausch C→A ist in der unteren Abbildung zu sehen und zeigt den heterozygoten Mutationsträger im Vergleich zum Wildtyp (obere Abbildung).

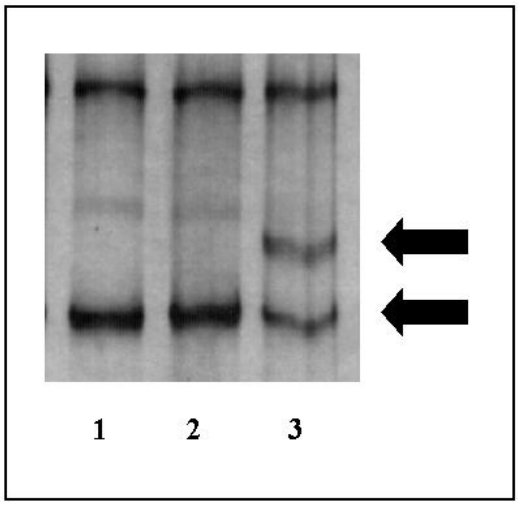


***Abbildung 3.23.*: Ile-317-Thr Mutation.** Das SSCP-Gel des MC4-R-2 Fragmentes zeigt bei dem Träger der Punktmutation (T→C), welche einen Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin in Codon 317 bewirkt, eine im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahnen 1-2) eine zusätzliche Bande (Laufbahn 3).

„Stumme“ Mutationen

Im Probandenkollektiv wurden weiterhin zwei stumme Mutationen detektiert (Ala-135-Ala durch einen A/G Austausch an Stelle 405 und Gly-324-Gly durch einen C/T Austausch an Stelle 972), welche durch ihren punktuellen Basentausch keine Veränderung der Aminosäuresequenz verursachten. Die Variante Ala-135-Ala wurde bei einer Mutter (BMI = 20,1; 8. Altersperzentile) detektiert, Gly-324-Gly zeigte sich bei einem Indexprobanden (BMI = 23,2; 95. Altersperzentile) und dessen Mutter (BMI = 26,0; 75. Altersperzentile).

Abbildungen 3.25. und 3.26. zeigen die Verteilung der vermutlich funktionell relevanten Mutationen von 11 betroffenen Patienten im Vergleich zu dem übrigen Kollektiv der extrem adipösen Nicht-Mutationsträger (n=509) anhand geschlechtsspezifischer BMI-Perzentilen. Der Body Mass Index der neun weiblichen Mutationsträgerinnen ist vor allem in den oberen BMI-Rängen der 310 adipösen Probandinnen zu finden, während der BMI der zwei männlichen Mutationsträger in mittleren Rängen des Kollektivs männlicher Adipöser zu finden ist (s.Abb.3.25).

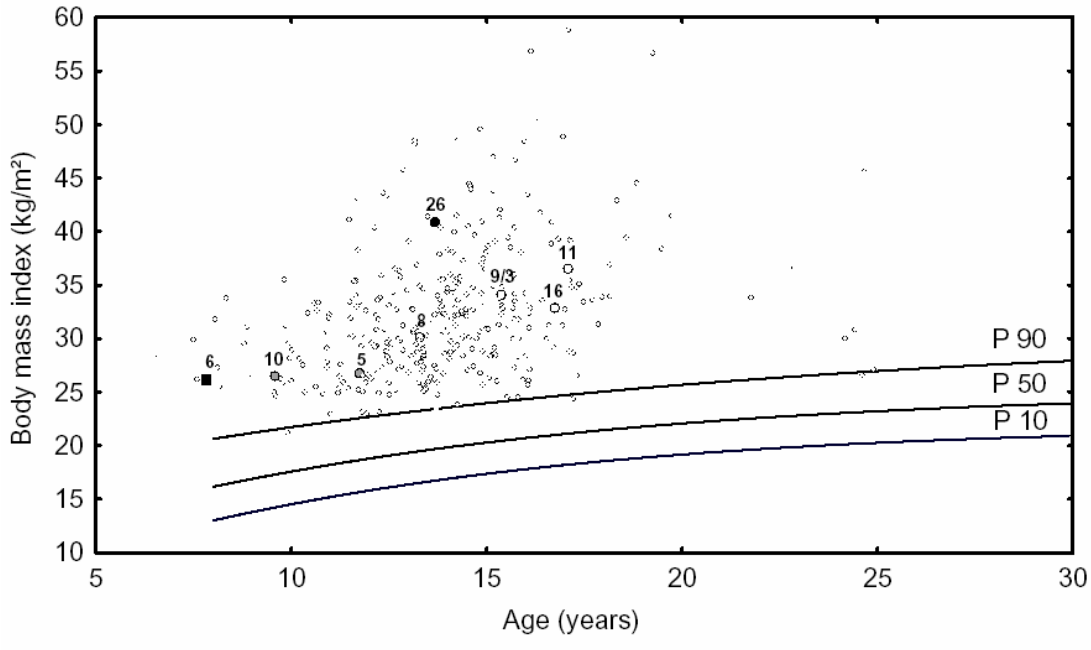


Abbildung 3.25.: **BMI-Perzentilenverteilung der männlichen Mutations- und Polymorphismusträger** (erstellt von Tilmann Görg). Auf der Abszisse sind die altersabhängigen Perzentilen angegeben, auf der Ordinate der Body Mass Index. Mit Zahlen markiert sind die Indexprobanden mit einer Mutation (3 = Gly-252-Ser; 5 = Arg-165-Trp; 6 = Asp-37-Val gekoppelt mit Tyr-35-Stop; 8 = Thr-112-Met; 9 = Ser-30-Phe; 10 = Pro-78-Leu; 11 = Ile-317-Thr; 16 = Pro-230-Leu; 26 = Codon250/251), wobei ein Quadrat eine Nonsense-Mutation, ein Kreis eine Missense-Mutation symbolisiert. Die leeren Kreise zeigen die Verteilung der Polymorphismusträger an, alle übrigen Punkte stehen für das untersuchte Kollektiv männlicher extrem adipöser Kinder und Jugendlicher. Bei dieser Abbildung sind alle von der Klinischen Forschergruppe bisher dedektierten Mutationen der männlichen Probanden aufgeführt (Hinney *et al*., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei männliche Mutationsträger (Tyr-35-Stop/ Asp-37-Val und Ile-317-Thr) gefunden (siehe auch Tabelle 3.1.).

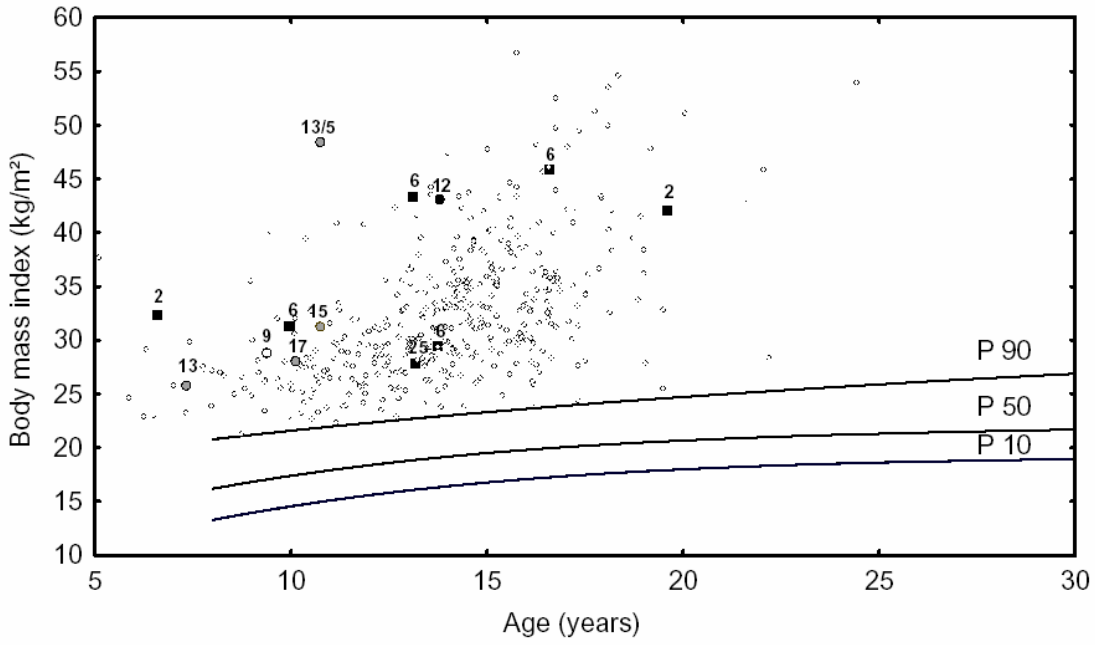


Abbildung 3.26.: **BMI-Perzentilenverteilung der weiblichen Mutations- und Polymorphismusträgerinnen** (erstellt von Tilmann Görg). Die mit Zahlen markierten Symbole stehen für die Mutationsträgerinnen (2 = Deletion Codon 211; 5 = Arg-165-Trp; 6 = Asp-37-Val gekoppelt mit Tyr-35-Stop; 9 = Ser-30-Phe; 12 = Val-95-Ile; 13 = Ser-127-Leu; 15 = Ala-244-Glu; 17 = Ile-121-Thr; 25 = Deletion Codon 250). Quadrate markieren Trägerinnen einer Frameshift- oder Nonsense-Mutation, Kreise markieren Probandinnen mit Missense-Mutationen. Die leeren Kreise zeigen die Polymorphismusträgerinnen, alle übrigen Markierungen stehen für das untersuchte Kollektiv der weiblichen extrem adipösen Kinder und Jugendlichen. In dieser Abbildung sind alle von der Klinischen Forschergruppe bisher dedektierten Mutationen der weiblichen Probanden aufgeführt (Hinney *et al*., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden neun weibliche Mutationsträger (Ser-30-Phe; Tyr-35-Stop/ Asp-37-Val; Val-95-Ile; Ile-121-Thr; Ser-127-Leu; Arg-165-Trp; Deletion Codon 211; Ala-244-Glu; Deletion Codon 250) gefunden (siehe auch Tabelle 3.1.).

3.2. Polymorphismen im *MC4R*

Der Val-103-Ile Polymorphismus

Der erstmalig 1997 (Gotoda *et al*.) beschriebene Polymorphismus Val-103-Ile, dem ein Basenaustausch (Guanin→Adenin) zugrunde liegt, wurde auch in diesem Probandenkollektiv identifiziert (Hinney *et al*., 1999 und 2003), ebenso in weiteren Arbeitsgruppen (Branson *et al*., 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Gu *et al*., 1999; Marti *et al.,* 2003; Vaisse *et al*., 2000). Mit einer Frequenz von 1,5 % erwiesen sich 8 der 520 extrem adipösen Probanden als Träger dieses Polymorphismus. 35 der 1040 untersuchten Eltern (2,6 %) waren Träger dieses Polymorphismus.

Mittels SSCP bei 4° C wurde bei der Untersuchung des PCR-Fragmentes *MC4R*-1 eine spezifische Veränderung des Basenmusters identifiziert, welche durch die Sequenzierung als Val-103-Ile Polymorphismus erkannt wurde. Abbildungen 3.27. und 3.28. zeigen die zusätzliche Bande des veränderten Basenmusters, welche bei den Wildtyp-Proben nicht nachzuweisen war.

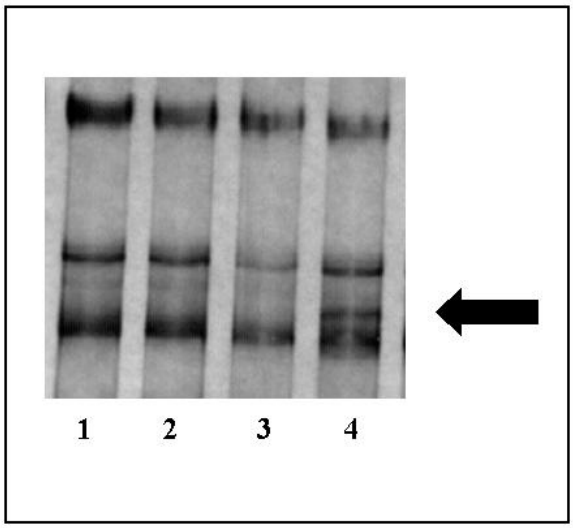


Abbildung 3.17.: Val-103-Ile Polymorphismus des MC4-R-1 Fragmentes. Der Pfeil weist auf das im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahnen 1-3) veränderte Bandenmuster bei einem Polymorphismusträger (Laufbahn 4) hin.

