

Aus dem Institut für Pädiatrische Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Allelfrequenz dreier Single Nukleotid
Polymorphismen im Glukose-abhängigen
insulinotropischen Peptid Rezeptor an übergewichtigen
und normalgewichtigen Kindern aus dem Raum Berlin**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Jeannine Susanne Sauber
aus Berlin

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. H. Biebermann
 2. PD Dr. rer. nat. A. Hinney
 3. PD Dr. rer. nat. H. Al-Hasani

Datum der Promotion: 19.11.2010

Meinen lieben Eltern

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
AGA	Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter
AgRP	Agouti-Related Protein
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BMI	Body-Mass-Index
C	Cytosin
cAMP	cyklisches Adenosin 3',5'-Monophosphat
CDCV	common disease common genetic variant
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EP	Extensionprimer
<i>Exo I</i>	Exonuklease I
G	Guanin
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropisches Polypeptid
GIPR	Glukoseabhängiges insulinotropischer Polypeptid Rezeptor
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
GWA	genomweite Assoziationsstudien
hME	homologe Massenextension
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HOMA-IR	Homeostase Assessment Model für Insulinresistenz
IOTF	International Obesity Task Force
KIGGS	Kinder- und Jugendgesundheitssurvey
LD	Linkage Disequilibrium

MAF	Minimal Allel Frequency
MALDI TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
n	Fallzahl
NCBI	National Center for Biological Information
OGTT	Oraler Glukose Toleranz Test
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
rpm	rounds per minute
rxn	reaction
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Standard Deviation Score (Standardabweichung)
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	Thermos Aquaticus
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eckdaten der Adipositas	1
1.1.1	Definition der Adipositas	1
1.1.2	Epidemiologische Daten von Adipositas im Kindesalter	3
1.1.3	Folgen der Adipositaserkrankung	4
1.1.4	Risikofaktoren für eine Adipositasentwicklung	6
1.2	Energiehomeostase und Gewichtsregulation	7
1.2.1	Der Leptin - Melanocortin - Regelkreis	7
1.3	Genetik der Adipositas	9
1.3.1	Monogenetische Ursachen für Adipositas	10
1.3.2	Polygenetische Ursachen für Adipositas	11
1.4	Der GIP-Rezeptor und sein Ligand	14
1.4.1	Das Inkretin GIP	14
1.4.2	Der GIP-Rezeptor	14
1.4.3	Physiologie des GIP-GIPR-Signalweges	15
1.4.4	Das GIPR-Gen: ein Adipositas-Kandidatengen	16
1.5	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20

2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Chemikalien	22
2.1.3	Enzyme	22
2.1.4	Puffer und Lösungen	23
2.1.5	Kits	23
2.1.6	Primer	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	Studienpopulation und klinische Daten	25
2.2.2	DNA-Extraktion	27
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	28
2.2.4	Gelelektrophorese	30
2.2.5	Enzymatischer Verdau	31
2.2.6	SNaPshot Reaktion	33
2.2.7	i-plex Reaktion	36
2.2.8	Post extension treatment	37
2.2.9	Elektrophorese	38
2.2.10	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight	40
2.2.11	Statistische Methoden	41
2.2.12	Datenbanken	43
2.2.13	Computer Software	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Parameter der Studienpopulation	44
3.1.1	Anthropometrische Parameter	44
3.1.2	Der HOMA-IR-Wert	46
3.1.3	Auftrennung der Kinder in ethnische Gruppen	46
3.2	Auswertung der Frequenzen der drei SNPs	48
3.2.1	Assoziationsuntersuchung zwischen den SNPs und der BMI-SDS	49
3.2.2	Assoziationsuntersuchung zwischen den SNPs und dem Geschlecht	52

3.2.3	Assoziationsuntersuchung zwischen den SNPs und der ethnischen Herkunft	56
3.2.4	Multiple lineare Regression	60
3.3	Auswertungen des HOMA-IR-Werts	60
3.3.1	Assoziationsuntersuchung zwischen dem HOMA-IR-Wert und der BMI-SDS	60
3.3.2	Assoziationsuntersuchung zwischen dem HOMA-IR-Wert und den Polymorphismen	61
3.4	Auswertung der Haplotypen	63
3.4.1	Assoziationsuntersuchung zwischen HOMA-IR-Wert und der Haplotypverteilung	66
3.4.2	Assoziationsuntersuchung zwischen dem Geschlecht und der Haplotypverteilung	68
4	Diskussion	69
4.1	Studienpopulation	70
4.1.1	Alters-Bias	70
4.1.2	Phänotypgruppendefinitions-Bias	71
4.1.3	Geschlechts-Bias	71
4.1.4	Stratifikations-Bias	72
4.2	Einflüsse der untersuchten SNPs auf die Adipositasentstehung	73
4.2.1	Assoziationsuntersuchung zwischen den drei SNPs und Adipositas	73
4.2.2	Replikationsschwierigkeiten von Assoziationsstudien	75
4.2.3	Assoziationsuntersuchung zwischen den drei SNPs und dem HOMA-IR	76
4.2.4	Haplotypen-Bestimmung	77
4.3	Der GIPR und seine Rolle als Adipositas-Kandidatengen	78
4.4	Weitere Ursachen der Adipositas	79
5	Zusammenfassung	80

Kapitel 1

Einleitung

Übergewicht und Fettleibigkeit bilden unter Kindern und Jugendlichen ein zunehmendes Problem [87, 51], welches nicht nur zu erheblichen gesundheitlichen Folgen für die Betroffenen führt [15, 10, 43], sondern auch mit enormen wirtschaftlichen Einbußen und Krankenkassenkosten für die deutsche Gesellschaft einhergeht [86].

Die Erforschung von Faktoren, die zu Adipositas führen und sie prädisponieren, ist neben der Prävention und Aufklärung über die Erkrankung eine wichtige Komponente, um dieses Problem in Angriff zu nehmen. Genetische Studien tragen ihren Teil dazu bei, indem sie Ansatzpunkte für mögliche spätere Therapieoptionen herauszukristallisieren suchen.

1.1 Eckdaten der Adipositas

1.1.1 Definition der Adipositas

Adipositas bezeichnet die Einlagerung übermäßigen Fettgewebes im Körper und die damit einhergehenden krankhaften Veränderungen. Die Weltgesundheitsorganisation definiert Übergewicht und Fettleibigkeit (Adipositas) anhand des Körpermassenindex, Body-Maß-Index (BMI) [89, 17]. Dieser Index stellt ein körperlängenkorrigiertes Relativgewicht dar und entspricht dem Quotienten aus Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern [80].

Übergewicht wird bei Erwachsenen ab einem BMI von 25 kg/m^2 und Adipositas ab einem BMI von 30 kg/m^2 definiert. Der BMI wird geschlechtsunabhängig berechnet.

Die BMI-Grenzwerte sind gut geeignet, Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen zu definieren, da das Verhältnis aus Körperlänge und -gewicht ab dem jungen Erwachsenenalter überwiegend konstant bleibt. Die BMI-Entwicklung im Kindesalter unterliegt hingegen einem nicht linearen Verlauf, da die physiologische Längen- und Gewichtszunahme nicht proportional zueinander erfolgen. Sie zeichnet sich durch hohe BMI-Werte (17 kg/m^2) im Alter von 4-6 Monaten, einem Abfall (15 kg/m^2) bis zum 5. - 7. Lebensjahr und einem dann eintretendem „rebound“ des BMIs mit kontinuierlichem Anstieg bis ins Erwachsenenalter aus [17, 46, 76]. Die BMI-Grenzwerte für das Erwachsenenalter können somit nicht auf das Kindesalter übertragen werden.

In Anlehnung an das Ziel der 1994 gegründeten Childhood Group der International Obesity Task Force (IOTF), Definitionen für Übergewicht und Adipositas im Kindesalter zu erstellen, hat die Arbeitsgruppe von Kromeyer-Hauschild Definitionen für Übergewicht und Adipositas für Kinder in Deutschland anhand erstellter BMI-Perzentilenkurven formuliert [48]. Diese stellen graphisch den Verlauf eines Parameters über die Zeit hinweg dar, wobei jeweils verschiedene Kurven für unterschiedliche Perzentilen erstellt werden. Sie ermöglichen es, die Entwicklung eines Kindes mit der anderer Kinder zu vergleichen und sie einer bestimmten Perzentilengruppe zuzuordnen. Perzentilenkurven werden erstellt, wenn der untersuchte Parameter keine Normalverteilung aufweist. Die Abbildung 1.1 stellt die von Kromeyer-Hauschild und Mitarbeitern veröffentlichten Perzentilenkurven dar.

Die Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) empfiehlt, Übergewicht bei Kindern ab der 90. Perzentile und Adipositas ab der 97. Perzentile der erhobenen Daten der Arbeitsgruppe von Kromeyer-Hauschild zu bezeichnen [7, 47, 48]. Diese hat 2001 nationale Referenz-BMI-Perzentilenkurven für Kinder von der Geburt bis zum 18. Lebensjahr erstellt [48]. Dafür wurden 17 verschiedene regionale Studien aus Deutschland betrachtet, die als Referenzgruppe für aktuelle epidemiologische Studien herangezogen werden.

Für die erhobenen BMI-Perzentilenkurven wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe von

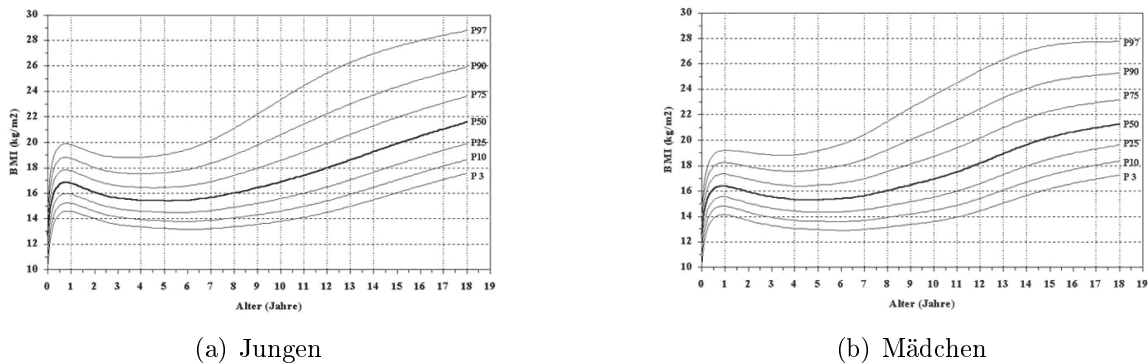


Abbildung 1.1: Perzentilen für den Body-Mass-Index für Jungen und Mädchen im Alter von 0 bis 18 Jahren nach Kromeyer-Hauschild, Uni Jena.

Kromeyer-Hauschild nach dem Verfahren von Cole und Mitarbeitern [17] BMI-Standardabweichungen (BMI-SDS) anhand logarithmisierte normalverteilter BMI-Verläufe erstellt. Anders als der reine BMI beinhalten die BMI-SDS eine Information über das Verhältnis zwischen dem Patienten-BMI und dem geschlechts- und altersspezifischen Norm-BMI. Eine Standardabweichung von + 1 beziehungsweise - 1 entspricht dabei dem Bereich der 84. beziehungsweise der 16. Perzentile. Eine Abweichung um 2 Standardabweichungen entspricht der 97,7. beziehungsweise der 2,3. Perzentile [48, 17].