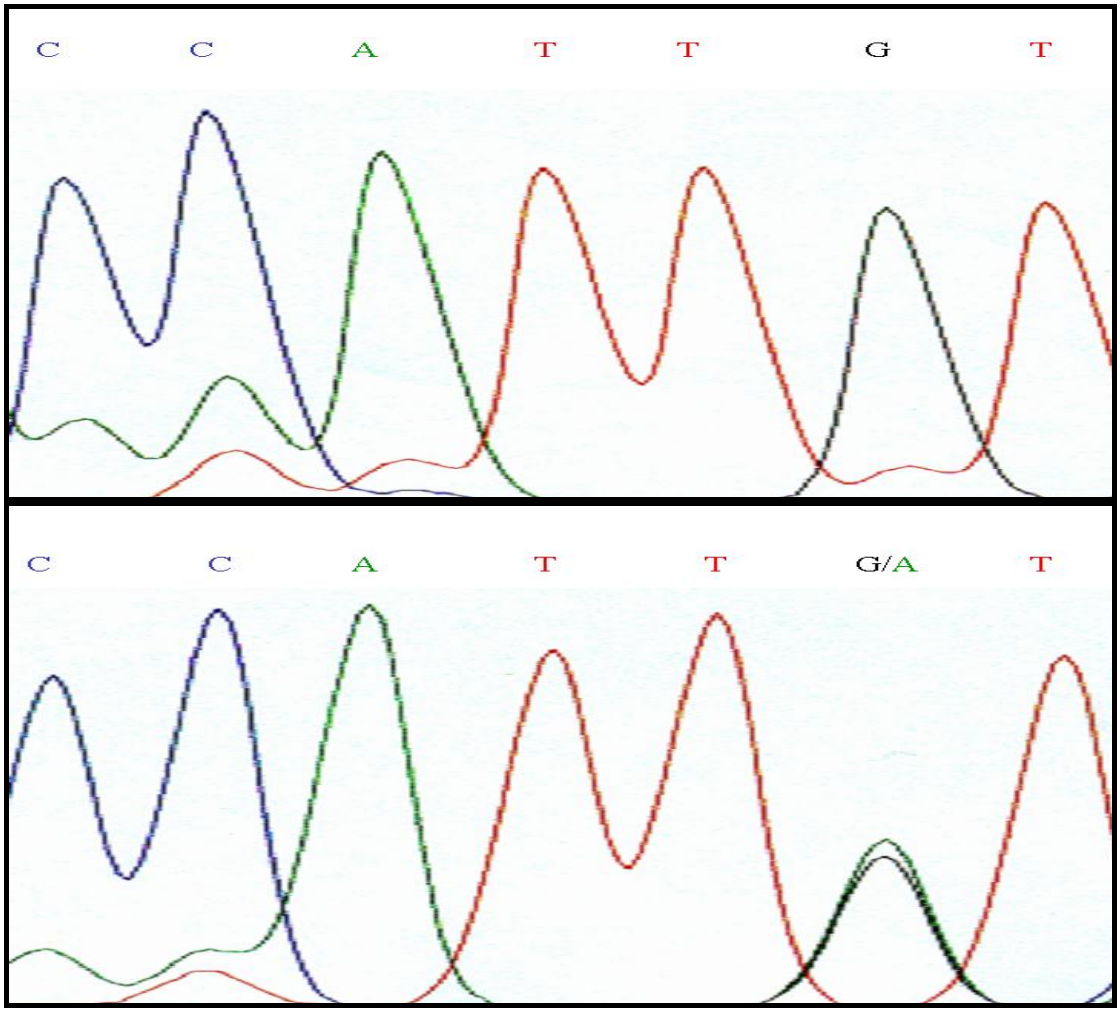


Abbildung 3.28.: **Sequenz von Polymorphismus Val-103-Ile.** Die obere Abbildung zeigt die wildtypische Sequenz, die untere einen heterozygoten Träger des Polymorphismus. Es hat ein Austausch der Base G→A stattgefunden.

Der Ile-250-Leu Polymorphismus

Der initial von der Klinischen Forschergruppe (Hinney *et al*., 1999) und nachfolgend auch von weiteren Arbeitsgruppen (Branson *et al*., 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Marti *et al*., 2003; Vaisse *et al*., 2000) beschriebene Polymorphismus Ile-251-Leu wurde im Kollektiv der 520 extrem adipösen Probanden bei 6 Personen (1,2 %) und im Kollektiv der Eltern bei 13 Personen (0,8 %) festgestellt. Im Anschluss an die SSCP-Methode erfolgte auch bei diesen Probanden die Sequenzierung. Abbildungen 3.29. und 3.30. zeigen die Veränderung des Bandenmusters, welche im Vergleich zum Wildtyp bei den Trägern des Ile-251-Leu Polymorphismus auffiel.

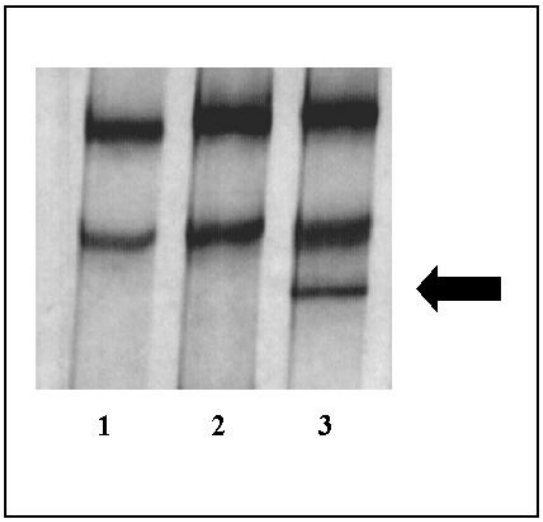


Abbildung 3.19.: Gly-252-Ser Polymorphismus des MC4-R-2 Fragmentes. Im Vergleich zum Wildtyp (Laufbahnen 1-2) imponiert bei dem Polymorphismusträger (Laufbahn 3) eine zusätzliche Bande (durch einen Pfeil markiert).

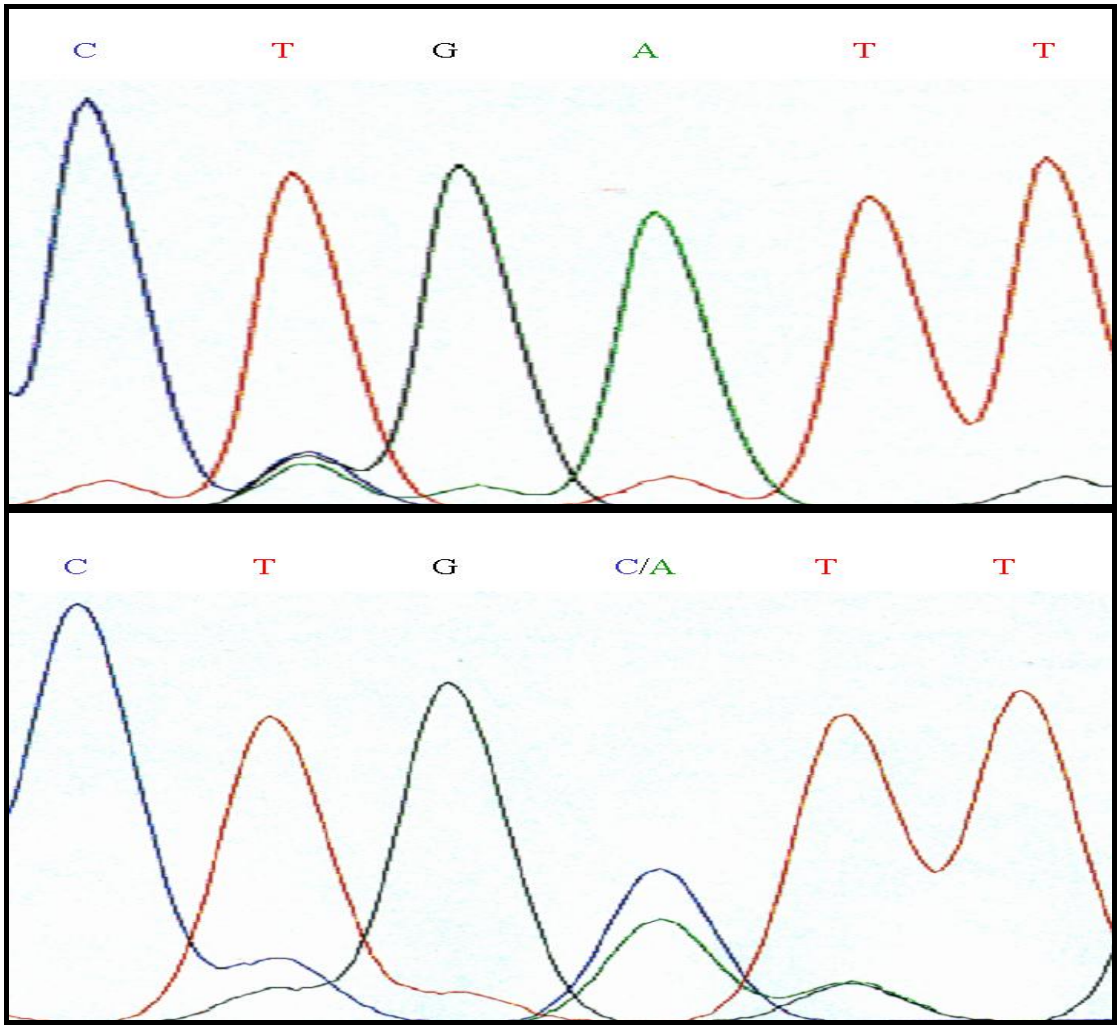


Abbildung 3.30.: **Sequenz von Polymorphismus Ile-250-Leu.** Die untere Abbildung zeigt einen heterozygoten Polymorphismusträger mit dem Basenaustausch A→C im Vergleich zum Wildtyp (obere Abbildung).

Analysen der Polymorphismen Val-103-Ile und Ile-251-Leu

Alle Träger der Polymorphismen (n = 48) sind bei beiden Geschlechtern bezüglich ihres BMI über die gesamten Perzentilen verteilt zu finden. Bei einer normal bis untergewichtigen Kontrollgruppe (Hinney *et al*., 1999) wurde bei fünf Personen (2,0 %) des Kontrollkollektivs der Ile-251-Leu Polymorphismus und bei neun Personen (3,6 %) der Val-103-Ile Polymorphismus festgestellt.

Mit dem WAVE® Gerät (siehe Methodenteil) wurden Proben der Probanden und Familien auf bekannte Veränderungen untersucht. Dabei konnte durch die sensitivere Methode des WAVE® Systems eine zunächst bei der SSCP als Ile-251-Leu Polymorphismus interpretierte DNA-Probe als zusätzlicher Träger einer Gly-181-Asp Mutation erkannt werden. Bei einem weiteren Polymorphismusträger konnte durch das WAVE® System eine zusätzliche Deletion von zwei Basenpaaren an Stelle der Codons 250/251 aufgedeckt werden.

3.4. Mutationen und Polymorphismen des *MC4R* bei Eltern der Indexpatienten

Beide Elternteile von 520 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen wurden auf Mutationen im *MC4R* untersucht. In diesem Kollektiv wurden insgesamt 14 funktionell relevante und zwei stumme Varianten gefunden. Alle gefundenen Mutationsträger waren heterozygot. Bei den Müttern wurden sechs Mutationsträgerinnen identifiziert, welche alle einen BMI ≥ 85. Perzentile aufwiesen. Drei dieser Probandinnen zeigten BMI-Werte in den obersten Rängen der BMI-Verteilung aller erfassten Mütter. Unter den Vätern wurden acht Mutationsträger gefunden. Zwei von ihnen wiesen einen BMI unter der 85. Perzentile auf, einer davon sogar unter der 50. Perzentile. Tabelle 3.1. zeigt die von den Eltern auf die Indexprobanden transmittierten Mutationen. Bis auf zwei (Ser-94-Arg, Codon 320 Deletion T) wurden alle Missense-, Nonsense- und Frameshift- Mutationen der Eltern auf den Indexprobanden weitervererbt. Tabelle 3.2. beschreibt den Phänotyp der elterlichen Mutationsträger, die das veränderte Allel nicht weitergegeben haben. Bei den 1040 untersuchten Eltern fanden sich 35 Träger des Val-103-Ile Polymorphismus (3,4 %) und 13 Träger des Ile-251-Leu Polymorphismus (1,3 %). Die Allele der Polymorphismen wurden in acht (Val-103-Ile), bzw. in sechs Fällen (Ile-251-Leu) auf

den Indexprobanden transmittiert, und in 27 (Val-103-Ile), bzw. in sieben Fällen (Ile-251-Leu) nicht transmittiert. Abbildung 3.31. zeigt die Verteilung der BMI-Werte von mütterlichen Mutationsträgerinnen und Polymorphismusträgerinnen im Vergleich zum gesamten Kollektiv der untersuchten Mütter adipöser Kinder und Jugendlicher, Abbildung 3.32. die BMI-Werte der Väter extrem adipöser Kinder und Jugendlicher.

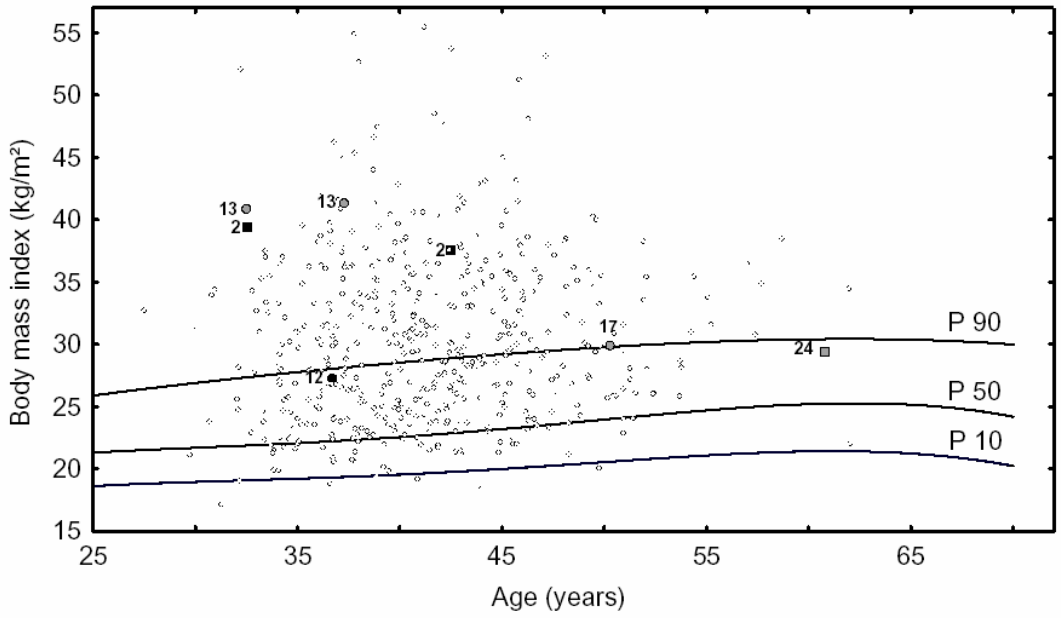


***Abbildung 3.31.*: BMI-Werte von mütterlichen Mutationsträgerinnen und deren geschlechtsspezifische Perzentilenverteilung** (erstellt von Tilmann Görg). Die mit Zahlen markierten Zeichen stellen die einzelnen Mutationsträgerinnen dar (2 = Codon 211 Deletion CTCT; 12 = Val-95-Ile; 13 = Ser-127-Leu; 17 = Ile-121-Thr; 24 = Codon 320 Deletion). Die leeren Kreise stehen für Mütter mit einem Polymorphismus. Die übrigen Markierungspunkte bedeuten das restliche Kollektiv der Mütter (n = 490).