Erst diese erstellten Definitionen erlauben es, die genaue Inzidenz und Prävalenz von Adipositas zu beziffern.

1.1.2 Epidemiologische Daten von Adipositas im Kindesalter

Die Adipositasprävalenz in Europa und Deutschland

Der Anteil der übergewichtigen und adipösen Bevölkerung in Deutschland hat sich seit Beginn der 80er Jahre verdoppelt. Dieser Trend ist in besonderem Maße auch bei Kindern und Jugendlichen zu beobachten: etwa 24% der Kinder und Jugendlichen in Europa sind übergewichtig [87, 51]. In den USA, England, Australien und China wächst die Rate übergewichtiger Kinder schneller an als die Übergewichtigenrate Erwachsener [3]. Im Frühjahr 2007 sind im Rahmen der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KIGGS) des Robert Koch Instituts aktuelle Daten zur Prävalenz des Über-

gewichts und der Adipositas im Kindesalter veröffentlicht worden. Aus der Studie geht hervor, dass etwa 15% der 3- bis 17-Jährigen in Deutschland übergewichtig und weitere 6,3% der Kinder adipös sind [87, 51].

Übergewicht und Adipositas sind Erkrankungen, die keine geschlechtsspezifischen Unterschiede aufweisen. Die Progredienz von Übergewicht und Adipositas verläuft parallel zur Pubertätsentwicklung: Ältere Jugendliche sind häufiger übergewichtig beziehungsweise adipös als präpubertäre Kinder. Dies spiegeln folgende Zahlen des KIGGS in Hinblick auf Übergewicht wider: 9% der 3- bis 6-jährigen Kinder sind übergewichtig, über 15% der 7-bis 10-jährigen und bis zu 17% der 14- bis 17-jährigen Jugendlichen sind übergewichtig. Die Adipositasentwicklung weist einen ähnlichen Verlauf auf: Die Prävalenz der Adipositas bei den 3- bis 6-Jährigen liegt bei 2,9%, bei den 7- bis 10-Jährigen bei 6,4% und bei den 14-bis 17-Jährigen bei 8,5% [51]. Besonders im Alter zwischen 14 und 17 Jahren ist ein Anstieg der Adipositasprävalenz in Deutschland zu verzeichnen: Verdreifachung der Anzahl betroffener Kinder seit den Aufzeichnungen aus den 1990er Jahren.

Nachfolgend werden als Referenzwerte für die Berliner Kinder, die in diese Studie aufgenommen wurden, die Prävalenzen von Übergewicht und Adipositas im Kindesalter für das Land Berlin betrachtet.

Adipositas bei Kindern aus dem Raum Berlin

Die Arbeitsgemeinschaft für Adipositas (AGA) beziffert im Jahr 2001 die Prävalenz übergewichtiger Kinder in Berlin mit 11,7%. 5,0% der Kinder sind adipös [47]. Diese Daten wurden geschlechtsunabhängig erhoben.

Die steigende Inzidenz von Adipositas im Kindesalter ist besonders aufgrund ihrer Langzeitfolgen in Hinblick auf die Gesundheit der zukünftigen Erwachsenen und somit auch auf die zukünftigen gesellschaftlichen Belastungen ein aktuelles Thema.

1.1.3 Folgen der Adipositaserkrankung

Übergewicht und Fettleibigkeit führen zu erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen. Die Adipozyten des viszeralen Fettgewebes produzieren Hormone, Adipokine, die zu einer

kontinuierlichen Entzündungsreaktion im Körper führen, welche einen der Grundpfeiler für die Entwicklung des Metabolischen Syndroms bildet [10, 43]. Dieses Syndrom beschreibt das gleichzeitige Auftreten von Adipositas, Cholesterin- und Insulinstoffwechselstörungen und einer koronaren Herzerkrankung mit Bluthochdruck [17]. Den Zusammenhang zwischen einem erhöhtem BMI und der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms verdeutlichen die folgenden Zahlen aus den USA: Die Prävalenz des Metabolischen Syndroms liegt bei 32,1% bei Kindern mit einem BMI oberhalb der 95. Perzentile und hingegen bei nur 0,1% bei Kindern mit einem BMI unterhalb der 85. Perzentile [19].

Auch konnte ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Taillenumfang und einer Hyperinsulinämie nachgewiesen werden, die Vorboten eines Typ II Diabetes mellitus ist [19, 20]. Calcaterra und Mitarbeiter konnten darüber hinaus zeigen, dass adipöse Kinder signifikant häufiger eine gestörte Insulinresistenz aufweisen als normalgewichtige Kinder [15]. Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ II ist bereits lange bekannt [45]. Die Entwicklung einer Insulinresistenz kann frühzeitig anhand des Homeostase Assessment Model für Insulinresistenz (HOMA-IR) erfasst werden. Der HOMA-IR-Wert berechnet sich aus dem Plasmanüchterninsulin- und dem Nüchtern glukosewert. Da es aktuell noch keine Studien zu Grenzwerten für den HOMA-IR-Wert für Kinder aus Deutschland gibt, werden zurzeit die 2003 publizierten Werte von der kanadischen Arbeitsgruppe von Allard und Mitarbeitern auf deutsche Kinder übertragen, wobei der Grenzwert für einen noch physiologischen Wert bei 3,0 mmol/l liegt. Hanley und Mitarbeiter konnten belegen, dass ein erhöhter HOMA-IR-Wert mit einer erhöhten Gefahr, eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln, einhergeht [32]. Somit spielt die Erfassung des HOMA-IR-Wertes eine wichtige Rolle in der Beschreibung adipöser Kinder und Jugendlicher.

Adipositas und ihre Folgeerkrankungen führen nicht nur zu schweren somatischen Beeinträchtigungen des Patienten, sondern auch zu höheren Inzidenzen an psychischen Erkrankungen im Kindesalter [47]. Hölling und Mitarbeiter zeigen in ihrer Studie auf, dass 21,9% der Kinder zwischen 11 und 17 Jahren an einer Essstörung leiden [36].

Aufgrund der anfallenden Krankenkassenbelastungen und der wirtschaftlichen Einbußen,

die mit Adipositas einhergehen, birgt diese Erkrankung darüber hinaus ein enormes Kostenrisiko für die Gesellschaft. Eine Studie von Lengerke und John aus dem Jahr 2005 beziffert einen Verlust von 530 Millionen Euro pro Jahr für die deutsche Wirtschaft, der alleine durch Adipositas entsteht [86]. Nicht zuletzt ist dieser finanzielle Aspekt der Adipositas eines der Hauptmotive für die Erforschung der Adipositasursachen und potentieller präventiver Maßnahmen.

1.1.4 Risikofaktoren für eine Adipositasentwicklung

Unabhängig von zugrunde liegenden Erkrankungen fördert ein Lebensstil, der mit einer gesteigerten Kalorienzufuhr bei gleichzeitig verminderter körperlicher Betätigung einhergeht, die Entwicklung von Übergewicht und Adipositas [61]. Ein niedriger sozialer Status (gemessen am Einkommen und an der Schulbildung der Eltern) kann ebenfalls einen Risikofaktor für die Entwicklung von Adipositas im Kindesalter darstellen [47, 51]. Besonders unter den Kindern deutscher Herkunft zeigt sich, dass Kinder aus der unteren sozialen Schicht prozentual häufiger übergewichtig sind als Kinder aus einer höheren sozialen Schicht [64]. Böhm konnte in Studien an Kindern aus Brandenburg eine negativ signifikante Korrelation zwischen dem Sozialstatus der Eltern und der Adipositasprävalenz der Kinder nachweisen [13]. Dieser Unterschied ist unter den Kindern nicht deutscher Herkunft nicht so stark entwickelt [64].

Kinder adipöser Eltern zeigen eine höhere Adipositasprävalenz als Kinder schlanker Eltern [47]. Zahlreiche Arbeiten haben darüber hinaus die entscheidende Rolle des kulturellen Umfelds bei der Entstehung von Übergewicht und Adipositas herausgearbeitet. Der Anteil übergewichtiger Kinder nicht deutscher Herkunft ist fast doppelt so hoch wie der Kinder deutscher Herkunft [64, 70]. Dabei spielen nicht nur die kulinarischen Besonderheiten verschiedener Kulturkreise eine Rolle [61], sondern auch die ethnische Zugehörigkeit [50].

Die Tatsachen, dass sowohl adipöse Eltern als auch eine bestimmte ethnische Zugehörigkeit Risikofaktoren für eine Adipositasentwicklung darstellen [11], deuten bereits auf den Einfluss der Genetik auf die Gewichtsregulation und auf die Prädisposition, Adipositas zu entwickeln, hin. Studien an Zwillingen haben gezeigt, dass es für das Körpergewicht ge-

netische Prädispositionen gibt, die zu einer Erbllichkeit des Körpergewichtes von 50% bis 90% führen [81, 11].

Um die Auswirkungen genetischer Ursachen auf die Adipositasentwicklung zu veranschaulichen, wird im Folgenden zunächst die physiologische Gewichtsregulation erläutert und anschließend vertieft auf die Genetik der Adipositas eingegangen.

1.2 Energiehomeostase und Gewichtsregulation

1.2.1 Der Leptin - Melanocortin - Regelkreis

Die Gewichtsregulation erfolgt über einen hormonellen Regelkreis, der sich durch einen Regler im Nucleus arcuatus des Hypothalamus im Zentralen Nervensystem und durch Stellglieder in Zellen der Peripherie auszeichnet. Die Hormone entsprechen den Stellgrößen dieses Systems [53].

Die Adipozyten des subkutanen Fettgewebes sezernieren proportional zur Fettmasse das Hormon Leptin. Leptin, abgeleitet von dem griechischen Wort λεπτος - dünn -, induziert einerseits eine verringerte Nahrungsaufnahme und andererseits einen gesteigerten Energieverbrauch. Leptin bindet an seinen Rezeptor, der an zwei unterschiedlichen Neurotypen im Nucleus arcuatus des Hypothalamus exprimiert ist [16]. Einerseits bindet es an Rezeptoren der anorexigenen Proopiomelanocortin (POMC) exprimierenden Neuronen und andererseits an Rezeptoren der orexigenen Agouti-related peptide (AgRP) und Neuropeptide Y (NPY) exprimierenden Neuronen. Die Bindung Leptins an seinen Rezeptor führt in den POMC-Neuronen zur Steigerung der Expression des POMC-Gens. Ein Prozessierungsprodukt des POMCs ist das α - melanozytenstimulierende Hormon (α - MSH). α - MSH wird axonal in den Nucleus paraventricularis transportiert und bindet dort an dem Melanocortin - 4 - Rezeptor (MC4R) eines übergeordneten Neurons. Dieses wird durch α - MSH aktiviert und eine anorexigene Antwort mit verringerter Nahrungsaufnahme und Sättigungsgefühl wird eingeleitet [18].

In den AgRP- / NPY - Neuronen führt die Bindung Leptins am Leptinrezeptor hingegen zu einer Verringerung der Expressionsrate der beiden Gene. Da AgRP- und NPY-Neurone

orexigene und antagonistische Agonisten des MC4Rs sind, führt eine Inhibition dieser Neurone durch Leptin zu einem Wegfall der hemmenden Wirkung auf den MC4R.

Ein Anstieg Leptins durch eine erhöhte Fettmasse führt somit einerseits über die Steigerung der anorexigenen Wirkung POMCs und andererseits über eine Hemmung der orexigenen Wirkung der AgRP- und NPY-Neurone über zweierlei Wege zu einer anorexigenen Stoffwechsellaage. Im Falle einer Nahrungskarenz sinkt die Leptinkonzentration ab und die orexigene Wirkung der NPY- und der AgRP-Neurone überwiegt: Die Nahrungsaufnahme wird gefördert und der Energieverbrauch reduziert [43].

Im krankhaften Fall der Adipositas greift die regulatorische Wirkung dieses Regelkreises nicht mehr. Aufgrund der hohen Fettmassen liegt zwar ein sehr hoher Leptinspiegel vor, dieser kann aber seine Wirkung nicht mehr entfalten, da die Patienten eine Leptinresistenz entwickeln [23].

Die Abbildung 1.2 der Arbeitsgruppe Barsh & Schwartz (2002, Nature) veranschaulicht den vereinfachten Regelkreis.

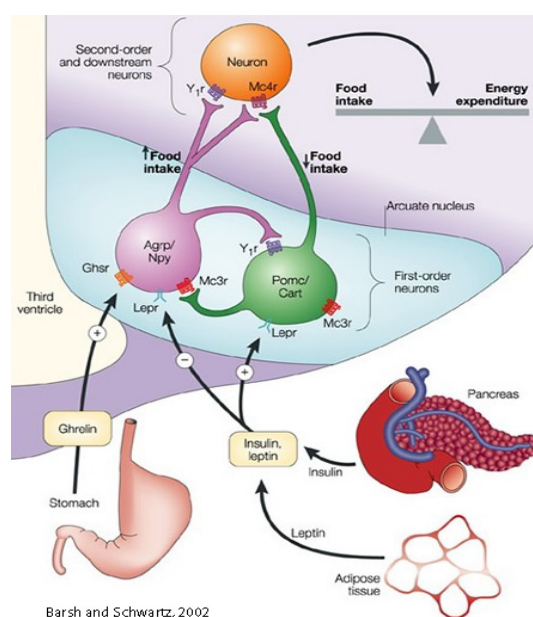


Abbildung 1.2: Der Leptin-Melanocortin-Weg: Leptin wird in den Adipozyten der Peripherie sezerniert und gelangt über das Blut in den Nucleus arcuatus des Hypothalamus, wo es an den Proopiomelanocortin (POMC)-Neuronen bindet und deren POMC-Expression steigert. Das Spaltprodukt des POMCs, α -melanocortin-stimulating-hormone (α -MSH), bindet am Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) und induziert eine anorexigene Wirkung. An den Agouti-related peptide (AgRP)- und Neuron peptide Y (NPY)-Neuronen führt die Bindung Leptins zu einer Verringerung der Expressionsrate dieser beiden Peptide. Die hemmende, orexigene Wirkung dieser beiden Hormone auf den MC4R fällt dadurch weg. Die Hormone Ghrelin und Insulin greifen modulierend in diesen Regelkreis ein. Die Abbildung wurde von Barsh & Schwartz (2002, Nature) veröffentlicht.

In diesen beschriebenen Signalweg reihen sich zahlreiche weitere Hormone ein, die ebenfalls Stellgrößen der Gewichtskontrolle sind und je nach Funktion orexigene oder anorexigene Auswirkungen haben.

Darüber hinaus beeinflusst die genetische Prägung diesen Regelkreis und kann zur Entstehung von Adipositas beitragen.

1.3 Genetik der Adipositas

Das Augenmerk der Forschung der Adipositasgenetik liegt auf der Identifizierung von Kandidatengenen, die für diesen hohen Grad an Erbllichkeit verantwortlich sind. Unterschieden werden monogenetische und polygenetische Effekte, die in unterschiedlichem Ausmaß zur Entwicklung einer Adipositas beitragen.

1.3.1 Monogenetische Ursachen für Adipositas

Mutationen

Mutationen stellen Basenaustausche im kodierenden Bereich der DNA dar, die zur Synthese einer synonymen oder nicht synonymen Aminosäure führen. Durch den Basenaustausch kann es zu sogenannten gain-of-function Mutationen oder aber auch zu loss-of-function Mutationen kommen. Im ersten Fall verbessert die Mutation die Funktionsfähigkeit des Genproduktes, im zweiten Fall wird sie reduziert. Im Falle einer Stopp-Mutation wird das vollständige Ablesen des Gens vorzeitig beendet. Mutationen kommen sehr selten vor, jedoch führen sie meistens zur Entwicklung eines ausgeprägten Phänotypen. Führt bereits eine Mutation zur Ausbildung des Phänotypen, wird die Mutation als monogenetisch bezeichnet, da ein verändertes Gen ausreicht, um die Erkrankung zu generieren.

Adipositasrelevante monogenetische Mutationen

Die ersten adipositasrelevanten Kandidatengene wurden durch monogenetische Mutationen gefunden, die mit einem adipösen Phänotypen korrelieren. Dazu zählen Mutationen im Leptingen und seinem Rezeptor [63, 16], im POMC-Gen [49] und im MC4R [92, 56]. Die Mutationen führen zu einer Störung des Leptin- Melanocortin- Regelkreises [24].

Der Anteil der adipösen Patienten, die Träger einer adipositasrelevanten monogenetischen Mutation sind, ist allerdings im Vergleich zur hohen Anzahl adipöser Patienten sehr gering [66]. Man geht daher von einer polygenetischen Ätiologie der Adipositas aus [82, 25]. Das bedeutet, dass Veränderungen vieler einzelner Genloci zur Expression des adipösen Phänotypen beitragen.

Seit einigen Jahren konzentriert sich die Forschung im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien daher zunehmend auf die Erforschung polygener Veränderungen, die im Zusammenhang mit Adipositas stehen.

1.3.2 Polygenetische Ursachen für Adipositas

Single Nukleotid Polymorphismen

Das menschliche Genom ist zu 99% bei allen Menschen gleich. Die übrigen ein Prozent entstehen neben Variabel Number Tandem Repeats (VNTR) und Short Tandem Repeats (STR) durch Single Nukleotid Polymorphismen - SNPs -, die eine Formvariante der DNA darstellen und die die Grundlage der interindividuellen Unterschiede bilden [35]. Ein SNP entspricht einem Basenaustausch, der mit einer Mindesthäufigkeit von 1% bei Menschen vorkommt [39]. Diese Häufigkeit wird als minimale Allelfrequenz MAF definiert und ermöglicht die Unterscheidung zwischen einer Mutation und einem SNP. Insgesamt gibt es etwa 10 Millionen Polymorphismen im menschlichen Genom, sie kommen etwa alle 1000 Basenpaare vor [29]. SNPs liegen sowohl im kodierenden als auch im nicht kodierenden Bereich. Letzteres ist jedoch wesentlich häufiger. Die verschiedenen Ausprägungen, die ein Gen somit durch die verschiedenen SNP-Formen annehmen kann, bezeichnet man als Allele. Bis heute sind die pathophysiologischen Auswirkungen der meisten SNPs nicht bekannt. Tragen mehrere SNPs zur Ausprägung eines Phänotyps bei, werden diese Erkrankungen als polygenetisch bezeichnet.

Assoziationsstudien

Assoziationsstudien untersuchen an nicht verwandten Probanden das gleichzeitige Auftreten bestimmter SNPs und einer Erkrankung. Im Fokus dieser Studien stehen die verschiedenen Allele, die die verschiedenen Ausprägungsformen eines Genes darstellen.

Der Begriff Genotyp beschreibt die Paarung, in der Allele bei einer Person im diploiden Chromosomensatz vorkommen. Der Genotyp eines Einzellokus' mit den beiden Allelen A und a unterteilt sich auf die Formen homozygot AA, homozygot aa oder heterozygot Aa. Von dem Genotypen können nur im homozygoten Zustand Rückschlüsse auf den Haplotypen gezogen werden. Dieser beschreibt die Kombination, in der SNPs auf einem Chromosom vorliegen [9]. Die Abbildung 1.3 veranschaulicht die beiden Begriffe.

Liegt eine Anzahl n von SNPs vor, so können im diploiden Chromosomensatz durch reine

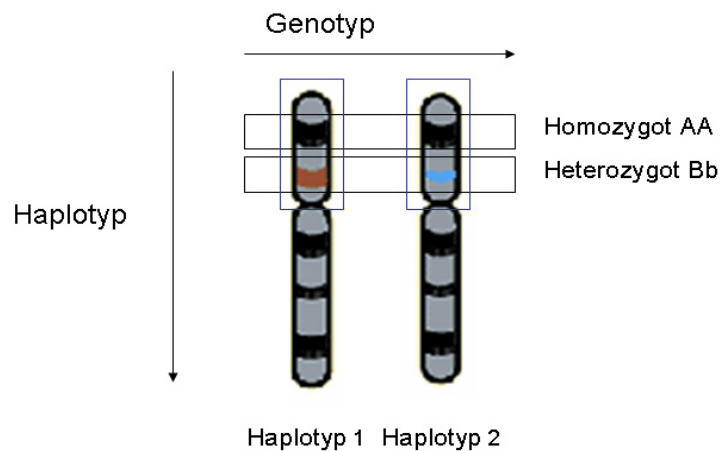


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Begriffe Genotyp und Haplotyp. Die farblichen Bänder stellen die Allele dar. Eine gleiche Farbe bedeutet, dass auf beiden Chromosomen das gleiche Allel vorkommt. Die Allelkombination an einem Genlocus auf beiden Chromosomen bezeichnet den Genotypen, die Allelkombinationen entlang eines Chromosoms an verschiedenen Genloci beschreibt den Haplotypen.

Kombinatorik 2^n Haplotypen entstehen. Tatsächlich findet man in der Natur wesentlich weniger Haplotypen als zu erwarten wäre. Diese Tatsache ist durch das Kopplungsgleichgewicht oder auch Linkage Disequilibrium (LD) bedingt. LD beschreibt die statistische Assoziation von DNA-Variationen an unterschiedlichen Positionen entlang eines Chromosoms. Je näher zwei Loci auf dem Genom beieinander liegen, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht durch Rekombination getrennt werden und somit weiter zusammen vererbt werden [8].

Für die Forschung sind Haplotypen aus zweierlei Gründen interessant: die *common disease common genetic variant* (CDCV) - Hypothese geht davon aus, dass häufig auftretende SNPs eine Rolle bei der Entwicklung von häufig auftretenden Krankheiten spielen [88]. Des Weiteren kann ein mit einer Erkrankung assoziierter Haplotyp auf eine noch unbekanntes ursächliche Mutation hinweisen, die sich in dem Haplotypen befindet. Assoziationsstudien tragen somit zur Identifizierung neuer Kandidatengene bei.