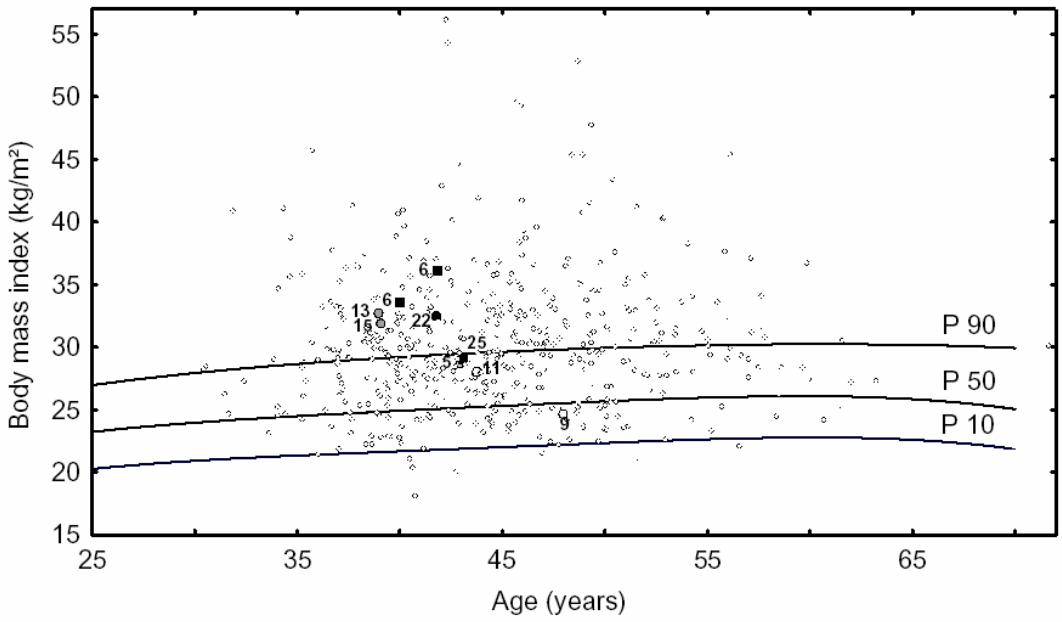


Abbildung 3.32.: **BMI-Perzentilenverteilung der Väter der extrem adipösen Kinder und Jugendlichen** (erstellt von Tilmann Görg). Die mit Zahlen markierten Symbole zeigen die Mutationsträger an (5 = Arg-167-Trp; 6 = Asp-37-Val gekoppelt mit Tyr-35-Stop; 9 = Ser-30-Phe; 11 = Ile-317-Thr; 13 = Ser-127-Leu; 15 = Ala-244-Glu; 22 = Ser-94-Arg; 25 = Deletion Codon 250). Quadrate markieren Träger einer Frameshift- oder Nonsense-Mutation, Kreise stehen für Träger einer Missense-Mutation. Die leeren Kreise zeigen Polymorphismusträger, alle übrigen Markierungen das Kollektiv der untersuchten Väter (n = 498).

3.5. Der Transmissions-Disequilibrium-Test

TDT für alle Mutationen

Von 14 heterozygoten elterlichen Mutationsträgern mit dem Allel M (mutiertes Allel) wurde in 12 Fällen dieses Allel transmittiert. Die Transmissionsrate liegt somit bei 85,7 %; der p-Wert nach exaktem Test nach Fischer liegt bei 0,032. Bei einem p-Wert unter 0,05 wird das Ergebnis als signifikant bezeichnet.

TDT für Nonsense- und Frameshift- Mutationen

Das Transmissionsergebnis der Nonsense- und Frameshift- Mutationen unterscheidet sich von den Missense- Mutationen wie folgt: von sechs elterlichen Mutationsträgern wurde in fünf Fällen das mutierte Allel übertragen. Die Transmissionsrate liegt somit

bei 83,4 %. Der p- Wert 0,1003. Somit ist dieses Ergebnis als nicht signifikant aufgrund der niedrigen Fallzahl zu bezeichnen.

TDT für die Polymorphismen

Bei den heterozygoten elterlichen Trägern des Polymorphismus Val-103-Ile (n = 35) wurde das Allel P (polymorphismustragendes Allel) acht mal transmittiert. Dies ergibt eine Transmissionsrate von 22,9 % und einen p-Wert von 0,0037. Auch dieses Ergebnis ist als relevant zu bezeichnen, allerdings in einem negativen Zusammenhang. Bei Personen mit dem Phänotyp Adipositas wird der Polymorphismus von heterozygoten Eltern seltener übertragen. Die 9 elterlichen Träger des Polymorphismus Ile-251-Val gaben das Allel P in sechs Fällen an ihre Kinder weiter. Dies bedeutet eine Transmissionsrate von 66,7 %, einen χ^2- Wert von 0,08 und einen p- Wert von 0,78. Dieses Ergebnis ist somit nicht als relevant einzustufen.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Rolle der *MC4R* Mutationen bei der Entstehung von Adipositas zu verdeutlichen. Durch die systematische Untersuchung von 520 adipösen Kindern und Jugendlichen und deren Eltern war es möglich, mit Hilfe des TDT die epidemiologische Relevanz der *MC4R* Mutationen mit funktioneller Relevanz abzuschätzen.

4.1. Detektierte Sequenzveränderungen im *MC4R*

Aufgrund ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Verhaltensweisen ist es sinnvoll, die im folgenden beschriebenen Mutationen in zwei Gruppen zu klassifizieren: 1. Mutationen mit eingeschränkter Funktion (betrifft alle Mutationen mit reduzierter Funktion bis hin zum Funktionsverlust) und 2. Mutationen, die gleich dem Wildtyp funktionieren. Die funktionellen *in vitro*- Studien wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps- Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Gudermann durchgeführt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Funktion der *MC4R* Mutationen *in vivo* unter Einfluss von verschiedensten anderen Faktoren von den beschriebenen Funktionseigenschaften abweichen (siehe auch Gu *et al*., 1999; Vaisse *et al*., 2000). So wurde eine in dieser Arbeit beschriebene Mutation (Ile-317-Thr) als mit wildtypischer Funktion beschrieben, welche von Lubrano-Berthelier *et al*. (2003) als mit herabgesetzter Expression auf der Zelloberfläche und somit auch herabgesetzter Funktion beschieben wurde.

Deletion CTCT in Codon 211

Die Deletion der Basen CTCT in Codon 211 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei zwei Indexpatientinnen und deren Müttern detektiert. Alle vier Personen wiesen einen BMI über der 99. Perzentile auf.

Weiterhin sind von Yeo et al. (1998) und Farooqi et al. (2000) zwei Mutationsträger beschrieben. Es handelt sich um einen Indexprobanden und seinen Vater, welche einen Body Mass Index von 4,9 und 3,5 Standardabweichungen über dem altersentsprechenden Bevölkerungsdurchschnitt aufwiesen. Farooqi und Mitarbeiter (2000) stellten Zelllinien (HEK293 Zellen) her, welche im *MC4R* die CTCT Deletion

auf Codon 211 aufwiesen. Diese Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von α-MSH inkubert. Die folgende cAMP-Freisetzung führte durch in die Zellen eingefügte Kontrollplasmide mittels Luciferase zur dosisabhängigen optischen Leuchtreaktion, welche dann bestimmt wurde. Im Gegensatz zu den *MC4R* Wildtyp-produzierenden Zellen sprachen die Zellen mit der CTCT Deletion im *MC4R* nicht auf die α-MSH Gaben an. Ho *et al*. (1999) vermuteten als Ursache des kompletten Funktionsausfalls dieser Frameshift-Mutation eine Haploinsuffizienz, da in Zellen mit dieser Mutation der Rezeptor zwar produziert, jedoch nicht auf der Zelloberfläche exprimiert würde, da der Sequenzfehler den Transport verhindere.

Deletion GA in Codon 250

Bei einer Indexpatientin (99. BMI-Perzentile) und ihrem Vater (88. BMI-Perzentile) wurde in Codon 250 eine Deletion zweier Basen (Guanin und Adenin) detektiert. Bisher sind diese beiden Personen die einzigen in der Literatur beschriebenen Träger der GA Deletion in Codon 250. Rezeptoren mit dieser Frameshift- Mutation zeigten *in vitro* einen deutlichen Funktionsverlust, der die funktionelle Relevanz dieser Mutation zeigt.

Deletion T in Codon 320

Eine weitere Deletion wurde in dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Es handelt sich um die Deletion von Thymin in Codon 320, welches an der Codierung des intrazellulären Endes des *MC4R* beteiligt ist. Diese Deletion wurde bei der Mutter einer Indexpatientin detektiert, welche das veränderte Allel nicht auf ihre Tochter transmittierte. Die Mutter hatte einen BMI von 29,4 (86. Perzentile).

Ho *et al.* (1999) stellten Zellkulturen her, deren *MC4R*-Produkt mittels Enzymen künstlich am C-terminalen Ende geschnitten wurde, um so die entscheidende Länge für die korrekte Funktion des MC4R abschätzen zu können. Dabei wurden Rezeptoren konstruiert, die an Stelle des Codons 320 endeten und denen so die letzten dreizehn Aminosäuren fehlten. Ho *et al*. beschrieben eine wildtypische cAMP-freisetzende Reaktion dieser Rezeptoren auf die Gabe von NDP- α-MSH. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass diese Mutation aufgrund ihrer Lokalisation im Rezeptorgen (siehe Abbildung 4.1.) und aufgrund der nur leicht ausgeprägten Adipositas der Mutter einen weniger deutlichen Einfluss auf die Ausbildung des Phänotyps Adipositas hat als die übrigen frameshift-Mutationen. Die funktionellen Studien von Gudermann und

Mitarbeitern, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit (Hinney *et al*., 2003) angefertigt wurden, zeigten hingegen eine reduzierte Funktionsleistung des Rezeptors.

Nonsense-Mutation

Die Träger der Nonsense-Mutation Tyr-35-Stop, bei der eine Punktmutation (Cytosin→Adenin) einen Aminosäureaustausch von Tyrosin zu einem Stopcodon verursacht, wurden in der vorliegenden Arbeit detektiert. Es handelt sich um einen Indexpatienten (98. BMI-Perzentile), eine Indexpatientin (99. BMI-Perzentile) und deren Väter (99. BMI-Perzentile). Die Stop-Mutation ist in der N-terminalen extrazellulären Domäne des *MC4R* lokalisiert (siehe Abbildung 5.1.) und führt während des Ablesevorganges für die Herstellung des Proteins zu einem Abbruch der entstehenden Basenkette. Es wird so nur ein kleiner Abschnitt des Rezeptors hergestellt, *in vitro* Studien zeigten einen völligen Funktionsverlust. Dies erklärt sich auch dadurch, dass dieser veränderte Rezeptor nur etwa ein zehntel der Länge eines wildtypischen Rezeptors erreicht und somit jegliche Funktionsfähigkeit unwahrscheinlich macht. In allen Fällen bildet die Stop-Mutation einen Haplotyp mit einer Asp-37-Val Mutation. Da diese Missense- Mutation, die auf einem Basenaustausch von Adenin zu Thymin beruht, nach dem Kettenabbruch lokalisiert ist, wirkt sie sich auf das Produktprotein nicht unmittelbar aus. Die funktionelle Bedeutung dieser Mutation ist noch nicht definiert. Beide Mutationen wurden zum ersten Mal von der Klinischen Forschergruppe 1999 beschrieben (Hinney *et al*., 1999).

Missense-Mutationen

Es wurden neun Missense Mutationen bei insgesamt 18 Personen detektiert. Davon wurden sechs Mutationen zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben. Es handelt sich um die Mutationen Ser-94-Arg (Funktionsausfall), Val-95-Ile (Funktionsausfall), Ile-121-Thr (Funktionsreduktion), Ser-127-Leu (Funktionsreduktion), Ala-244-Glu (Funktionsreduktion) und Ile-317-Thr (Funktion wie Wildtyp). Drei weitere Mutationen, Ser-30-Phe (Funktion wie Wildtyp), Asp-37-Val (nicht definiert), und Arg-165-Trp (Funktionsreduktion), wurden bereits in Hinney *et al*. (1999) erstmalig veröffentlicht. Funktionelle Studien wurden auch von Gu *et al*. (1999), Vaisse *et al*. (2000) und anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Einen Überblick zeigt Tabelle 1.1. der Einleitung.