Die Herkunft des Probenkollektives, welches im Rahmen einer Assoziationsstudie untersucht wird, kann eine entscheidende Rolle für die Frequenzverteilung der Allele spielen. Untersucht man Haplotypen, muss man Unterschiede in der ethnischen Herkunft der Probanden beachten, da diese mit verschiedenen SNP-Frequenzen und somit anderen Haploty-

pen einhergehen können [11]. 95% der Haplotypen kommen eher innerhalb einer Population vor als zwischen den Populationen [88]. In der HapMap, einer Datenbank für genomweite SNPs, wird diesem Unterschied durch das Bilden von vier verschiedenen Populationen Rechnung getragen: Menschen chinesischer, japanischer, europäischer (CEPH) und afrikanischer Herkunft [40]. Es gilt, eine vermeintliche Assoziation zu vermeiden, die nur durch ethnische Hintergründe bedingt ist. Auch Inzucht kann zur Verschiebung der erwarteten SNP- und Haplotypfrequenzen führen, welche durch Abweichungen des Hardy-Weinberg Gesetzes sichtbar wird [88, 9]. Dieses Problem stellt sich besonders bei Patienten mit türkischer oder arabischer Herkunft, bei denen konsanguine Ehen kulturell bedingt häufiger vorkommen [83, 2].

Adipositasassoziierte SNPs

Im Rahmen verschiedener genomweiter Assoziationsstudien (GWA) wurden bereits einige SNPs gefunden, die mit Adipositas assoziiert sind. Im FTO-Gen [21, 78], im INSIG-2 Gen [58, 31] und im APOA5 Gen [30] wurden unter anderen bereits Variationen identifiziert, die auf eine Assoziation mit Adipositas hinweisen.

Allerdings ist es vielfach schwierig, die Auswirkung eines SNPs auf die Gewichtsentwicklung genau zu beziffern, da es sich bei Adipositas um eine komplexe Erkrankung handelt, die nicht monogenetisch reguliert wird [82]. Darüber hinaus besteht eine erhebliche Schwierigkeit, Ergebnisse von Assoziationsstudien zu reproduzieren: So wurden in verschiedenen Assoziationsstudien zu Adipositas und dem INSIG-2 SNP rs7566605 sowohl positive als auch negative Assoziationen gefunden [58]. Die Gründe dafür können unter anderen zu geringe Power der Analysen, fehlerhafte Genotypisierungen oder aber populationsbedingte Bias sein [52]. Erst große Metaanalysen werden die nötigen Fallzahlen hervorbringen, um die mitunter minimalen Einflüsse von Polymorphismen herauskristallisieren zu können [11]. Auch die vorliegende Arbeit dient der Überprüfung einer bereits gefundenen Assoziation eines SNPs mit Adipositas: Eine 2009 durchgeführte Assoziationsstudie konnte den SNP rs2302382 des Glukose-abhängigen insulinotropischen Peptid Rezeptors (GIPR) identifizieren, der mit Adipositas im Erwachsenenalter assoziiert ist.

1.4 Der GIP-Rezeptor und sein Ligand

1.4.1 Das Inkretin GIP

Das Glukose-abhängige insulintropische Polypeptid, ursprünglich Gastric Inhibitory Peptide (GIP) genannt, zählt mit dem verwandten Glucagon like Peptide I zu den wichtigsten Inkretinen des menschlichen Körpers. Das Hormon wird nach oraler Glukose- oder Fettaufnahme in den K-Zellen des Duodenums und des proximalen Jejunums synthetisiert und ausgeschüttet. Es besteht aus 42 Aminosäuren und hat mit einer Homologie von bis zu 90% eine starke Konservierung beibehalten.

In der Ernährung von Menschen industrialisierter Länder, in denen der Fettanteil der Nahrung bei rund 40% liegt, spielt die Lipidaufnahme eine größere Rolle bei der Stimulation der GIP-Ausschüttung als die Kohlenhydrataufnahme. GIP wird als Inkretin ausschließlich nach oraler Glukose oder Lipidzufuhr ausgeschüttet, nicht jedoch nach venöser Glukoseinfusion, da in diesem Fall die Stimulation der K-Zellen des Duodenums und des proximalen Jejunums fehlt. Zudem ist die Stimulation von GIP abhängig von der Menge der aufgenommenen Nahrung. Die GIP-Ausschüttung trägt zu 72% zu der postprandialen Insulinausschüttung bei [14]. Männer haben leicht höhere GIP-Konzentrationen als Frauen [93].

1.4.2 Der GIP-Rezeptor

Aufbau des Proteins

Der GIP-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), der zur Familie der Vasoaktiven Intestinalen Polypeptid (VIP) -Rezeptoren und der Bradykinin Rezeptor 1 (B1) GPCR gehört. Er weist den charakteristischen Aufbau eines GPCR mit sieben α -helikalen Transmembranmännern, drei intrazellulären und drei extrazellulären Schleifen, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus auf. Die Peptidbindungsstelle befindet sich am extrazellulären N-Terminus, der durch seine Länge und die 6 konservierten Cysteinen gekennzeichnet ist [59].

Das GIPR-Gen

Auf Chromosom 19q13.2-13.3 gelegen, besteht das GIPR-Gen aus 466 Aminosäuren auf 14 Exons. Es wurden verschiedene Isoformen des GIPR-Gens gefunden, jedoch nur die Form mit 466 Aminosäuren und eine mit einer 27 Aminosäuren Insertion sind funktionsfähig [5]. Die Promotorregion wurde in Ratten charakterisiert, sie besteht aus einer CG-reichen Region, die jedoch weder eine TATA-Box noch ein CAAT-Motiv aufweist. Hingegen befinden sich in der Region drei SP1-Bindungsstellen, die zur Gruppe der MIG1- Zinkfingerproteinen gehören [14].

1.4.3 Physiologie des GIP-GIPR-Signalweges

Der GIPR wird an der Oberfläche der β -Zellen des Pankreas, der Adipozyten und Osteoblasten exprimiert. Er befindet sich darüber hinaus an Zellen des Herzens, der Nebennierenrinden und des ZNS' [62]. Die weitläufige Verteilung des GIPRs deutet auf verschiedene Funktionen des GIP-GIPR-Signalweges hin. So weist der ursprüngliche Name des Proteins, gastric inhibitory polypeptide, bereits auf seine hemmende Wirkung auf die Funduszellen im Magen bei der Produktion der Magensäure hin [93].

Die Bindung von GIP am GIP-Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und somit zu einer Erhöhung des intrazellulären Adenosin 3',5'-Monophosphat (cAMP) - Spiegels. Es schließt sich der Ca^{2+} -Einstrom über die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle an, der in der β -Zelle mit der Exozytose der Insulin- und C-Peptid - gefüllten Vesikel endet. Eine Glukose-abhängige Insulinausschüttung findet statt. Neue Studien deuten darauf hin, dass GIP die β -Zelle über einen weiteren intrazellulären Regelkreis, über Aktivierung der MAP-Kinase, die Insulinausschüttung stimulieren kann [27]. Die Abbildung 1.4 veranschaulicht den Signalweg.

GIP führt nicht nur zu einer vermehrten Insulinsynthese, sondern verstärkt auch die Wirkung von Insulin in den Zielgeweben. In Muskelzellen stimuliert GIP den Glukoseverbrauch [77]. Die Bindung von GIP am GIPR der Adipozyten stimuliert die Lipoproteinlipase und

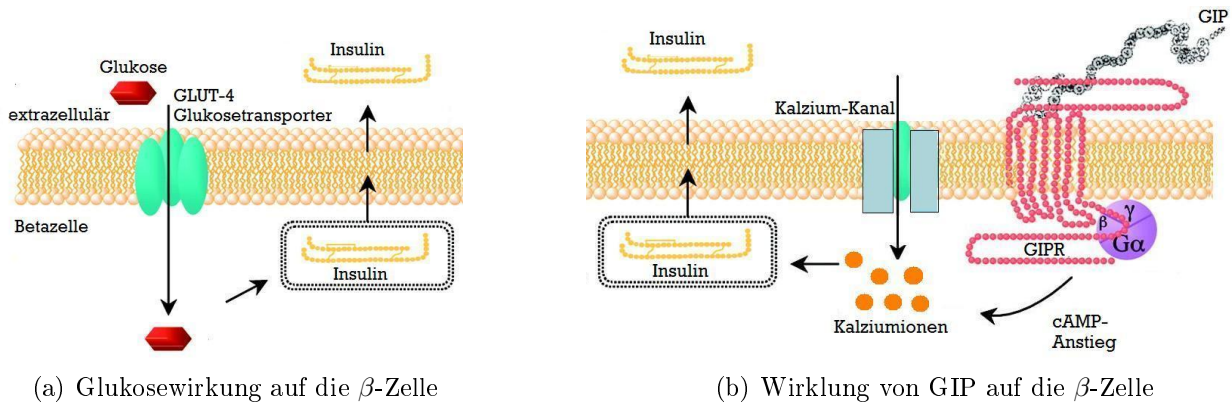


Abbildung 1.4: Der GIP-GIPR-Signalweg (stark vereinfachte Darstellung): Abbildung a: Glukose bindet am GLUT-2 Rezeptor der β -Zelle und induziert eine Insulinausschüttung. Abbildung b: Der Ligand GIP bindet an dem GIP-Rezeptor der β -Zelle, dies führt zu einem Anstieg der zyklichen Adenylatzyklase mit anschließendem Ca^{2+} -Einstrom. Dieser verstärkt in Anwesenheit von Glukose die Exozytose der Insulin- und C-Peptid - gefüllten Vesikel. Die Abbildung wurde von der Abbildung der Arbeit von Lynn und Mitarbeitern [57] modifiziert.

somit die Umwandlung von freien Fettsäuren zu Triglyzeriden und stellt so über die Fettsynthese ein Glied in der Entstehung von Adipositas dar [27, 77, 62].

1.4.4 Das GIPR-Gen: ein Adipositas-Kandidatengen

Eine Studie von Miyawaki und Mitarbeitern untermauert anhand einer GIPR knockout Maus (*Gipr*^{-/-}) die Rolle des GIPR bei der Entwicklung der Adipositas. Im Vergleich zu einer Wildtyp - Maus setzt eine *Gipr*^{-/-} Maus bei einer hochkalorischen Fütterung über 43 Wochen 2,3-mal weniger Fett an [62]. Auch die doppelknockout Mäuse *GIPR*^{-/-}, *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} sind gegenüber einer diätinduzierten Adipositas resistent [62]. Eine Unterbrechung des GIP-Signalweges kann demnach die Entstehung von Adipositas verhindern. Miyawaki und Mitarbeiter haben ebenfalls die *Gipr*^{-/-} Mäuse nach einer high-fat Diät auf eine Insulinresistenz hin untersucht [62], von der bekannt ist, dass sie als Folge der Adipositas auftreten kann [45]. Dabei wurde festgestellt, dass die Mäuse, bei denen der GIP-Signalweg durch die genetische Veränderung behindert war, eine geringere Insulinresistenz aufweisen als die Kontrollgruppe. Darüber hinaus weisen Mäuse, die nach einer diätinduzierten Adipositas einen GIP-Antagonisten erhalten, im Vergleich zu ebenfalls adipösen Mäusen, die eine Kochsalzlösung erhalten, einen Gewichtsabfall mit einhergehender Verringerung des

Cholesterinspiegels, des Triglyzeridspiegels und einer verbesserten Insulinsensitivität auf [60]. Es sind bereits erste Erfolge beschrieben worden, Mäuse gegen den GIP-Rezeptor zu impfen und so einen präventiven Schutz vor Fettleibigkeit zu erzielen [26]. Des Weiteren gibt es Ansätze, das Inkretins GIP in der Diabetes mellitus Typ II Therapie einzusetzen [42]. Somit ist der GIPR durch seinen Einfluss auf den Insulinstoffwechsel und auf die Adipozyten ein geeigneter Kandidat, um eine Rolle bei der Adipositasentwicklung und der Entstehung einer Insulinresistenz zu spielen [85, 62, 33, 77].