4.2. TDT und Auswirkungen der *MC4R* Mutationen

Bei der Menge und Seltenheit der bisher bekannten Mutationen im *MC4R* erscheint es sinnvoll, diese in relevante und nicht relevante Mutationen einzuteilen. Dabei spielt vor allem eine Rolle, ob die Mutation eine Veränderung der Aminosäuresequenz verursacht, ob sie *in vitro* eine herabgesetzte cAMP-Antwort auf Agonisten wie NDP-α-MSH verursacht und ob die Mutation in adipösen Patientenkollektiven deutlich häufiger zu finden ist als in normalgewichtigen Kontrollen (Ho *et al*., 1999; Yeo *et al*., 2003). Aus diesem Grund wurden in unsere TDT Berechnungen die Polymorphismen sowie die stummen Mutationen nicht miteinbezogen.

Die Ergebnisse des TDT zeigen, dass alle Nonsense-, Frameshift- und Missense-Mutationen bevorzugt auf die adipösen Nachkommen vererbt wurden. Unter Betrachtung der nicht transmittierten Mutationen muss berücksichtigt werden, dass unter den Eltern der Indexpatienten Adipositas sehr häufig ist. Etwa 25 % der adipösen Kinder und Jugendlichen hatten zwei adipöse Eltern (BMI ≥ 30 kg/m^2). Dies spricht neben umweltbedingten Faktoren auch für das Phänomen des „assortative mating“ (Hebebrand *et al*., 2000; Katzmarzyk *et al*., 2002), bei dem in diesem Fall davon ausgegangen wird, dass Personen mit Adipositas untereinander mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als zufällig Partnerschaften eingehen als mit normal- oder untergewichtigen Personen. Sind Elternteile in beiden Fällen übergewichtig, können die Nachkommen eine oder mehrere genetische Prädispositionen von Vater und/ oder Mutter aufweisen. Bei den elterlichen Mutationsträgern, die das mutierte Allel nicht transmittiert hatten, zeigten sich erwartungsgemäß höhere BMI Perzentilen (87., 90. und 94. Perzentile) gegenüber der durchschnittlichen BMI Perzentile (81.) der Studiengruppe aller Eltern. Es ist anzunehmen, dass die Familien zusätzliche genetische Faktoren, die zu Übergewicht prädisponieren, aufweisen was die Transmissionsrate von lediglich 81,8 % erklären könnte.

Schätzungen des genotypischen Relativen Risikos (RR) für heterozygote Träger der funktionell relevanten Mutationen zeigten ein deutlich erhöhtes Relatives Risiko (95 % Konfidenzintervall 0,7 – 17,2) für extremes Übergewicht (BMI > 90. Perzentile) im Vergleich zu Personen ohne funktionell relevante Mutation. Das breite Konfidenzintervall zeigt, dass das RR wesentlich größer als 3,0 sein könnte. Die Schätzung basiert auf der Beobachtung von 11 transmittierten gegenüber zwei nicht-transmittierten mutierten Allelen. Da die Eltern, welche ihre Allele nicht auf den

Nachkommen transmittierten, einen deutlich höheren BMI als der Durchschnitt aller Eltern hatten, ist die Adipositas des jeweiligen Kindes mit anderen genetischen und/ oder umweltbedingten Faktoren zu begründen. Da in einem Großteil der Familien beide Eltern adipös sind, kann das genetische RR in dieser Studie unterschätzt worden sein. Die niedrige Frequenz der funktionell relevanten Mutationen im *MC4R* deutet auf eine eher kleine epidemiologische Relevanz hin.

Weitere in der Literatur beschriebene Mutationen des *MC4R* weisen häufig eine stark eingeschränkte Rezeptorfunktion auf (Vaisse *et al*., 2000; Farooqi *et al*., 2000 und andere; Übersicht Tabelle 1.1. der Einleitung). Zukünftige Studien könnten zeigen, in welcher Form die Rezeptormutationen sowohl die numerische als auch die örtliche Verteilung ihrer Proteinprodukte beeinflussen. Die bisher bekannten Mutationen sind über alle Regionen des *MC4R* verteilt. Es zeigt sich bisher keine sogenannte „Hotspot-Region“, in der auf DNA-Ebene besonders häufig Mutationen stattfinden. Abbildung 4.1. zeigt schematisch alle bisher bekannten Mutationen mit Lokalisation im Rezeptor.

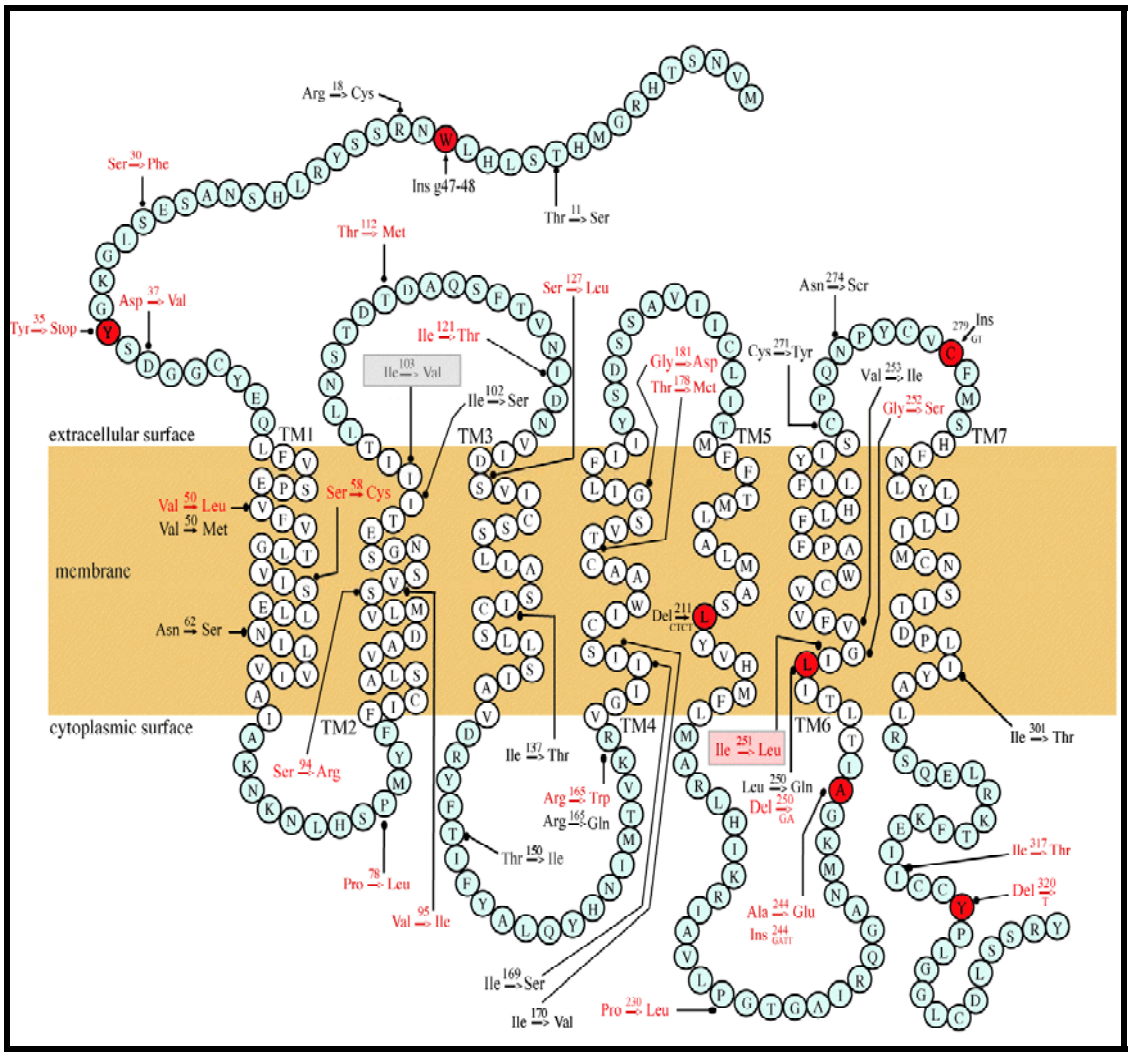


Abbildung4.1.: **Struktur und bekannte Veränderungen des Melanocortin 4 Rezeptors.** Eingezeichnet ist die zweidimensionale Vorstellung der Struktur des MC4R als G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Schleifen (TM 1-7). Vermutlich bildet der Rezeptor in der Plasmamembran eine zylinderähnliche Anordnung. In dieser Graphik sind außerdem alle bisher bekannten Mutationen und Polymorphismen des *MC4R* markiert (Stand Anfang 2003). Die rote Schrift hebt die von der Klinischen Forschergruppe erstmals entdeckten oder bestätigten Varianten hervor. Die rot markierten Aminosäuren zeigen „Frameshift"-Mutationen (Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren, die in ihrer Anzahl kein Vielfaches von drei sind und somit eine Leserasterverschiebung in der DNA-Sequenz verursachen.). Einen Überblick über die an der Entdeckung dieser Varianten beteiligten Arbeitsgruppen zeigt Tabelle 1.3. der Einleitung (Modifiziert nach Gantz *et al*., 1993; Hinney *et al*., 1999).

4.3. Polymorphismen im *MC4R*

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden bereits die Polymorphismen Val-103-Ile (Gotoda *et al*., 1997) und Ile-251-Leu (Hinney *et al*., 1999) beschrieben, die eine wildtypische Rezeptorausbildung zur Folge haben und bei normalgewichtigen Kontrollgruppen in gleicher oder erhöhter Frequenz wie bei den extrem adipösen Kollektiven vorkommen (Gotoda *et al*., 1997; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999; Farooqui *et al*., 2000; Vaisse *et al*., 2000).

Wir konnten zeigen, dass das 103-Ile Allel des Val-103-Ile Polymorphismus seltener als zufällig erwartet auf adipöse Nachkommen vererbt wurde. Es wurden 8 der 520 extrem adipösen Probanden und 35 der 1040 untersuchten Eltern als Träger des Val-103-Ile Polymorphismus identifiziert. Die errechnete Transmissionsrate beträgt somit 22,9 % und bezeichnet ein relevantes Ergebnis im Sinne eines negativen Zusammenhangs. Dies legt den Verdacht nahe, dass der Val-103-Ile Polymorphismus auf die Entwicklung von Adipositas einen eher protektiven Effekt ausübt. Vorangegangene *in vitro*- Studien beschreiben bei diesem Polymorphismus dem Wildtyp ähnliche Effekte in cAMP assays (Gu *et al*., 1999). Andere funktionelle Studien bestätigten diese Ergebnisse. In verschiedenen Studien wird eine höhere Allelfrequenz dieses Polymorphismus bei Normalgewichtigen als bei Adipösen beschrieben (Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000; Hinney *et al*., 1999; Jacobson *et al*., 2002; Miraglia del Giudiche *et al*., 2002; Ohshiro *et al*., 1999; Rosmond *et al*., 2001). Rosmond und Mitarbeiter (2001) beschrieben, dass Träger des 103-Ile Allels eher zu niedrigerem BMI neigen und weniger abdominale Adipositas zeigen. Dies zeigt, dass genetische Variationen des *MC4R* also die Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Adipositas sowohl herauf- als auch herabsetzen können.

Weiterhin waren im Kollektiv der Indexpatienten 6 Personen, im Kollektiv der Eltern 19 Personen Träger des Ile-251-Leu Polymorphismus. Die errechnete Transmissionsrate ist mit 46,2 % als nicht relevant einzustufen.

Diese Ergebnissen reihen sich in die der bereits veröffentlichten Studien, welche den Val-103-Ile Polymorphismus mit einer Frequenz von 1,2-4,2 % bei adipösen Probanden und 1,9-4,5 % bei den normalgewichtigen Kontrollen angeben (Gotoda *et al*., 1997; Gu *et al*., 1999; Farooqi *et al*., 2000; Vaisse *et al*., 2000; Dubern *et al*., 2001; siehe auch Tabelle 1.4.). Die Frequenzen des Ile-251-Leu Polymorphismus werden in der Literatur mit 1,3-2,9 % bei den adipösen Patienten und mit 0,8-5,6 % bei den

normalgewichtigen Kontrollen angegeben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein Träger eines der Polymorphismen nicht in gesteigertem Maße für Adipositas prädisponiert ist.

4.4. Geschlechtsspezifische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden vollständige Familientrios mit einem extrem adipösen Indexpatienten und beiden Eltern untersucht. Dabei sollte die Transmission der Allele mit einer Mutation im *MC4R* bestimmt werden.
Bezüglich der Geschlechterverteilung fällt auf, das die mutationstragenden Mütter die Mutationen ausschließlich an ihre Töchter weitergaben. Die für die Mutation heterozygoten Väter gaben das betroffene Allel in drei Fällen an ihre Töchter und in zwei Fällen an ihre Söhne weiter. Mutationen des *MC4R* gehen in dieser Studie bei Probanden weiblichen Geschlechtes mit einer stärkeren Ausprägung des Übergewichtes einher. So liegen die BMI der mütterlichen Mutationsträger in allen Fällen über der 85. Perzentile, bei den väterlichen Mutationsträgern sind fast alle BMI-Werte unter der 85. Perzentile, einer sogar unter der 50. Perzentile zu finden. Die Mutationen werden häufiger auf weibliche Nachkommen transmittiert. Vor dem Hintergrund der bisher veröffentlichten Studien zur Häufigkeit der *MC4R* Mutationen (Branson *et al.,* 2003; Dubern *et al*., 2001; Farooqi *et al*., 2000 und 2003; Gotoda *et al*., 1997; Gu *et al*., 1999; Hinney *et al*., 1999 und 2003; Lubrano-Berthelier *et al.,* 2003; Marti *et al.,* 2003; Mergen *et al*., 2001; Vaisse *et al*., 2000; Yeo *et al*., 2003) findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern.

4.5. Die Beteiligung des Melanocortin-Sytems an der Entstehung von Adipositas

Nach dem agouti-Mausmodell und anderen (siehe Einleitung, S.11) war eine Beteiligung des Melanocortin-Systems an der Gewichtsregulation naheliegend. Vor allem *MC3R* und *MC4R* stellen die im Gehirn dominierenden MC Rezeptoren dar und werden beide vom agouti-Protein antagonisiert (Lu *et al*., 1994). Die entscheidende Rolle des *MC4R* bei der Regulation der Nahrungsaufnahme, und auch des metabolischen Energieverbrauchs, zeigen Studien an *MC4R*- Knockout (*MC4R* -/-) Mäusen (Huzar *et al*., 1997 und Chen *et al*., 2000). Diese Tiere zeigten keine Änderung

der Nahrungsaufnahme und des metabolischen Energieumsatzes nach Gabe von MTII, einem nicht-selektiven Melanocortinrezeptor-Agonist. Wildtypische Mäuse hingegen senkten nach MTII-Gabe die Nahrungsaufnahme und steigerten den Energieumsatz in Form von Wärme und Bewegung. Da bei *MC4R*-/- Mäusen der *MC3R* intakt ist, scheint dieser Rezeptor bezüglich Fressverhalten und Energieumsatz der Tiere nur eine eingeschränkte Rolle zu spielen. Neuere Fütterungsversuche an Mäusen zeigten ebenfalls, dass eine *MC4R* Defizienz zu einer gesteigerten kalorischen Effizienz führt (Marie *et al*., 2000).

Harrold und Mitarbeiter (2000) untersuchten an Ratten, welche Interaktionen zwischen Leptin und hypothalamischen MC4 Rezeptoren die individuelle Ansprechbarkeit auf nahrungsinduzierte Fettleibigkeit determinierten. Tiere, die vor dem Fütterungsbeginn mit besonders schmackhaftem Futter einen relativ hohen Leptinspiegel hatten, zeigten geringere Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme als Tiere mit zuvor niedrigerem Leptinspiegel. Die Tiere mit geringerer Gewichtszunahme und Hypophagie zeigten eine Herunterregulation der *MC4R*-Dichte im Nucleus arcuatus sowie in dorsomedialen und ventromedialen Nuclei des Hypothalamus. Die Level der extrahypothalamischen MC4 Rezeptoren und der hypothalamischen MC3 Rezeptoren waren unverändert. Harrold und Mitarbeiter gingen davon aus, dass die Herunterregulation der *MC4R* eine Folge von erhöhter Rezeptoraktivität, welche durch die vermehrte Leptin-induzierte Freisetzung des Agonisten α-MSH zustande kommt, darstellt. Dies könnte einen körpereigenen Versuch darstellen, Hyperphagie und Gewichtszunahme zu limitieren. Es ist denkbar, dass diese Mechanismen auch beim Menschen für individuell unterschiedliches Ernährungsverhalten in einer Umgebung mit ständigem Nahrungsangebot mitverantwortlich sind. Sequenzveränderungen des *MC4R* können diese Regulationsmechanismen auf verschiedene Arten beeinflussen und so den Phänotyp Adipositas mitverursachen. Eine neuere Studie von Branson *et al*. (2003) analysierte das Essverhalten von adipösen Probanden mit und ohne *MC4R* Mutationen sowie von gesunden Probanden. Dabei wurde ein „binge eating" Verhalten, also rezidivierende Essanfälle ohne Kompensation wie beispielsweise Erbrechen, bei allen *MC4R* Mutationsträgern festgestellt. Bei den adipösen Probanden mit wildtypischem *MC4R* wurde diese Störung in 14 % festgestellt, bei den normalgewichtigen Kontrollprobanden in keinem Fall.

Weiterhin haben genetische und pharmakologische Studien gezeigt, dass ein funktionsfähiger *MC4R* notwendig ist, um Entstehung der Adipositas zu vermeiden,

während ein kompletter Funktionsausfall dieses Gens einen beeindruckenden phänotypischen Effekt auf den BMI hat, jedoch keine für die Entwicklung oder Lebensfähigkeit entscheidenden Systeme beeinträchtigt (Huszar *et al*., 1997; Fan *et al*., 1997). Ein Einfluss auf verschiedene Bereiche der Gewichtsregulation wurde durch unterschiedliche Studien dargestellt. So untersuchten Marsh und Mitarbeiter die Regulation von *MC4R*-/- Mäusen auf verschiedene Parameter der Energieregulation (Marsh *et al*., 1999). *MC4R*-/- Mäuse zeigen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine verminderte Ansprechbarkeit auf Leptin. Da jedoch keine völlige Wirkungsblockade eintritt, könnte Leptin seinen inhibitorischen Effekt auf die Nahrungsaufnahme auch über andere neuronale Regulationswege als über den Melanocortin4 Rezeptor vermitteln. Die *MC4R*-/- Mäuse zeigen keine veränderten Reaktionen auf die anorektische Wirkung von Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Corticotropin releasing factor (CRF) oder Urocortin. Diese Faktoren scheinen vom MC4R-Regelkreis unabhängig zu funktionieren, was darauf hindeutet, dass der Mechanismus der Gewichtsregulation nicht auf einfachen linearen Zusammenhängen beruht, sondern ein kompliziertes Netzwerk aus vielen Faktoren ist, die im Einzelnen noch nicht vollständig bekannt sind. Menschen, die durch einen veränderten *MC4R* für die Entstehung von Adipositas prädisponiert sind, könnten bezüglich des Ausprägungsgrades dieses Phänotyps von anderen genetischen Faktoren beeinflusst werden. Eine zukünftige Aufklärung dieser Zusammenhänge kann das Verständnis und die Behandlung der Adipositas verbessern.

Fan und Mitarbeiter (2000) stellten die Hypothese auf, dass ein erhöhter basaler Plasmainsulinspiegel bei jungen, noch normalgewichtigen *MC4R*-/- Mäusen auf einer Behinderung der sympatisch-inhibitorischen Effekte auf die Bauchspeicheldrüse beruht, welche die Folge eines blockierten *MC4R*- Signalweges ist. Eine Insulinresistenz, die einen Risikofaktor für Diabetes mellitus Typ II darstellt, könnte also nicht nur eine Folge von Adipositas sein, sondern durch Störungen im Melanocortinsystem mitverursacht werden. Nicht nur durch die pharmakologischen Eigenschaften des *MC4R*, sondern auch durch seine Mutationsprävalenz bei adipösen Menschen, wird deutlich wie wichtig der *MC4R* als Kandidatengen für ein Erklärungsmodell der Entstehung von Fettleibigkeit ist.

4.6. Phänotypische Effekte der *MC4R* Veränderungen

Huszar und Mitarbeiter (1997) beobachteten bei dem Vergleich von *MC4R*-defizienten und gesunden Mäusen, dass die heterozygoten Mutationsträger in der Ausprägung des Körpergewichtes zwischen den homozygoten und den wildtypischen Tieren einzuordnen waren. Huszar und Mitarbeiter gingen deshalb von einem Gen-Dosis-Effekt des *MC4R* auf das Körpergewicht aus. Die *agouti*-Maus, deren Symptom der Adipositas ebenfalls auf einer Störung des *MC4R*-Signalweges beruht, zeigt im Vergleich zur *MC4R*-defizienten Maus eine weniger ausgeprägte Form der Adipositas (Yen *et al*., 1976; Figeri *et al*., 1988; Wolff *et al*., 1986). Geht man davon aus, dass bei Überproduktion des *MC4R*-Antagonisten agouti die Rezeptoren nicht vollständig blockiert werden, bei *MC4R*-defizienten Tieren jedoch gar keine intakten Rezeptoren hergestellt werden, spricht auch diese Überlegung für einen Gen-Dosis-Effekt. Die Knockout-Mäuse lassen also einen Gen-Dosis-Effekt für den *MC4R* vermuten. Tiere mit nur einem intaktem Gen sind adipöser und haben einen höheren Insulinspiegel als Tiere mit zwei intakten Genkopien. Einen deutlich größeren Effekt sieht man bei Tieren mit zwei zerstörten Genkopien.

Dieser Mechanismus kann auch bei der Untersuchung einer Patientenfamilie von Farooqi und Mitarbeiter vermutet werden (Farooqi *et al*., 2000). Durch zwei Verwandtenehen (Cousin und Cousine) innerhalb einer Familie konnten fünf homozygote Mutationsträger der Asn-62-Ser Mutation in der folgenden Generation beobachtet werden. Die homozygoten Träger wiesen BMI-Werte auf, die durchschnittlich 4,2 Standardabweichungen über dem altersentsprechenden BMI der Normalbevölkerung lagen (> 97. Perzentile). Die beiden homozygot wildtypischen Geschwister hatten einen altersentsprechend niedrigeren BMI als die Normalbevölkerung. Die heterozygoten Eltern zeigten leichte Erhöhungen der BMI-Werte (durchschnittlich 1,5 Standardabweichungen, entspricht etwa der 82. Perzentile).

Es wurde weiterhin ein zweiter homozygoter Träger einer *MC4R*- Mutation detektiert (Kobayashi *et al*., 2002). Beschrieben wurde eine zu einem Funktionsverlust führende Missense Mutation (Gly-98-Arg) bei einer extrem adipösen japanischen Frau (BMI = 62 kg/m^2). Eltern und Schwester der Frau waren heterozygot für diese Mutation und ebenfalls übergewichtig. Diese Mutation kann daher als Ko-dominante Vererbungsform der Adipositas bezeichnet werden.

Da Mutationen mit unterschiedlicher Lokalisation und verschiedenen Effekten auf die Rezeptorfunktion entdeckt wurden, deren heterozygote Träger extrem adipös sind, scheinen auch Genveränderungen auf nur einem Allel allein für die Ausprägung der Adipositas verantwortlich zu sein. Welcher Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt, wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich beschrieben. Nach Cody *et al.* (1999) beruht dies auf einem dominant- negativen Effekt, also auf einem aktiven hemmenden Einfluss des durch eine Mutation veränderten Allels auf das wildtypische Allel und dessen Genexpression. Huzar *et al*. (1997) gehen von dem Mechanismus der Haploinsuffizienz aus, dass also eine partielle Reduktion der Rezeptorfunktionen durch ein mutiertes Allel ausreicht, um den Phänotyp Adipositas zu verursachen. Ho *et al*. (1999) beschreibt nach *in vitro* Ko-Expressions-Studien bei zwei Frameshift-Mutationen (Codon 211 Deletion CTCT und Codon 244 Insertion GATT), dass diese weder die Funktion noch die Expression an der Zelloberfläche der wildtypischen Rezeptoren negativ beeinflussen. Somit wurde ein dominant-negativer Effekt bei diesen Mutationen ausgeschlossen. Auch Cone (2000) geht bei G-Proteinen wie dem MC4R im Allgemeinen davon aus, dass diese auf der ganzen Zelloberfläche als Monomere agieren und somit ein dominant-negativer Effekt bei heterozygoten Mutationsträgern eher unwahrscheinlich sei.

Bei der Vielzahl der detektierten Mutationen ist außerdem zu bedenken, dass eine reduzierte Penetranz und Expression der mit *MC4R* Mutationen assoziierten Adipositas auf Varianten in Modifikationsgenen beruhen könnte, die außerhalb und innerhalb des MC-Regelkreises Einfluss auf das Gewicht nehmen (Vaisse *et al*., 2000).

Bei der Gewichtung der *MC4R* Mutationen an der Beteiligung des Phänotyps Adipositas muss die unterschiedliche Relevanz der Mutationen berücksichtigt werden (siehe auch 4.2.). Ho *et al*. (1999) stellten die Vermutung auf, dass eine bestimmte Länge des Rezeptors für seine Funktion ausschlaggebend ist. Demnach seien Mutationen, welche die Sequenz der letzten 13-16 Aminosäuren am C-terminalen Ende betreffen, nicht relevant. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden funktionelle Studien der Mutationen angefertigt, wobei deutlich wurde, dass eine Deletion T in Codon 320 (13 Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende) eine Funktionseinschränkung des Rezeptors zur Folge hatte. Die Relevanz der Mutationen ist deshalb genau zu prüfen, da verschiedene Mutationen an gleichen Lokalisationen unterschiedliche Effekte haben können. Ein direkter Einfluss auf die Tertiärstruktur des Produktproteins, sowie eine Modulation intrazellulärer Kinasen und anderer Enzyme,

welche das Produktprotein beeinflussen könnten (Yeo *et al*., 2003), sind denkbar und werden sicher in Zukunft Gegenstand der Forschung sein.

4.7. Prävalenz der *MC4R* Mutationen

Monogene Formen der humanen Adipositas, wie durch beispielsweise die von Montague und Mitarbeitern beschriebene homozygote Veränderung des Leptingens (Codon 133 Deletion G) verursacht (Montague *et al*., 1997), kommen offenbar sehr selten vor (Hinney *et al*., 1997 und 1998). Zumal sie häufig mit anderen klinischen Auffälligkeiten einhergehen, wie beispielsweise Infertilität oder anderen endokrinen Störungen, können diese genetischen Defekte alleine nicht für den häufigen Phänotyp Adipositas verantwortlich gemacht werden. Die Prädisposition zu exzessiver Gewichtszunahme bei entsprechenden äußeren Faktoren könnte auf verschiedenen Mutationen unterschiedlicher Häufigkeit und Penetranz beruhen (Comuzzie *et al*., 1998).