Eine Studie von Vogel und Mitarbeitern untersucht drei Single Nukleotid Polymorphismen im GIPR auf eine Assoziation mit Adipositas im Erwachsenen- und Kindesalter [85]. Es handelt sich dabei um die drei SNPs rs8111428, rs2302382 und rs1800437.

Der SNP rs2302382 führt zu einer BMI-Erhöhung um 0,12 Einheiten in der KORA Studie und zu einem BMI-Abfall um 0,27 Einheiten in der SHIP Studie [85]. Somit liegen widersprüchliche Daten zum Einfluss dieses SNPs auf Adipositas vor. Allerdings konnten Vogel und Mitarbeiter erstmals zeigen, dass die beiden SNPs rs8111428 und rs2302382 möglicherweise auf einem gemeinsamen Haplotypen liegen. Diese beiden SNPs werden in der minor-allele Variante häufiger an übergewichtige Nachfahren vererbt [85]. Für den SNP rs1800437 liegt ein Hinweis darauf vor, dass das G-Allel häufiger an übergewichtige Kinder vererbt wird.

Der SNP rs8111428 liegt in der Promotor Region des GIPR-Gen (Genbank Nummer: NM_000164 NCBI) auf Chromosom 19, 3401 Bp 5' vor dem ersten Exon. Alternierend zum Wildtyp Allel Guanin ist die Base Adenin vorhanden (-3401 G>A). Bis jetzt liegen keine Daten zur funktionellen Relevanz dieses SNPs vor. Studien haben nachgewiesen, dass 100 Bp 5' vor dem Exon 1 des GIPR-Gen zwei Sp1 Bindungsstellen und eine MZF1/Sp1 Bindungsstelle liegen, die, wenn sie durch Mutationen verändert sind, zu einer 88% Reduktion der Aktivität des Rezeptors führen [14]. Der SNP rs8111428 könnte einen weiteren regulatorischen Einfluss auf die Promotorregion haben und zu einer verminderten oder gesteigerten Expression des Gens führen.

Der SNP rs2302382 befindet sich 1024 Basenpaare nach Beginn des Exons 1 im Intron des

GIPR-Gen auf Chromosom 19. Es erfolgt ein Basenaustausch von Cytosin nach Adenin (+1024 C>A).

Der SNP rs1800437 liegt im Exon 12, 7945 Basenpaare nach Beginn des Exons 1. Das Wildtypallel ist Guanin, welches durch Cytosin ersetzt werden kann (Glu354Gln). Der Basenaustausch führt zu einem nicht synonymen Aminosäureeinbau: Die Wildtyp-Sequenz wird in Glutamat übersetzt, der Einbau Cytosins hingegen führt zur Aminosäure Glutamin. Die funktionelle Relevanz dieses Basenaustauschs ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erforscht. Im Zusammenhang mit den bisher veröffentlichten Daten, dass eine Unterbrechung des GIP-GIPR-Signalweges durch Veränderungen am GIPR zu einer Resistenz gegenüber Adipositas führt, kann gemutmaßt werden, dass diese drei mit Adipositas assoziierten SNPs des GIPR zu einer funktionellen Verbesserung der Aktivität des Rezeptors führen.

Die Abbildung 1.5 stellt die Position der drei SNPs im Verhältnis zum GIPR-Gen dar.

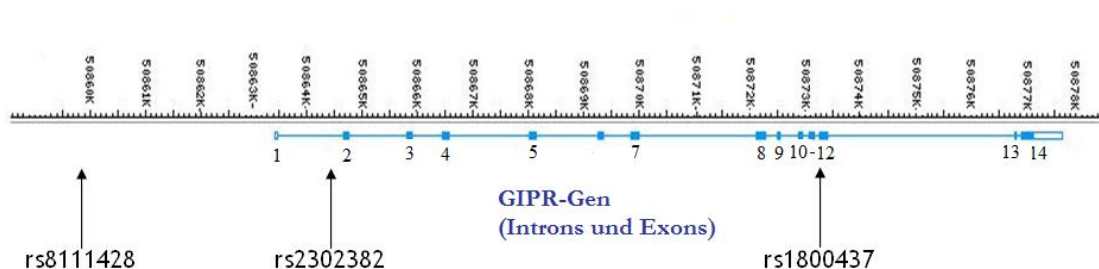


Abbildung 1.5: Position der SNPs in Bezug zum GIPR-Gen: In Blau ist das GIPR-Gen schematisch mit seinen 14 Exons als Kästchen und den Introns als Striche dargestellt. Die Pfeile deuten auf die Lokalisation der drei SNPs hin. In Schwarz ist die Skala der Basenpaare dargestellt.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Assoziation zwischen Adipositas im Kindesalter gemessen an der BMI-Standardabweichung ab der 97. Perzentile und den drei SNPs rs8111428, rs2302382 und rs1800437 des GIPR-Gens. Des Weiteren soll eine Assoziation zwischen den drei SNPs und den Parametern Geschlecht, ethnische Herkunft und Homeostase Assessment Model für eine Insulinresistenz oberhalb der 95. Perzentile überprüft werden. Abschließend soll untersucht werden, inwiefern eine Assoziation zwischen den genannten Parametern und den in dieser Studie erhobenen Haplotypen besteht.

Es werden die Genotypen der drei SNPs von 2280 Kindern aus dem Raum Berlin untersucht: 657 Kinder kommen aus der Adipositas-Sprechstunde des Otto Heubner Centrums der Charité, die übrigen 1623 sind gesunde Kinder, die die Kontrollgruppe bilden.

Die Nullhypothese dieser Arbeit lautet:

- H_0 : Es gibt keinen Unterschied der Allelverteilungen für die drei untersuchten Single Nukleotid Polymorphismen bei adipösen und bei normalgewichtigen Kindern.

Die Arbeitshypothese dieser Arbeit lautet:

- H_1 : Die Allelverteilungen divergieren innerhalb der drei SNPs zwischen den adipösen und den normalgewichtigen Kindern.

Die Arbeitshypothese ist zweiseitig dargestellt, da das assoziierte Allel nicht bekannt ist.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Cap Strips (8er-Streifen)	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
GeneAmp 9600 thermal cycler	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneFLASH	SYNGENE BIO IMAGING, Cambridge
Genetic Analyzer 3130xl	Applied Biosystems, Darmstadt
Genesis RSP 150, Pipettierroboter	Tecan, Steinfurt
Labor-Zentrifuge Sorvall RC-6 Plus	Thermo Electron Corporation, Osterode
Laboratory Medical Centrifuge LMC-3000	FaG. Kisker, Steinfurt
Maldi TOF autoflex Daltonics	Bruckner, Sequenom, Hamburg
Mass Array Nanodispenser	Sequenom (Samsung), Hamburg
Mastercycler ep gradient	Eppendorf, Hamburg
Maxwell 16 Instrument	Promega, Mannheim
Netzteil	Biometra, Göttingen
PCR-Film	Eppendorf, Hamburg

Pipetierroboter Multimek 96	Beckmann, Unterschleißheim
Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems TM	Sequenom, Hamburg
Spectrophotometer	Eppendorf, Hamburg
Te-MO (Pipettierroboter)	Tecan, Crailsheim
Tetrad Multi Cycler-Block	MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Thermocycler mit Control Panel	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Titramax 100 (Plattenschüttler)	Heidolph, Kelheim
Transilluminator	PeqLab, Erlangen
Twin.tec PCR Plate 96, skirted	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2 TM	Bender & Holbein AG, Schweiz, Zürich

2.1.2 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Aqua	Merck KgAG, Darmstadt
Borsäure (61,83 g/mol)	Neolab, Heidelberg
Bubblegum Cherry <i>HUBBA BUBBA</i>	Wrigley, Köln
Desoxyribonukleotide (dNTPs) 10 nM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Größenleiter 1 kB DNA-Ladder	Promega, Mannheim
Ethanol (70% und 100%)	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	molecular SIGMA biology, Deisenhofen
FastRuler DNA-Ladder Ultra Low Range	Fermentas, St. Leon-Rot
Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneScan-120 LIZ	Applied Biosystems, Darmstadt
Ionenaustauscherharz	SpectroClean TM , Sequenom, Hamburg
Loading Dye 6x Orange	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid 25/ 50 mM	Bioline, Luckenwalde
puc Mix 8 (DNA-Ladder)	Fermentas, St. Leon-Rot
Tris	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

Exonuclease I (20.000 U/mL)	NEB BioLabs, Frankfurt a. M.
HotStar Taq Polymerase (5U/ μ l)	Qiagen, Hilden
Mango Taq Polymerase (1U/ μ l)	Bioline, Luckenwalde
Protease 7,5 AU	Qiagen, Hilden
Shrimp Alkaline Phosphatase (1.000 U/ μ l)	NEB BioLabs, Frankfurt a. M.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Elution Buffer	Promega, Mannheim
NEBuffer for Exo I (10x)	NEB BioLabs, Frankfurt a. M.
NH ₄ PCR-Puffer für Mango Taq (10x)	Bioline, Luckenwalde
PCR-Puffer für HotStar Taq (10x)	Qiagen, Hilden
Protease Puffer	Qiagen, Hilden
TBE	0,89 M Tris, 0,89 M H ₂ BO ₃ , EDTA 0,02 M, pH 8,0

2.1.5 Kits

SNaPshot Multiplex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit	Promega, Mannheim

2.1.6 Primer

Die Primer für das SNaPshot Verfahren wurden von der Firma TIB Molbiol Syntheselabor aus Berlin bezogen. Die Primer für das i-plex Verfahren wurden bei der Firma Metabion aus Martinsried bestellt. Die Konzentration der Stocklösungen beträgt jeweils 50 μ M, sie werden bei -20°C gelagert. Aliquots für den täglichen Gebrauch liegen in einer Konzentration von 25 μ M vor und werden bei 4°C gelagert.

PCR-Primer für das SNaPshot Verfahren

Die Tabelle 2.1 listet die PCR-Primer des SNaPshot Verfahrens auf.

In der linken Spalte sind die Namen der Primer aufgeführt: -F bezeichnet den Vorwärtsprimer (forward; 5' - 3') und -R den Rückwärtsprimer (3' - 5'). In der mittleren Spalte sind die Sequenzen der jeweiligen Primer in 5' - 3' Richtung aufgeführt. Die rechte Spalte beziffert die Länge der jeweiligen Primersequenz. Die Primer wurden mit dem Programm *Primer 3* anhand der FASTA-Sequenz des GIPR aus NCBI (www.ncbi.com) ermittelt.