Der *MC4R* zeigt mit ca. 3 % eine hohe Mutationsfrequenz bei adipösen Patientengruppen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen, welche nur in seltenen Fällen eine Mutation aufweisen (etwa 0,1 %, Übersicht siehe Einleitung). Vaisse und Mitarbeiter (2000) schätzen nach ihrer Studie eine Prävalenz der auf einer *MC4R* Mutation basierenden Adipositas auf 1 von 5000 in der Französischen Bevölkerung. In den vorausgegangenen Studien wurden Mutationen des MC4 Rezeptors, die signifikant mit der Entstehung von Adipositas in Zusammenhang gebracht werden, in sehr durchmischten Populationen gefunden, wie zum Beispiel in Nordamerika (Gu *et al*., 1999), Großbritannien (Farooqi *et al*., 2000), Frankreich (Vaisse *et al*., 2000) oder Deutschland (Hinney *et al*., 1999). Dies lässt vermuten, dass Veränderungen des *MC4R* weltweit für den Phänotyp der Adipositas mitverantwortlich sind. Hingegen können in kleineren, isolierten Populationen, wie beispielsweise bei den in Nordamerika lebenden Pima Indianern (Norman *et al*., 1999) solche Ergebnisse fehlen. Auch in einer Studie an adipösen Japanern mit Diabetes mellitus wurden bezüglich Veränderungen des MC4 Rezeptors keine signifikanten Unterschiede gefunden (Ohshiro *et al*., 1999). In einer Studie an 208 adipösen Kindern und Erwachsenen aus der süditalienischen Population wurde lediglich ein Träger einer *MC4R* Mutation detektiert, was einer Prävalenz von weniger als 0,5% entspricht (Miraglia del Guidice *et al*., 2002). Jacobson und Mitarbeiter (2002) untersuchten

insgesamt 433 hellhäutige und 95 farbige Probanden (davon 94% weiblich) auf *MC4R* Mutationen. Die Patienten stammten aus schwedischen Studiengruppen und aus Memphis, USA. 264 von ihnen waren extrem adipös, ebenso viele waren normalgewichtige Kontrollen. Funktionell relevante *MC4R* Mutationen wurden bei adipösen Patienten und normalgewichtigen Kontrollen mit einer Frequenz von jeweils 1,5% beschrieben und zeigten somit keine signifikante Assoziation zwischen Adipositas und *MC4R* Mutationen.

4.8. Wahl des Probandenkollektivs

Das Probandenkollektiv extrem adipöser Kinder und Jugendlicher wurde ausgewählt, da eine stärkere genetische Prädisposition bei frühmanifester Adipositas gegenüber erst im Erwachsenenalter manifest werdender Fettleibigkeit angenommen werden kann. Die Auswahl erfolgte auch unter der Vorstellung, dass sich bei extrem adipösen Patienten, welche sich wegen ihrer Adipositas in Behandlung begeben, gehäuft Träger von genetischen Veränderungen, die für Übergewicht prädisponieren, finden könnten. Die Väter der Indexpatienten wiesen mit einem BMI von durchschnittlich 30,4 ± 5,7 kg/ m^2 und einem Durchschnittsalter von 44,5 ± 6,2 Jahren, die Mütter mit einem BMI von durchschnittlich 30,4 ± 6,7 kg/ m^2 und einem Durchschnittsalter von 41,5 ± 5,5 Jahren eher höhere BMI Werte auf als der Durchschnitt der Allgemeinbevölkerung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Eltern heterozygote Träger der möglicherweise für Adipositas relevanten Gene sind. Aber auch soziokulturelle und psychologische Faktoren können Adipositas in Familien fördern (Hebebrand *et al*., 1994).

In unserer Studiengruppe waren die Träger funktionell relevanter Mutationen jünger als die Träger von wildtypischen Allelen. *MC4R* Mutationen könnten also eher für früh manifestierende Adipositas prädisponieren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass jüngere Personen seltener als Patienten in den jeweiligen Kliniken erscheinen, da die Trennung von den Eltern weniger erwünscht wird und/ oder die Adipositas jüngerer Kinder oft nicht genau eingeschätzt wird.

4.9. Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die signifikant höhere Frequenz von funktionell relevanten Mutationen bei Adipösen im Vergleich zu nicht adipösen Kontollen (Hinney *et al*., 1999 und 2003.) und die signifikanten TDT- Ergebnisse dafür sprechen, dass *MC4R* Mutationen einen Hauptgeneffekt auf die Entwicklung von Adipositas haben. Diese Hypothese wird unterstützt vom genotypischen RR von 3,0 (95 % KI: 0,7 – 17,2) und die höheren BMI Werte der Träger funktionell relevanter Mutationen im Vergleich zu den übrigen Personen im Kollektiv der adipösen Patienten und deren Eltern. In Kombination mit der niedrigen Populationsfrequenz der Mutationsträger zeigen die Ergebnisse, dass *MC4R* Mutationen eine niedrige epidemiologische aber eine hohe individuelle Relevanz haben. Basierend auf den TDT Ergebnissen des Val-103-Ile Polymorphismus wird gezeigt, dass das 103-Ile Allel des MC4R einen eher protektiven Effekt auf die Entstehung von Adipositas haben könnte. Veränderungen der Aminosäuresequenz des *MC4R* können das Risiko für die Ausbildung von Adipositas sowohl herauf- als auch herabsetzen.

Übergewichtige bzw. adipöse Kinder und Jugendliche haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, auch im Erwachsenenalter adipös zu sein (Mossberg *et al*., 1989; Bray *et al*., 1992). Die Tendenz zur Entwicklung von Adipositas ist in großem Maße durch genetische Faktoren determiniert, jedoch sind zusätzliche Umweltfaktoren nötig, um diesen Phänotyp zur Ausprägung zu bringen. Die Kombination aus genetischer Prädisposition, Lebensweise und Umweltbedingungen bestimmen den Schweregrad der Adipositas. Die Aufklärung der multifaktoriell bedingten Adipositas stellt neben der Entwicklung von geeigneten Behandlungsmethoden eine große Herausforderung dar. Pharmakologische Ansätze, die auf Erkenntnissen der genetischen Mechanismen bei adipösen Menschen beruhen, bergen eine große Chance für die Zukunft. Der Melanocortin 4 Rezeptor stellt auch pharmakologisch ein interessantes Ziel dar, und in Zukunft muss geprüft werden, ob eine Behandlung mit *MC4R*-Agonisten medizinisch sinnvoll erscheint und ob diese nebenwirkungsarm mit einem geeigneten bioverfügbarem und toxikologischen Profil hergestellt werden können (Ravussin *et al*., 2000). Zu hoffen ist, dass der Stigmatisierung von Menschen mit Adipositas durch das Wissen um eine erbliche Mitentstehung in Zukunft entgegnet werden kann.

5. Zusammenfassung

Adipositas stellt in unserer Gesellschaft zunehmend nicht nur ein Problem für die Gesundheit und Lebensqualität des Betroffenen, sondern auch eine sozioökonomische Belastung für die Gemeinschaft dar. Zahlreiche Studien in den letzten Jahren unterstreichen dabei neben Umwelteinflüssen die Wichtigkeit genetischer Faktoren bei der Entstehung der Adipositas. Bei Familienstudien, Mausmodellen und epidemiologischen Untersuchungen erwies sich der Melanocortin 4 Rezeptor als ein wichtiges Kandidatengen, und in Folgestudien wurden zahlreiche adipöse Träger von Mutationen und Polymorphismen in diesem Gen beschrieben.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der *MC4R* Mutationen bei der Entstehung der Adipositas und deren Vererbungsmechanismen präzisiert. Dazu wurden 520 extrem adipöse Kinder und Jugendliche sowie deren Eltern mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion, der Einzelstrang- Koformationsanalyse und der Sequenzierung systematisch auf Veränderungen in der gesamten kodierenden Nukleotidsequenz des *MC4R* durchgeführt. Es wurden insgesamt 14 elterliche Mutationsträger und 11 Indexpatienten mit Mutation detektiert, wobei drei Indexprobanden und zwei Elternteile zwei Mutationen gleichzeitig aufwiesen. Unter den Mutationen fanden sich acht bis zu dem Entstehungszeitpunkt der Arbeit noch nicht beschriebene Mutationen (GA Del Codon 250, T Del Codon 320, Ser-94-Arg, Val-95-Ile, Ile-121-Thr, Ser-127-Leu, Ala-244-Glu und Ile-317-Thr). Die Transmission mutierter elterlicher Allele auf die Nachkommen konnte somit bestimmt und mit Hilfe des Transmissions Disequilibrium Tests bewertet werden. Dabei ergab sich, dass die 14 elterlichen Träger einer funktionell relevanten Mutation in 85,7 % das entsprechende Allel auf die Nachkommen transmittierten. Es zeigte sich auch, dass die elterlichen Mutationsträger einen höheren BMI als die übrigen untersuchten Eltern aufwiesen. Weiterhin war auffällig, dass von den detektierten 35 elterlichen Trägern des Val-103-Ile Polymorphismus das entsprechende Allel nur in acht Fällen auf den Indexprobanden transmittiert wurde. Dies deutet auf einen protektiven Effekt dieses Polymorphismus auf die Entstehung von Adipositas hin. Insgesamt sprechen die signifikant höhere Frequenz von funktionell relevanten Mutationen bei Adipösen im Vergleich zu nicht adipösen Kontrollen und die signifikanten TDT Ergebnisse für einen Hauptgeneffekt der *MC4R* Mutationen auf die Entstehung der Adipositas.

Referenzen:

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

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS.: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250-2.

Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J.: Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neuroci*. 1999; 19: RC26

Baskin D.G., Wilcox B.J., Figlewicz D.P., Dorsa D.M.: Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neuroci*. 1988; 11: 107-111

Baskin D.G., Breininger J.F., Schwartz M.W.: Leptin receptor mRNA identfies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 1999; 48 : 828-833

Benjannet S., Rondeau N., Day R., Chretien M., Seidah N.G. : PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. Proc *Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3564-3568

Benoit S.C., Schwartz M.W., Lachey J.L., Hagan M.M., Rushing P.A., Blake K.A., Yagaloff K.A., Kurylko G., Franco L., Danhoo W., Seeley R.J. : A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J Neuroci*. 2000; 20 : 3442-3448

Bouchard C., Temblay A., Després J.P., Nadeau A., Lupien P.J., Thériault, Dussault J., Moorjani S., Pinault S., Fournier G.: The response to long-term overfeeding in identical twins. *New Engl J Med*. 1990; 322: 1477-1482

Bouchard C., Perusse L.: Genetics of obesity. *Ann Rev Nutr* 1993; 13: 337-354

Branson R., Potoczna N., Kral J.D., Lentes K.U., Hoehe M.R., Horber F.F.: Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1096-1103

Bray G.A.: Hypothalamic and genetic obesity : an appraisal of the autonomic hypothesis and the endocrine hypothesis. *Int J Obesity* 1984; 8: 119-137

Bray G.A.: Adolescent overweight may be tempting fate. *N Engl J Med*. 1992; 327:1379-80

Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C.: Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 1991; 48: 137-144

Bultman S.J., Michaud E. J., Woychik R.P.: Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 1992; 71: 1195-1204

Bundesgesundheitsamt: die Gesundheit der Deutschen. *Soz.Ep*. 1994; Heft 4

Bundesministerium für Gesundheit: Ernährungsbedingte Krankheiten und ihre Kosten. *Gesundheit SdBr, Baden Baden, Nomos-Verlagsges*.1993, Vol 27

Burton B.T., Foster W.R., Hirsch J., Van Itallie T.B.: Report of conference proceedings. Health implications of obesity. An NIH consensus development conference. *Int J Obes*. 1985 ; 9: 155-170

Buselmaier W., Tariverdian G.: Humangenetik (2.Aufl.). *Springer Verlag Berlin, Tokio* 1999; 246, 387

Caro J.F., Kolaczynski J.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Opentanova I., Goldman W.H., Lynn R.B., Zhang P.L., Sinha M.K., Considine R.V.: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996; 348: 159-161

Chang A.C., Cochet M., Cohen S.N.: Structural organization of the human genomic DNA encoding the proopiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1980; 77: 4890-4894

Chen W., Kelly M.A., Opitz-Araya X., Thomas R.E., Low M.J., Cone R.D.: Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 1997; 91: 789-798

Chen A.S., Marsh D.J., Trumbauer M.E., Frazier E.G., Guan X.M., Yu H., Rosenblum C.I., Vongs A., Feng Y., Cao L., Metzger J.M., Strack A.M., Camacho R.E., Mellin T.N., Nunes C.N., Min W., Fisher J., Gopal-Truter S., MacIntyre D.E., Chen H.Y., Van der Ploeg L.H.: Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*. 2000; 26: 97-102

Chen A.S., Metzger J.M., Trumbauer M.E., Guan X.M., Yu H., Frazier E.G., Marsh D.J., Forrest M.J., Gopal-Truter S., Fisher J., Camacho R.E., Strack A.M., Mellin T.N., MacIntyre D.E., Chen H.Y., Vander Ploeg L.H.: Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgen Res*. 2000; 9: 145-154

Cheung C.C., Clifton D.K., Steiner R.A.: Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997; 138: 4489-4492

Classen M., Diehl V., Kochsiek K.: Innere Medizin. *Urban & Schwarzenberg Verlag* 4.Auflage 1998

Clement K., Vaisse C., Manning B.S., Basdevant A., Guy-Grand B., Ruiz J., Silver K.D., Shuldiner A.R., Froguel P., Strosberg A.D.: Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an ireased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med.* 1995; 333: 382-383

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

Cody J.D., et al.: Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor gene in individuals with deletions of 18q. *Hum Genet*. 1999; 105: 424-427

Coleman D.L., Burkart D.L.: Plasma corticosterone concentrations in diabetic (db) mice. *Diabetologia* 1977; 13: 25-26

Coleman D.L.: Obese and Diabetes : two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978; 14: 141-148

Comuzzie A.G., Allison D.B.: The search for human obesity genes. *Science* 1998; 280: 1374-1377

Cone R.D., Lu D., Koppula S., Vage D.I., Kiungland H., Boston B., Chen W., Orth D.N., Pouton C., Kesterson R.A.: The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res*. 1996; 51: 287-317

Cone R.D.: Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor: part of a thrifty genotype? *J of Clin Invest* 2000; 106: 185-187

Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Marco C.C., McKee L.J., Bauer T.L., et al.: Serum immunoreaktive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Engl J Med* 1996 ; 334 :295-295

De la Brousse F.C., Shan B., Chen J.L.: Identification of the promotor of the mouse *obese* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4096-4101

De Vos P., Saladin R., Auwerx J., Staels B.: Induction of ab gene expression by corticosteroids is accompanierd by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem.* 1995; 270:15958-15961

Deriaz O., Dionne F., Perusse L., Tremblay A., Vohl M.C., Cote G., Bouchard C.: DNA variation in the genes of the Na,K-adenosine triphosphatase and its relation with resting metabolic rate, respiratory quotient, and body fat. *J Clin Invest*. 1994; 93: 838-843

Deutsche Adipositas-Gesellschaft: Leitlinien zur Therapie der Adipositas, 1998

Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr. *Umschau Verlag*, Frankfurt 1991, 5.Überarbeitung

Dinulescu D.M., Fan W., Boston B.A., McCall K., Lamoreux M.L., Moore K.J., Montagno J., Cone R.D.: Mahogany (mg) stimulates feeding and increases basal metabolic rate independent of its supression of agouti. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998; 95: 12707-12712

Dubern B., Clement K., Pelloux V., Froguel P., Girardet J.P., Guy-Grand B., Tounian P.: Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and α-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatrics* 2001; 139: 204-209

Dubuc P.U.: Elevated glucocorticoids in obese-hyperglycemic mice. *Horm Metab Res*. 1975; 7: 102

Falk C.T. & Rubinstein P.: Haplotype relative risks: an easy way to construct a proper sample for risk calculations. *Ann Hum Genet*. 1987; 51: 227-233

Fan W., Boston B.A., Kesterson R.A., Hruby V.J., Cone R.D.: Role of melanocorinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997; 385:165-168

Farooqi I.S., Yeo G.S., Keogh J.M., Aminian S., Jebb S.A., Butler G., Cheethan T., O'Rahilly S.: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 2000; 106: 271-279

Farooqi I.S., Keogh J.M., Yeo G.S., Lank E.J., Cheetham T., O'Rahilly S.: Clinical spectrum of obesity and mutations in the Melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1085-1095

Frigeri L.G., Wolff G.L., Teguh C.: Differential responses of yellow A^{VY}/A and agouti A/a (BALB/c x VY) F_1 hybrid mice to the same diets: glucose tolerance, weight gain, and adipocyte cellularity. *Int J Obesity* 1988; 12: 305-320

Frigeri L.G., Wolff G.L., Robel G.: Impairment of glucose tolerance in yellow (Avy/A) (BALB/c X VY) F-1 hybrid mice by hyperglycemic peptide(s) from human pituitary glands. *Endocrinology* 1983;113: 2097-105.

Fong T.M., Mao C., MacNeil T., Kalyani R., Smith T., Weinberg D., Tota M.R., Van der Ploeg L.H.: ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys res Commun.* 1997; 237: 629-631

Gantz I., Miwa H., Konda Y., Shimoto Y., Tashiro T., Watson S.J., DelValle J., Yamada T.: Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem*.1993; 268: 15174-15179

Gibbs J., Smith G.P.: Satiety : the roles of peptides from the stomach and the intestine. *Fed Proc*.1986; 45: 1391-1395

Good D.J., Porter F.D., Mahon K.A., Parlow A.F., Westphal H., Kirsch I.R.: Hypogonadism and obesiy in mice with a targeted deletion of the Nhlh2 gene. *Nature Genet.* 1997; 15: 397-401

Gotoda T., Scott J., Aitman T.J.: Molecular screenig of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia* 1997; 40: 976-979

Graham M., Shutter J.R., Sarmiento U., Sarosi I., Stark K.L.: Overexpression of Agrt leads to obesty in transgenic mice. *Nat Genet*. 1997; 17: 273-274

Gray D.S.: Diagnosis and prevalence of obesity. *Med Clin North Am*. 1989; 73: 1-13

Gu W., Tu Z., Kleyn P.W., Kissebah A., Duprat L., Lee J., Chin W., Maruti S., Deng N., Fisher S.L., Franco L.S., Burn P., Yagaloff K.A., Nathan J., Heymsfield S., Albu J., Pi-Sunyer F.X., Allison D.B.: Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 1999; 48: 635-639

Gunn T.M., Miller K.A., He L., Hyman R.W., Davis R.W., Azarani A., Schlossman S.F., Duke-Cohan J.S., Barsh G.S.: The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* 1999; 398: 152-156

Harrold J.A., Williams G., Widdowson P.S.: Changes in hypothalamic agouti-related protein (AGRP), but not alpha-MSH or proopiomelanocortin concentrations in dietary-obese and food resticted rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 258 : 574-577

Harrold J.A., Williams G., Widdowson P.S.: Early Leptin Response to a Palatable Diet Predicts Dietary Obesity in Rats : Key Role of Melanocortin-4 Receptors in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *J Neurochem*. 2000; 74: 1224-1228

Haskell-Luevano C., Cone R.D., Monck E.K., Wan Y.P.: Structure activity studies of the melanocortin-4 receptor by in vitro mutagen identifikation of agouti-related protein (agrp), melanocortin agonist and synthetic peptide antagonist interaction determinants. *Biochem*. 2001; 40: 6164-6179

Hayashi K.: PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl*. 1992; 1: 34-38

Hebebrand J., Heseker H., Himmelmann W., Schäfer H., Remschmidt H.: Altersperzentilen für den Body-Mass-Index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren. *Akt Ernähr Med*. 1994; 19: 259-265

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

Hebebrand J., Wulftange H., Gorg T., Ziegler A., Hinney A., Barth N., Mayer H., Remschmidt H.: Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating? *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24: 345-353

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., Bornscheuer A., Depenbusch M., Mierke B., Tolle A., Middeke K., Ziegler A, Roth H., Gerber G., Zamzow K., Ballauff A., Hamann A., Mayer H., Siegfried W., Lehmkuhl G., Poustka F., Schmidt M.H., Hermann H., Herpertz-Dahlmann B.M., Fichter M., Remschmidt H., Hebebrand J.: No evidence for involvement of the leptin gene in anorexia nervosa, bulimia nervosa, underweight or early onset extreme obesity: identification of two novel mutations in the coding sequence and a novel polymorphism in the leptin gene linked upstream region. *Mol Psychiatry*. 1998; 3: 539-543.

Hinney A., Schmidt A., Notteboom 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1483-1486

Hinney A., Hohmann S., Geller F., Vogel C., Hess C., Wermter A., Brokamp B., Goldschmidt H., Siegfried W., Remschmidt H., Schäfer H., Gudermann T., Hebebrand J.: Melanocortin-4 Receptor Gene: Case-Constrol Study and Transmission Disequilibrium Test confirm that functionally relevant mutations are compatible with major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: *in press*.

Ho G., McKenzie R.G.: Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *J Biol Chem*. 1999; 274: 35816-35822

Hotamisligil G.S., Arner P., Caro J.F., Atkinson R.L., Spiegelman B.M.: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995; 95: 2409-2415

Human Genome Program Report: Primer on Molecular Genetics. *Human Genome Management Information System* 1992

Huzar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V., Dunmore J.H., Fang Q., Berkemeier L.R., Gu W., Kesterson R.A., Boston B.A., Cone R.D., Smith F.J., Campfield L.A., Burn P., Lee F.: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997; 88: 131-141

Jackson R.S., Creemers J.W.M., Ohagi S., Raffin-Sanson M.L., Sanders L., Montague C.T., Hutton J.C., O'Rahilly S.: Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 1997; 16:303-306

Jacobson P., Ukkola O., Rankinen T., Snyder EE., Leon AS., Rao DC., Skinner JS., Wilmore JH., Lonn L., Cowan GS. Jr., Sjostrom L., Bouchard C.: Melanocortin 4 Receptor Sequence Variations Are Seldom a Cause of Human Obesity: The Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and an Memphis Cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 4442-4446

Jemaa R., Tuzet S., Portos C., Betoulle D., Apfelbaum M., Fumeron F. : Lipoprotein lipase gene polymorphisms : associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese. *Int J Obes*. 1995; 19: 279-284

Kask A., Pahkla R., Irs A., Rago L., Wikberg J.E., Schioth H.B.: Long-term administration of MC4 receptor antagonist HS014 causes hyperphagia and obesity in rats. *Neuroreport* 1999; 10: 707-7111

Katzmarzyk PT., Hebebrand J., Bouchard C.: Spousal resemblance in the Canadian population: implications for the obesity epidemic. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26: 241-246

Kidd KK., Ott J.: Cytogenet. *Cell. Genet*. 1984; 37: 10

Kleyn P.W., Fan W., Kovats S.G., Lee J.J., Pulido J.C., Wu Y., Berkemeier L.R., Misumi D.J., Holmgren L., Charlat O., Woolf E.A., Tayber O., Brody T., Shu P., Hawkins F., Kennedy B., Baldini L., Ebeling C., Alperin G.D., Deeds J., Lakey N.D., Culpepper J., Chen H., Glucksmann-Kuis M.A., Moore K.J.: Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. *Cell* 1996; 85: 281-290

Kobayashi H., Ogawa Y., Shintani M., Ebihara K., Shimodahira M., Iwakura H., Hino M., Ishirhara T., Ikekubo K., Kurahachi H., Nakao K. : A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes*, 2002 ; 51 : 243-246

Krude H., Gruters A.: Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans : the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11: 15-22

Krude H., Biebermann H., Luck W., Horn W., Brabant G., Grüters A.: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998; 19: 155-157

Lander E.S. & Schork N.J.: Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-2048

Levitz L.S., Stunkard A.J. : A therapeutic coalition for obesity: Behaviour modifikation and patient self-help. *Am J Psychiatry* 1974; 131: 423-427

Li C., Loffe E., Fidahusein N., Connolly E., Friedman JM.: Absence of soluble leptin receptor in plasma from db^{Pas} /db^{Pas} and other db/db mice. *J Biol Chem.* 1998; 273: 10078-10082

Low et al., Receptors for the melanocortin peptides in the central nervous system. *Curr Opin Endocrinol Diab*. 1994; 1:79-88

Lu D., Willard D., Patel I.R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Wenbiao C., Woychik R.P., Wilkison W.O., Cone R.: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 1994; 371: 799-802

Lubrano-Berthelier C., Durand E., Dubern B., Shapiro A., Dazin P., Weill J., Ferron C., Froguell P., Vaisse C.: Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 145-153

MacDougald O.A., Hwang C.S., Fan H., Lane M.D.: Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9034-9037

Maffei M., Fei H., Lee G.H., Dani C., Leroy P., Zhang Y., Proenca R., Negrei R., Ailhaud G., Friedman J.M.: increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6957-6960

Marie L.S., Miura G.I., Marsh D.J., Yagaloff K., Palmiter R.D.: A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *PNAS* 2000; 97: 12339-12344

Marti A., Corbalán M.S., Forga L., Martinez J.A., Hinney A., Hebebrand J.: A novel nonsense mutation in the melanocortin-4 receptor associated with obesity in a Spanish population. *Int J Obesity* 2003; 27: 385-388

Marsh D.J., Hollopeter G., Huszar D., Laufer R., Yagaloff K.A., Fisher S.L., Burn P., Palmiter R.D.: Response of melanocortin-4 receptor-defizient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet*. 1999; 21:119-122

Mergen M., Mergen H., Ozata M., Oner R., Oner C.: A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol*. 2001; 86: 3448-3451

Michaud E.J., Bultman S.J., Klebig M.L., van Vugt M.J., Stubbs L.J., Russell L.B., Woychik R.P.: A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 29: 2562-2566

Michaud E.J., Bultman S.J., Stubbs L.J., Woychik R.P.: The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. *Genes Dev.* 1993; 7: 1203-1213

Miller S.A.: Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* 1997; 146: 1407-1415

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215

Miraglia del Giudice E., Cirillo G., Nigro V., Santoro N., D'Urso L., Raimondo P., Cozzolino D., Scafato D., Perrone L.: Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26: 647-651

Mizuno TM., Mobbs CV.: Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 1999; 140: 814-817

Mizuno TM., Kleopoulos SP., Bergen HT., Roberts JL., Priest CA., Mobbs CV.: Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and in *ob/ob* and *db/db* mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998; 47: 294-297

Moll P.P., Burns T.L., Lauer R.M.: The genetic and environmental sources of body mass index variability: The Muscatine ponderosity family study. *Amer J Hum Genet*. 1991; 49: 1243-1255

Montague C.T., Faooqui I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Sewter C.P., Digby J.E., Mohammed S.N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R., Barnett A.H., Prins J.B., O'Rahilly S.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-908

Mossberg H.O.: 40-year follow-up of overweight children. *Lancet* 1989; 2: 491-493.

Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D.: Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocinol*. 1994; 8: 1298-1308

Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaktion. *Meth Enzymol.* 1987; 155: 335

Murakami D.M., Horwitz B.A., Fuller C.A.:Circadian rhythms of temperature and activity in obese and lean Zucker rats. *Am J Physiol*. 1995; 269: 1038-1043.