Tabelle 2.1: PCR-Primer für das SNaPshot Verfahren

Name	Sequenz	Länge
rs8111428-F	5' gcacagctatgggacagtga 3'	20-mer
rs8111428-R	5' caccgtcacacactcacaca 3'	19-mer
rs2302382G-F	5' ctgcccacaacaacagtcag 3'	20-mer
rs2302382G-R	5' agcacctctgccctcctact 3'	19-mer
rs1800437-F	5' attacggctgaggtgagg 3'	19-mer
rs1800437-R	5' tggaaggagctgaggaagat 3'	20-mer

PCR-Primer für das i-plex Verfahren

Die Tabelle 2.2 führt die PCR-Primer für das i-plex Verfahrens auf.

Jeder dieser Primer ist durch die Sequenzabfolge ACGTTGGATG in 5' Richtung verlängert. Diese homologe Massenextension (hME) gewährleistet, dass einerseits die entstehenden PCR-Produkte eine Mindestmasse haben, die für die spätere Analyse per Massenspektrometrie erforderlich ist, und andererseits, dass überschüssige Primer aufgrund ihrer Masse außerhalb der üblichen Analysepeaks liegen, sodass sie als Artefakte keine Rolle bei der Auswertung spielen. Die rechte Spalte beziffert die Länge der jeweiligen Primersequenz. Die Primer wurden für das Multiplex Verfahren von Sequenom berechnet.

Tabelle 2.2: PCR-Primer für das i-plex Verfahren

Name	Sequenz	Länge
rs8111428-F MALDI	5' ACGTTGGATGtatgggacagtgaggtgtg 3'	20-mer
rs8111428-R MALDI	5' ACGTTGGATGctcacactctcccttagtc 3'	19-mer
rs2302382-F MALDI	5' ACGTTGGATGagttccaccactccgcgt 3'	20-mer
rs2302382-R MALDI	5' ACGTTGGATGtatacacgaggactccga 3'	19-mer
rs1800437-F MALDI	5' ACGTTGGATgatcactgctgccccctct 3'	19-mer
rs1800437-R MALDI	5' ACGTTGGATgctctgtcacggagcaaaca 3'	20-mer

2.2 Methoden

Die Arbeitsschritte, die in dieser Arbeit beschriftet werden, sind im folgenden Flussdiagramm dargestellt. In Anlehnung an dieses Diagramm werden im Folgenden die einzelnen Methoden besprochen.

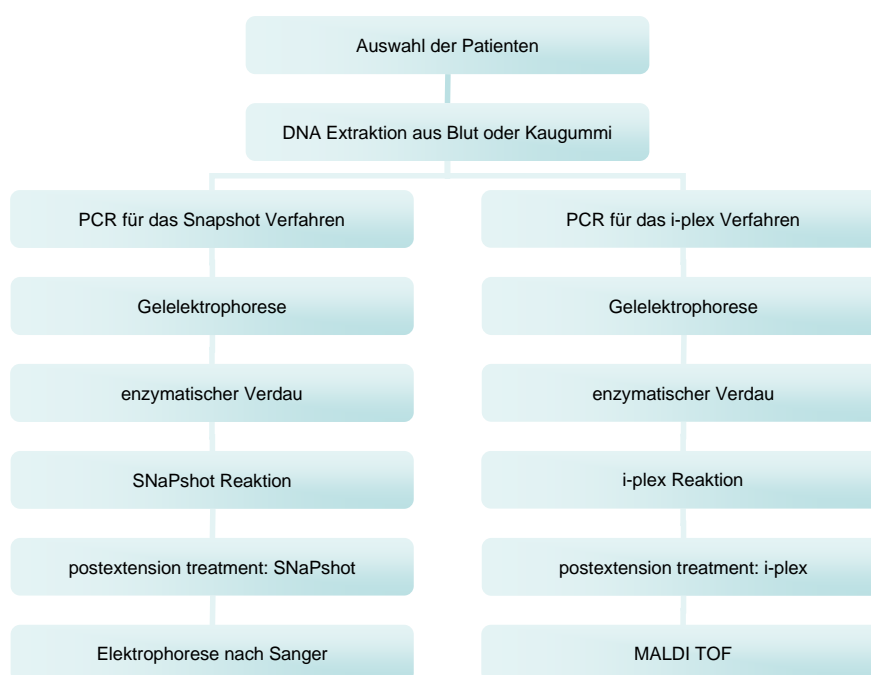


Abbildung 2.1: Flussdiagramm: schematische Darstellung der Methoden-Schritte

2.2.1 Studienpopulation und klinische Daten

Studienpopulation

Die Studie setzt sich einerseits aus Daten von 657 (301 männlich, 356 weiblich) Patienten des Otto Heubner Zentrums der pädiatrischen Poliklinik der Berliner Charité und andererseits aus 1623 Mädchen aus Berliner Schulen, die im Rahmen der PIONEER Studien erfasst wurden und ebenfalls in der Arbeit von Bau und Mitarbeitern charakterisiert wurden, zusammen [12]. Alle Kinder sind zwischen 2,5 und 18 Jahren alt. Innerhalb der ersten Gruppe befinden sich 35 Geschwisterkinder, jedoch keine Zwillinge. Es liegen keine Informationen über den Grad der Verwandtschaft der Kinder der zweiten Gruppe vor, da diese anonym erhoben wurden.

Kinder, die endokrinologische oder andere chronische Erkrankungen haben, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Das Alter der Patienten wird in Halb-Jahres-Intervallen eingeteilt, wobei in einem Abstand von $-4/12$ bis $+4/12$ des Alters x , das Alter x angenommen wird. Ein Kind mit einem Alter von 7,26 Jahre wird beispielsweise der Altersstufe 7,5 zugeteilt. Die Abbildung 2.2 stellt die Einteilung graphisch dar.

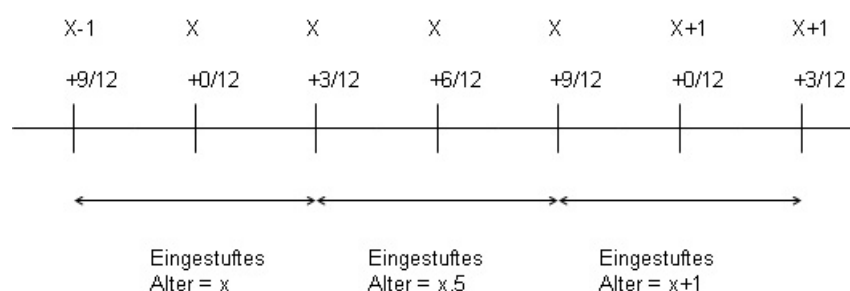


Abbildung 2.2: Alterseinteilung: schematische Darstellung der Bildung der verschiedenen Altersgruppen

Die Eltern der Kinder haben eine Einverständniserklärung zu den Untersuchungen unterschrieben. Die Studie ist 2006 von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin genehmigt worden.

Erhebung der anthropometrischen Daten

Die Kinder wurden in Unterwäsche bekleidet ohne Schuhe auf einer elektronischen Waage gewogen und stehend vermessen. Sowohl im Otto Heubner Centrum als auch an den Berliner Schulen wurde das Gewicht bis auf 100g und die Körpergröße bis auf einen Zentimeter genau gemessen. Die erhobenen Werte wurden anhand von alters- und geschlechtsspezifischer Referenzwerten in Standardabweichungen (SDS) ausgedrückt. Der adipöse Phänotyp wird in dieser Arbeit ab einer Standardabweichung von $+2,0$ definiert (Siehe Abschnitt 1.1.1). Somit liegen Kinder innerhalb dieser Gruppe nach den Empfehlungen der AGA im hoch adipösen Bereich.

Kinder, für die nicht alle anthropometrischen Daten vorlagen, wurden aus der Studie ausgeschlossen ($n = 30$).

HOMA-IR-Wert Bestimmung

Für 357 der 582 adipösen Kinder liegt ein HOMA-IR-Wert vor, der ebenfalls auf eine Assoziation mit den drei SNPs untersucht wird. Zur Berechnung des HOMA-IR-Wertes wurden nach 12 bis 14 Stunden Nüchternzeit aus venösem Blut im Rahmen des Oralen Glukose Toleranz Tests (OGTT) der Nüchterninsulin und -glukosewert bestimmt. Anhand dieser Werte wurde der HOMA-IR-Wert wie folgt berechnet:

$$HOMA - IR = Insulin * Glukose / 22,5.$$

Insulin und Glukose liegen in den Einheiten $\mu\text{U}/\text{ml}$ und mmol/l vor [4, 32, 84]. Der cut-off Wert für einen erhöhten HOMA-IR-Wert liegt bei 3,0 mmol/l [4].

2.2.2 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion aus Blut

Die DNA-Extraktion aus 300 μl EDTA-Blut wurde nach dem Protokoll von Qiagen mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen durchgeführt [73]. Die im Spektrophotometer gemessene Endkonzentration der DNA beträgt etwa 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

DNA-Extraktion aus Kaugummi

Die Gewinnung der DNA erfolgt aus gekauten Bubblegum Cherry Kaugummis der Firma Wrigley. Von den gewonnenen Kaugummis wird im gefrorenen Zustand ein 2*2*5 mm großes Stück Kaugummi abgeschnitten und mit 500 μl Tissue-Lysis Buffer aus dem Promega Kit für 30 min bei 60 °C und 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) im Thermomixer inkubiert [72]. Anschließend wird es für fünf Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Es folgt eine zweite halbstündige Inkubation bei 95°C und 900 rpm im Thermomixer. Die Reaktionsgefäße werden anschließend fünf Minuten auf Eis gestellt und danach erneut für fünf Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Von dem entstandenem Überstand werden jeweils 500 μl in die Kartuschen des Maxwell 16 Instruments überpipetiert und das Gerät wird unter dem Tissue Programm gestartet.

In dieser Studie werden zwei Verfahren der Genotypisierung angewandt: einerseits die **SNaPshot Methode** mit anschließender Elektrophorese und andererseits die **i-plex Methode** mit anschließender Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight Spektrometrie (MALDI-TOF).

Im Folgenden werden die bei diesen beiden Verfahren eingesetzten Techniken vorgestellt. Dabei erfolgen jeweils zunächst eine einleitende Beschreibung der Methode und anschließend die Aufführung der jeweiligen Protokolle.

Grundlage der folgenden SNaPshot-Protokolle sind die Empfehlungen der Firma Applied Biosystems (ABI PRISM) [1]. Grundlage der i-plex Methode sind die Empfehlungen der Firma Sequenom [6].

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Prinzip der PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode der *in vitro* Amplifizierung chromosomaler DNA. Sie erfolgt über den Einsatz synthetischer Nukleotide, die sich komplementär zu der zu klonenden Sequenz anlagern. Das Prinzip der PCR wurde 1983 von Mullis und Mitarbeitern veröffentlicht [65].

PCR-Protokoll für das SNaPshot Verfahren

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf einen 15 μ l PCR-Einzelansatz.