Murphy B., Nunes CN., Ronan JJ., Harper CM., Beall MJ., Hanaway M., Fairhurst AM., Van der Ploeg LH., McIntyre DE., Mellin TN.: Melanocortin mediated inhibition of feeding behavior in rats. *Neuropeptides* 1998; 32: 491-497

Nagase J., Yoshida T., Kumamoto K., Umekawa T., Sakane N., Nikami H., Kawada T., Saito M.: Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3-adrenergic agonist. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2898-2904

Naggert J.K., Fricker L.D., Varlamov O., Nishina P.M., Rouille Y., Steiner D.F., Carroll R.J., Paigen B.J., Leiter E.H.: Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genet*. 1995; 10: 135-142

Nagle DL., Mgrail 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 CA., Moore KJ.: The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* 1999; 398: 148-152

Neel J.V. : Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by progress. *Am J Hum Genet.* 1962; 14: 353-362

Neel J.V.: The "thrifty genotype" in 1998. *Nutr Rev* 1998; 57: 2-9 Review

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

Norman R.A., Permana P., Tanizawa Y., Ravussin E.: Absence of genetic variation in some obesity canidate genes (GLP1R, ASIP, MC4R, MC5R) among Pima Indians. *Int J Obes.* 1999; 23: 163-165

Ohshiro Y., Sanke T., Ueda K., Shimajiri Y., Nakagawa T., Tsunoda K., Nishi M., Sasaki H., Takasu N., Nanjo K.: Molecular scanning for mutations in the melanocortin-4 receptor gene in obese/diabetic Japanese. *Ann Hum Genet.* 1999; 63: 483-487

Ollmann MM., Wilson BD., Yang YK., Kerns JA., Chen Y., Gantz I., Barsh GS.: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997; 278: 135-138

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.: Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaktion. *Genomics* 1989; 5: 874-879

Ott J.: Statistical properties of the haplotype relative risk. *Genet Epidemiol.* 1989; 6:127-130

Owen M.J., Holmans P., McGuffin P.: Association studies in psyciatric genetics. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 270-273

Patterson et al., Chronic infusion of a melanocortin receptor agonist causes weight loss due to decreased food intake and increased metabolic rate. *Abstracts Society for Neurocsience, 29th Annual Meeting, Miami Beach, Florida* 1999; 25: 618

Prader A., Labhart A., Willi H.: Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr.* 1956; 86: 1260-1261

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. Walter de Guyter Verlag; 257. Auflage 1994

Rankinen T., Pérusse L., Weisnagel SJ., Snyder EE., Chagnon YC., Bouchard C.: The Human Obesity Gene Map: The 2001 Update. *Obes Res*. 2002; 10: 196-243

Ravussin E., Bouchard C.: Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. *Eur J Pharmacol*. 2000; 410: 131-145

Ravussin E.: Metabolic differences and the development of obesity. *Metabolism* 1995; 9:12-14

Rolland-Cachera M.F., Belliste F., Deheeger M. In: Björntrop P., Rössner S. (Eds) Obesity in Europe ’88. *John Libbey London, Paris* 1988

Roselli-Rehfuss L., Mountjoy K.G., Robbins L.S., Mortrud M.T., Low M.J., Tatro J.B., Entwistle M.L., Simerly R.B., Cone R.D.: Identification of a receptor for gamma melanotropin and other poopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8856-8860

Rosmond R., Chagnon M., Bouchard C., Bjorntorp P.: A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia* 2001; 44: 1335-1338

Rossi M., Kim MS., Morgan DG., Small CJ., Edwards CM., Sunter D., Abusnana S., Goldstone AP., Russel SH., Stanley SA., Smith DM., Yagaloff K., Ghatei MA., Bloom SR.: A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998; 140: 4923-4931

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Nat Acad Sci.* 1977; 74: 5463-5467

Satoh N., Ogawa Y., Katsunra G., Numata Y., Masuzaki H., Yoshimasa Y., Nakao K.: Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci Lett* 1998; 29: 107-110

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

Schumpelick V., Bleese N.M., Mommsen U.: Chirurgie. Thieme Verlag Stuttgart, New York 2000, 5. Auflage: 783-784

Schwartz M.W., Seeley R.J., Woods S.C., Weigle D.S., Campfield L.A., Burn P., Baskin D.G.: Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997; 46: 2119-2122

Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D.Jr., Seeley R.J., Baskin D.G.: Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671

Seeley R.J.: Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 1997; 390: 349

Seidell J.C.: The impact of obesity on health status: some inplications for health care costs. *Int J Obesity* 1996; 19: 13-16

Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W., Stone E.M.: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-332

Shutter JR., Graham M., Kinsey AC., Scully S., Luthy R., Stark KL.: Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev*. 1997; 11: 593-602

Sjöström L., Rissanen, Andersen T., Boldrin M., Golay A., Koppeschaar H., Kraupf M.: Randomized placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Ter Arkh* 2000; 72: 50-54

Smith AI., Funder JW.: Proopiomelanocortin processing in the pituitary central nervous system and peripheral tissues. *Endocr Rev*. 1988; 9: 159-179

Sorensen TI., Price RA., Stunkard AJ., Schulsinger F.: Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *Brit med J* 1989; 298: 87-90

Spielman R.S., Ewens W.J.: TDT clarification *Am J Hum Genet* 1999; 64:668

Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J.: Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Gen.* 1993; 52: 506-516

Strachan T. & Read A.P.: Human molecular genetics 2nd edition, *New York: Wiley-Liss* 1999

Strachan T. & Read A.P.: Molekulare Humangenetik, *Akad. Verlag, Heidelberg* 1996

Stanley B.G., Kyrkouli S.E., Lampert S., Leibowitz S.F.: Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyrphagia and obesity. *Peptides* 1986; 7: 1189-1192

Stephens T.W., Basinski M., Bristow P.K., Bue-Valleskey J.M., Burgett S.G., Craft L., Hale J., Hoffmann J., Hsiung H.M., Kriauciunas A., et al.: The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene produkt. *Nature* 1995; 338: 1-7

Strobel A., Issan T., Camoin L., Ozata M., Strosberg A.D.: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genet*. 1998; 18: 213-215

Stunkard A.J., Sorensen T.I., Hanis C., Teasdale T.W., Chakraborty R., Schull W.J., Schulsinger F.: An adoption study of human obesity. *New Engl J Med.* 1986; 314: 193-198

Stunkard A.J., Harris J.R., Petersen N.L.: The body-mass index of twins who have been reared apart. *New Engl J Med*. 1990; 322: 1483-1487

Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., et al.: *Cell* 1995; 83: 1263-1271

Taylor P., Munson K., Gjerde D.: Detection of Mutations and Polymorphisms on the Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System. *Transgenomic, Inc*. 1998, 2000; Application Note 101

Tecott LH., Sun LM., Akana SF., Strack AM., Lowenstein DH., Dallman MF., Julius D.: Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT2c serotonin receptors. *Nature* 1995; 374: 542-546

Trayhurn P., Ducan J.S., Rayner D.V.: Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice : mediation by the sympathetic system. *Biochem J.* 1995; 311: 729-733

Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L.: Grehlin induces adiposity in rodens. *Nature* 2000; 407: 908-913

Van Dijk G., Thiele T.E.: Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide: a central regulator of satiety and interoceptive stress. *Neuropeptides.* 1999; 33: 406-14

Vaisse C., Clement K., Durand E., Hercberg S., Guy-Grand B., Frougel P. : Melanocortin-4 receptor and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest.* 2000; 106: 253-262

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

Watson P.E., Watson I.D., Batt R.D.: Obesity indices. *Am J Clin Nutr*. 1979; 32: 736-737

Weber A., Toppari J., Harvey RD., Klann RC., Shaw NJ., Ricker AT., Nanto-Salonen K., Bevan JS., Clark AJ.: Adrenocorticotropin receptor gene mutations in familial glucocorticoid deficiency : realionships with clinical features in four families. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 65-71

Weigle DS.: Appetite and the regulation of body composition. *FASEB J.* 1994; 8:302-310

Weintraub M., Rubio A., Golik A., Byrne L., Scheinbaum ML.: Sibutamine in weight control: A dose-ranging, efficacy study. *Clin Pharmacol Ther*. 1991; 50: 330-337

Wilson BD., Bagnol D., Kaelin CB., Ollmann MR., Gantz J., Watson SJ., Barsh GS.: Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 1999; 140: 2387-2397

Wirth et al., Bewegungstherapie bei Adipositas. In: Wechsler JG (Hrsg.): Adipositas-Ursachen und Therapie. Berlin, Blackwell, 1998; 241

Wolff O.H., Lloyd J.K.: Childhood obesity. *Proc Nutr Soc*. 1973; 32 :195-8

Wolff O.H.: Prenatal determination of obesity, tumor susceptibility and coat color pattern in viable yellow (A^{VY}/a) mice. *J Hered.* 1986; 77: 151-158

Woolf B.: On estimating the relationship between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 1955; 19: 251-253

World Health Organization, WHO physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO expert committee. *WHO Geneva* 1995

World Health Organization, WHO report obesity: Preventing and managing the global epidemie.Report of a WHO consulation of obesity. *WHO Geneva* 1998

Yaswen L., Diehl N., Brennan MB., Hochgeschwender U.: Obesity in the mouse model of pro-.opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med*. 1999; 5: 1066-1070

Yen TT., Greenberg MM., Yu PL., Pearson DV.: An analysis of the relationships among obesity, plasma insulin, and hepatic lipogenic enzymes in “viable yellow obese” mice (A^{VY}/a). *Horm Metab Res*. 1976; 8: 159-166

Yen T.T., Gill A.M., Frigeri L.G., Barsh G.S., Wolff G.L. : Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow A (vy)/- mice : ectopic expression of the agouti gene. *FASEB J.* 1994; 8: 479-488

Yeo G.S.H., Farooqi S., Aminian S., Halsall D.J., Stanhope R.G., O’Rahilly S.: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*. 1998; 20: 111-112

Yeo G.S.H., Lank E.J., Farooai I.S., Keogh J., Challis B.G., O’Rahilly S.: Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 561-574

Zang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologe. *Nature* 1994; 372: 425-432

Anhang:

I. Curriculum vitae

Constanze Vogel

Geburtsdaten: 13.07.1978 in Frankfurt a. M.

Schule:

- 1985 bis 1990 Ludwig- Uhland- Schule, Gießen
- 1990 bis 1997 Landgraf- Ludwig- Schule, Gießen
- Juni 1997 Abitur

Studium der Medizin:

Oktober 1997 bis November 2003 Studium an der Philipps- Universität Marburg:

- September 1999 Ärztliche Vorprüfung
- September 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- September 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- November 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
  (Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung : 1,8)

Famulaturen:

- März 2000 Famulatur am Universitätsklinikum Innsbruck (A), Fachbereich Neurologie
- Juli/August 2001 Famulatur am King's College Hospital London (GB), Fachbereich Psychiatrie
- September 2001 Praxisfamulatur bei Dr. Fehmann, niedergelassener Internist Marburg
- Februar/ März 2002 Famulatur am Universitätsklinikum Marburg, Fachbereich Pädiatrie

Praktisches Jahr:

- Oktober 2002 bis Februar 2003 Innere Medizin am Universitätsklinikum Marburg
- Februar 2003 bis Juni 2003 Chirurgie am Hôpital régional de Delémont (CH)
- Juni 2003 bis September 2003 Wahlfach Anästhesie am Universitätsklinikum Marburg

Promotion: September 2000 bis Juni 2001 praktischer Teil der Promotionsarbeit in der Klinischen Forschergruppe

II. Verzeichnis der akademischen Lehrer

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

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

III. Danksagung

Die vorliegende Arbeit habe ich in der Klinischen Forschergruppe der Kinder- und Jugendpsychiatrie des Universitätsklinikums Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt und Herrn Prof. Dr. J. Hebebrand durchgeführt. Danken möchte ich allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. J. Hebebrand danke ich für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas und für seinen persönlichen Einsatz bei der Begleitung der Arbeit.
Insbesondere danke ich Frau Dr. A. Hinney für ihre Anregungen zu dieser Arbeit und die intensive fachliche und menschliche Betreuung während der Durchführung.

Den Herren Prof. Dr. A. Ziegler, Prof. Dr. H. Schäfer und Dipl.-Stat. F. Geller danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der biometrischen Daten zu dieser Arbeit.

Frau G. Gerber danke ich für die freundliche Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die zuverlässige Hilfsbereitschaft.
Für das kollegiale Arbeitsklima und die gute Teamarbeit im Labor möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Benjamin Antwerpen und Anne Hoch bedanken. Mein Dank gilt auch allen hier nicht namentlich erwähnten Institutsmitgliedern, die zu der angenehmen Atmosphäre beigetragen haben.

Ferner möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich während des gesamten Studiums und während dieser Arbeit unterstützt haben und mir den nötigen Rückhalt gaben. Ein ganz besonderer Dank gilt Thorsten Osterhaus, der mir nicht nur mit seinen Computerkenntnissen eine Hilfe war, sondern mir vor allem emotionale Unterstützung gegeben hat.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren finanzielle Unterstützung unsere Projekte ermöglicht wurden.

Nicht zuletzt möchte ich allen Patienten und deren Angehörigen danken, ohne die eine Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Hauptgeneffekt auf die Entstehung extremer Adipositas bei Kindern und Jugendlichen durch funktionell relevante Mutationen des Melanocortin 4 Rezeptor- Gens*“ in der Klinischen Forschergruppe der Klink für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. J. Hebebrand mit Unterstützung durch Dr. A. Hinney ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und die der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.
Vorliegende Arbeit wurde unter dem Titel „*melanocortin-4 receptor gene: case-control study and trasmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity*“ in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: The journal of clinical endocrinology & metabolism 2003; 88: 4258-4267.
Posterpräsentation: NGFN/DHGP (National Genome Research Net/ Deutsches Human-genomprojekt) Symposium 2002, Berlin.

Marburg, 2004

Constanze Vogel