Reagenzien	Finale Konzentration
HPLC-H ₂ O	
NH ₄ based Mango-Taq reaction buffer (10x)	1,2x
MgCl ₂ Solution (50 mM)	1,8 mM
dNTP Mix (10 mM)	0,06 mM
Primer F und R (25 μ M)	0,3 μ M je Primer
Mango Taq (1 U/ μ l)	0,36 U/rxn
Template	0,024 ng/rxn

Für einen Ansatz mit mehreren Proben wird zunächst ein Mastermix aus Wasser, PCR-Puffer, Magnesiumchlorid, dNTPs, Primern und Taq hergestellt, von dem jeweils 14,4 μ l in

die einzelnen Wells vorgelegt werden und anschließend 0,6 μl der jeweiligen DNA Proben zugefügt werden.

Für die Negativkontrollen werden anstelle der DNA-Probe 0,6 μl H_2O eingesetzt.

Das Temperaturprofil, dem die Proben im Mastercycler unterliegen, ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die PCR Proben der SNPs rs8111428 und rs2302382 benötigen eine Annealingtemperatur von 62°C, die Proben für den SNP rs1800437 hingegen eine Temperatur von 63°C.

Intervall	Beschreibung
1. 95°C 5 min	Aktivierung der Mango Taq
2. 95°C 25 s	Denaturierung
3. 62°C (63°C) 25 s	Annealing
4. 72°C 1 min	Elongation
5. 72°C 4 min	finale Elongation
6. 4°C hold	Abkühlen

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation werden 30 mal durchlaufen.

PCR-Protokoll für das i-plex Verfahren

Für die PCR werden 2 μl der DNA-Proben mit einer Konzentration von 2 ng/ μl in die Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend getrocknet. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf einen 5 μl PCR-Einzelansatz. Die finale Konzentration pro Primer beträgt 0,1 μM .

Reagenzien	Finale Konzentration
HPLC- H_2O	
PCR-Puffer für HotStar mit MgCl_2 (10x)	1,25x
MgCl_2 Solution (25 mM)	1,625 mM
dNTP Mix (25 mM)	500 μM
Primer F und R (100 μM) 48	100 nM
Hotstar Taq (5 U/ μl)	0,5 U/rxn
Template	4 ng/rxn

Mit den Reagenzien wird ein Mastermix für mehrere Proben angefertigt. Nach dem Durchmischen des Mastermixes werden mit dem TECAN-Roboter jeweils 5 μl in die Mikrotiterplatten, in denen bereits die getrocknete DNA vorgelegt wurde, pipettiert. Nach einer

einminütigen Zentrifugierung bei 10.000 rpm durchläuft die PCR folgendes Thermocycler Programm:

Intervall	Beschreibung
1. 94°C 15 min	Aktivierung der Hotstar Taq
2. 94°C 20 s	Denaturierung
3. 56°C 30 s	Annealing
4. 72°C 1 min	Elongation
5. 72°C 3 min	finale Elongation
6. 20°C hold	Abkühlen

Die Schritte 2 - 4 werden 45 mal wiederholt. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Tabelle 2.3 führt die Sequenzlängen der jeweiligen PCR-Produkte für das SNaPshot und für das i-plex Verfahren auf (mittlere und rechte Spalte). Die Amplifikate des SNaPshot Verfahrens sind wesentlich länger als die für das i-plex Verfahren, da die PCR-Primer so gewählt wurden, dass mit den Amplifikaten auch eine Sequenzierung nach Sanger durchgeführt werden kann.

Tabelle 2.3: PCR-Amplifikat-Längen

PCR	Länge-SNaPshot (Bp)	Länge-i-plex (Bp)
rs8111428	340	105
rs2302382	237	115
rs1800437	245	120

2.2.4 Gelelektrophorese

Prinzip der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird als Kontrolle nach der PCR durchgeführt. Es wird überprüft, ob bei der PCR Produkte entstanden sind und ob sie in der erwarteten Größenordnung liegen.

Die negativ geladenen DNA-Segmente trennen sich unter elektrischer Spannung in einem Agarosegel auf. Längere Fragmente wandern langsamer als kürzere, sodass eine Größentrennung durchgeführt wird. Als Skala für die Segmentgröße dient eine 1 kB DNA-Leiter, die

sich aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten zusammensetzt, deren einzelne Größen bekannt sind. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugefügt, welches die DNA interkaliert und fluoresziert, wenn es Ultraviolettl-Licht ausgesetzt wird. So kann die Länge der Fragmente im Photometer bestimmt werden.

Protokoll der Gelelektrophorese

Zunächst wird die Agarose in dem TBE bei 600 Watt in der Mikrowelle drei Minuten lang geschmolzen. Anschließend werden 4 μl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das fertige Gemisch wird als 1,5%iges Gel gegossen.

Reagenzien	Menge
Agarose	1,35 g
10x TBE	90 ml
Ethidiumbromid	4,0 μl

Auftragen der Proben auf das Gel

Es werden 2 μl der PCR-Produkte mit jeweils 7 μl Loading Dye gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese der Proben läuft 20 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt.

2.2.5 Enzymatischer Verdau

Prinzip des enzymatischen Verdau

Um die überschüssigen Nukleotide und Primer, die nicht an der PCR teilgenommen haben, zu entfernen, folgt die enzymatische Aufreinigung mit den Enzymen Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Exonuklease I (Exo I). Die Phosphatase SAP hydrolysiert die überschüssigen dNTPs, die nun ohne ihre OH-Gruppe nicht mehr in die DNA eingebaut werden können. Die Primer, als Einzelstrang DNA-Stücke, werden durch die Exonuklease I verdaut.

Da beide Enzyme hitzeempfindlich sind, können sie nach vollendeter Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert werden.

Protokoll des enzymatischen Verdau für das SNaPshot Verfahren

Die Exonuklease I wird mit ihrem Puffer 1:20 verdünnt, der wiederum 1:10 mit HPLC-H₂O verdünnt wurde. Beide Enzyme werden getrennt voneinander auf Eis zu 7 μ l des PCR-Produktes pipettiert.

Reagenzien	Finale Konzentration
Shrimp Alkaline Posphatase (1.000 U/ μ l)	227,1 U/rxn
Exonuklease I (1:20 mit EXO I Puffer verdünnt)	90,6 U/rxn

Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert. Im Thermocycler werden sie für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgt der enzymatische Verdau. Es folgt die 15-minütige Inaktivierung der beiden Enzyme bei 75°C. Die Temperatur wird danach auf 4°C herab gekühlt.

Protokoll für das i-plex Verfahren

Im Gegensatz zum SNaPshot Verfahren werden die PCR-Produkte für das i-plex Verfahren nur mit Shrimp Alkaliner Phosphatase enzymatisch verdaut. Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen Einzelansatz.

Reagenzien	Finale Konzentration
HPLC-H ₂ O	
Shrimp Alkaline Phosphatase Puffer (10x)	0,085x
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ μ l)	0,0151 U/ μ l

Der Mastermix wird gemischt und zentrifugiert und mit dem Pipettierroboter MULTIMEK 96 werden jeweils 2 μ l des Mastermixes den einzelnen PCR-Produkten auf der Mikrotiterplatte zugefügt. Anschließend wird die Platte gevortext und erneut zentrifugiert. Es folgt der enzymatische Verdau bei folgendem Temperaturprofil: 40-minütiger enzymatischer Verdau bei 37°C, fünf-minütige Inaktivierung der Phosphatase bei 85°C und abschließende Herabkühlung auf 20°C bis zur weiteren Verarbeitung der Proben.

- Diskriminierung der Base des SNPs: mittels unterschiedlicher Farbmarkierung der ddNTPs.
- Diskriminierung des SNPs an sich: mittels unterschiedlicher Sequenzlänge der Extensionprimer.

Extensionprimer für das SNaPshot Verfahren

Die Tabelle 2.4 führt die Extension-Primer (EP) der SNaPshot Reaktion auf.

In der linken Spalte sind die Namen der EP aufgeführt, -F bezeichnet den Vorwärtsprimer (forward; 5' - 3') und -R den Rückwärtsprimer (3' - 5'). In der mittleren Spalte sind die Sequenzen der jeweiligen EP in 5' - 3' Richtung aufgeführt. Die rechte Spalte beziffert die Länge der jeweiligen Primersequenz. Die EP der SNPs rs8111428 und rs2302382 haben eine AAA-Verlängerung, der EP des SNPs rs1800437 eine GCTA-Verlängerung. Dies hat sich durch mehrere Experimente als die jeweils beste Form der Verlängerung erwiesen.

Tabelle 2.4: Extensionprimer für das SNaPshot Verfahren

Name	Sequenz	Länge
rs8111428 EP	5' aaa aaa aca act ctc cct tag tct cac cca 3'	30-mer
rs2302382 EP	5' aaa aaa aaa aag caa ctc cca ggc gtg atg atc tg 3'	35-mer
rs1800437 EP	5' agc tag cta gct agc tag cgt gcc cct gct ggg tgt cca c 3'	40-mer

Protokoll der SNaPshot Reaktion

Für die SNaPshot Reaktion werden die aufgereinigten SNPs rs8111428, rs2302382 und rs1800437 in einem Mischungsverhältnis von 1:2:2 gepoolt. Da final 3 μL Template bei der SNaPshot Reaktion eingesetzt werden, entspricht das 0,6 μL der PCR-Proben für rs8111428 und jeweils 1,2 μL der PCR Proben der Produkte für rs2302382 und rs1800437. Dieses Mischungsverhältnis hat sich aus Probeläufen für die SNaPshot Reaktion und der späteren Intensität der Ergebnisse für die jeweiligen SNPs ergeben.

Für die Proben wird bei der SNaPshot Reaktion folgender Ansatz hergestellt:

Reagenzien	Volumen
HPLC-H ₂ O	5 μ l
PCR Produkte	3 μ l
Extension Primer gepoolt (jeweils 5 μ M)	1 μ l
Multiplex ready reaction Mix	1 μ l
Gesamt	10 μ l

Die Extensionprimer, die jeweils in einer Konzentration von 5 μ M vorliegen, werden 1:1:1 gepoolt und liegen in der Reaktion mit einer finalen Konzentration von 0,17 pmol/l vor.

Positivkontrolle

Die Positivkontrolle für die SNaPshot Reaktion setzt sich zusammen aus:

Reagenzien	Volumen
HPLC-H ₂ O	6 μ l
Multiplex Ready Reaction Mix	1 μ l
Multiplex Control DNA	2 μ l
Multiplex Control Primer	1 μ l
Gesamt	10 μ l

Die finale Primerkonzentration beträgt: 1,0 pmol/l.

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle für die SNaPshot Reaktion setzt sich zusammen aus:

Reagenzien	Volumen
HPLC-H ₂ O	8 μ l
Multiplex Ready Reaction Mix	1 μ l
Multiplex Control Primer	1 μ l
Gesamt	10 μ l

Die finale Primerkonzentration beträgt: 1,0 pmol/l.

Die SNaPshot Reaktion unterliegt folgenden Bedingungen:

Intervall	Beschreibung
1. 96°C	2 min Denaturierung
2. 96°C	10 s Denaturierung
3. 50°C	5 s Annealing
4. 60°C	30 s Elongation
5. 4°C	Hold

Die Schritte 2-4 werden 25 mal wiederholt.

Die entstandenen SNaPshot Produkte werden zeitnah weiterverarbeitet.

2.2.7 i-plex Reaktion

Prinzip der i-plex Reaktion

Die i-plex Reaktion besteht wie die SNaPshot Reaktion aus einer Einzelbasenelongation an der Stelle des SNPs. Die Diskriminierung der verschiedenen Basen des SNPs im i-plex Verfahren entsteht allerdings über masseveränderte und nicht über farbmarkierte Terminatoren wie bei der SNaPshot Methode. Die Massenunterschiede zwischen den einzelnen Basen betragen mindestens 15 Da [69]. Die Diskriminierung der unterschiedlichen SNPs erfolgt ebenfalls über Massenunterschiede innerhalb der Primer. Die Massenunterschiede entstehen durch eine adjustierte Masse (adjusted MassEXTEND) der jeweiligen Primer ähnlich wie die GCTA- bzw. AAA-Anhänge beim SNaPshot Verfahren [54].

- Diskriminierung der Base des SNPs: mittels masseveränderter ddNTPs.
- Diskriminierung des SNPs an sich: mittels Massenunterschiede der Primer.

Extensionprimer für das i-plex Verfahren

Tabelle 2.5: Extensionprimer für das i-plex Verfahren

Name	Sequenz	Länge
rs8111428 EP-MALDI	5' CTCCCTTAGTCTCACCCA 3'	18-mer
rs2302382 EP-MALDI	5' CAGGCGTGATGATCTG 3'	16-mer
rs1800437 EP-MALDI	5' TTGGAGCAAACACCACCT 3'	18-mer

Protokoll der i-plex Reaktion

Zu den 7 μ l, die nach der SAP-Aufreinigung vorliegen, werden 2 μ l des unten beschriebenen i-plex Mastermixes pipettiert, sodass die i-plex Reaktion ein Gesamtvolumen von 9 μ l hat. Der Ansatz der i-plex Reaktion setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Reagenzien	Finale Konzentration
HPLC-H ₂	
i-plex buffer plus (10x)	0,222x
i-plex termination mix gold	1x
Primer (50 μ M)	4 μ M
i-plex Gold Enzym	1x
Template	

Der i-plex Mastermix wird gemischt und zentrifugiert. Mit dem Pipettierroboter werden jeweils 2 μ l des Mastermixes den einzelnen verdauten PCR-Produkten auf der Mikrotiterplatte zugefügt. Anschließend wird die Platte gevortext und erneut zentrifugiert. Die Proben durchlaufen das unten aufgeführte i-plex Temperaturprofil:

Intervall	Beschreibung
1. 94°C	30 s
2. 94°C	5 s Denaturierung
3. 52°C	5 s Annealing
4. 80°C	5 s Elongation
5. 72°C	3 min
6. 20°C	hold

Es kommen zwei Schleifen in diesem Programm vor, die Schritte 2 - 4 werden 40 mal wiederholt, wobei bei jeder Wiederholung die Schritte 3 - 4 nochmals je 5 mal durchlaufen werden. Somit entstehen 200 Zyklen.

2.2.8 Post extension treatment

Wie auch nach der Polymerasen Kettenreaktion müssen die Proben für die abschließende Analyse aufgereinigt werden. Im Falle des SNaPshot Verfahrens würden die überschüssigen [F]ddNTPs zu sogenannten Farbblots bei der Sequenzierungselektrophorese führen. Im Falle des i-plex Verfahrens stören überschüssige Ionen die spätere MADLI-TOF Analyse.

Aufreinigung für das SNaPshot Verfahren

Die überschüssigen [F]ddNTPs werden durch den Zusatz von 1 μ l Shrimp Alkaline Phosphatase bei 37°C für 60 Minuten hydrolysiert.

Aufreinigung für das i-plex Verfahren

Prinzip des Ionenaustauschharzes

Da Nukleinsäuren aufgrund der negativen elektrischen Ladung der DNA dazu neigen, Kationen aufzunehmen, werden sie, um fehlerhafte Messungen bei der nachfolgenden elektro-sensitiven MALDI-TOF Reaktion zu vermeiden, mit einem Ionenaustauscherharz gereinigt, das die Ionen bindet [37]. Natrium, mit einer Masse von 22 Da, und Kalium, mit einer Masse von 38 Da, würden zu Massenverschiebungen der Produkte und somit zu einer veränderten Flugzeit während der MALDI-TOF führen [69].

Protokoll

Die Proben werden in 25 μl H_2O verdünnt und anschließend mit 6 mg Clean Resin versetzt. Dazu wird eine 6 mg dimple Platte benutzt. Anschließend werden die Proben mit dem Harz bei 4000 rpm zentrifugiert und weitere 15 Minuten auf den Schüttler gestellt.

2.2.9 Elektrophorese

Prinzip der Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung der Proben des SNaPshot Verfahrens erfolgt über eine Kapillarelektrophorese. Die Proben werden in ein Elektrolytbad gegeben und eine Spannung wird angelegt. Die Proben wandern innerhalb der mit Puffer gefüllten Kapillare zur Anode und können so elektrophoretisch und anhand von Fluoreszenzmarkierungen analysiert werden. Die Base an der Stelle des SNPs wird in Form eines Peaks angezeigt, die Position des Peaks auf der x-Achse gibt die Länge des Produktes in Basenpaaren an und entspricht der vorher bestimmten Länge des Extensionprimers zuzüglich des eingebauten Nukleotids des SNPs. Die Abbildung 2.4 veranschaulicht dies an einem Beispiel für einen Patienten der heterozygot für die beiden SNPs rs8111428 und rs2302382 ist.

Verdünnung der Proben

Es werden 3 μl der aufgereinigten SNaPshot Produkte mit 6 μl Formamid verdünnt.

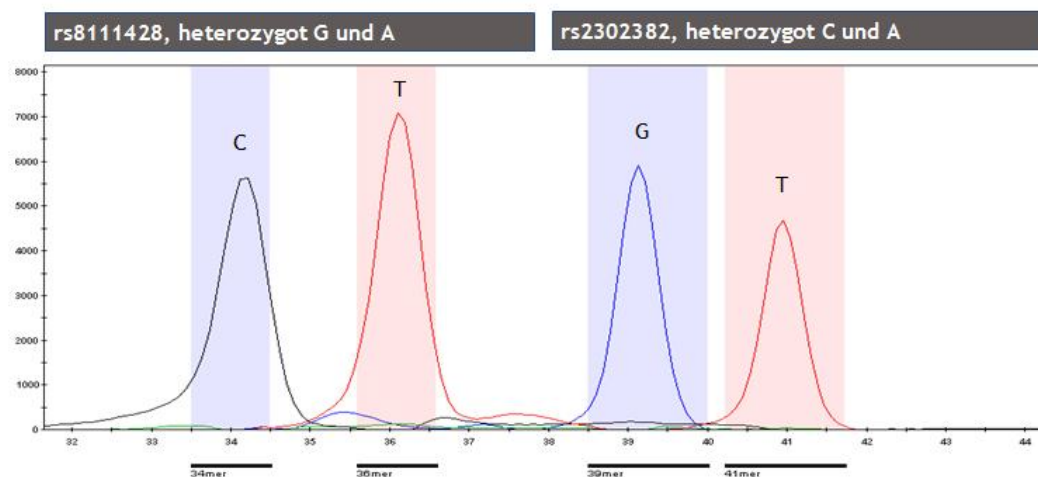


Abbildung 2.4: Elektrophoresediagramm. Die Abbildung zeigt das Elektrophoresediagramm eines Patienten, der für zwei untersuchte SNPs heterozygot ist. Auf der x-Achse ist die Sequenzlänge der untersuchten Produkte aufgeführt, die y-Achse repräsentiert die Intensität der Signale. Die unterschiedlichen Farben ergeben sich durch die komplementären farbmarkierten [F]ddNTPs, die bei der SNaPshot Reaktion eingesetzt wurden.

Elektrophoresevorbereitung: Verdünnung des internen Größenstandards

Da die Unterscheidung der verschiedenen SNP-Sequenzen anhand der definierten Länge eines jeden Extensionprimers erfolgt, muss dem Produkt zur genauen Auswertung ein Größenstandard als Skala beigelegt werden. Dazu wird GS-120 LIZ angewandt, der für eine Produktgröße von 120 Bp ausgelegt ist.

Der Größenstandard Gene Scan-120 LIZ wird ebenfalls mit Formamid verdünnt:

Reagenzien	Volumen
GS-120 LIZ	0,5 μ l
Formamid	7,5 μ l.

Anschließend werden 2 μ l der verdünnten Probe mit den 8 μ l verdünntem GS-120 LIZ in eine MICRO-AMP-Platte pipettiert und nach 10s Zentrifugation bei 2000 rpm in den Sequenzer geladen.

2.2.10 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight

Prinzip der MALDI-TOF

Die Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Time of Flight (TOF) ist eine Form der Massenspektrometrie. Sie nutzt das Prinzip, dass aus der Flugzeit (Time of Flight - TOF), die ein Ion benötigt, in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode zu fliegen, von dem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) des Ions abhängt. Bei bekannter Ladung und bekannter Flugstreckenlänge kann aus der Flugzeit auf die Masse des Ions geschlossen werden [54].

Die DNA-Proben entsprechen in diesem System den Ionen, die Masse der Proben ergibt sich aus den spezifischen homologen Massen-Extensionen (hME) der zuvor durchgeführten i-plex Reaktion: Die Streckenlänge des Flugs entspricht der Rohrlänge des Spektrometers und die Ladung der DNA-Proben wird durch die MALDI festgelegt.

Die Ladung der DNA-Proben muss für alle Proben gleich sein, damit die Proben sich bei der Analyse ausschließlich durch ihre Masse unterscheiden. Dieser Unterschied stellt die Grundlage der SNP-Diskriminierung dar. Dazu werden die Proben zunächst auf einen mit Hydroxypicolinsäure beschichteten Chip gespottet. Die Hydroxypicolinsäure führt zur Auskristallisierung der DNA-Proben und somit zu einem Verlust der negativen Ladung der DNA. Dies entspricht dem "matrix assisted deionisation"- Schritt der MALDI. Der Chip wird in den Spektrometer eingeführt. Dieser besteht aus einem vakuumgefüllten Raum, der auf der einen Seite durch den Chip und auf der anderen Seite durch einen Detektor bewandert wird. Die Abbildung 2.5 veranschaulicht das MALDI-TOF Verfahren. Nachdem der mit der auskristallisierten DNA beladene Chip in das Gerät eingeführt ist, werden die Proben mittels Laserbestrahlung gleichermaßen erneut ionisiert („ionisation“- Schritt). Die Ladungen der so negativ geladenen DNA ist folglich für alle Proben gleich. Das Rohr wird nun unter elektrische Spannung gelegt, sodass es zur Anziehung zwischen der Anode und der durch den Laser ionisierten DNA-Proben kommt. Die Flugzeit der Ionen ist dabei proportional zur Quadratwurzel des Masse-Ladungs-Verhältnis ($\sqrt{m/z}$). Ein leichteres Teilchen mit geringerer hME des Extensionprimers benötigt weniger Zeit, um den Detek-

tor zu erreichen, als ein schwereres. Derart erfolgt eine Diskriminierung der verschiedenen SNPs und der entsprechenden Base je SNP.

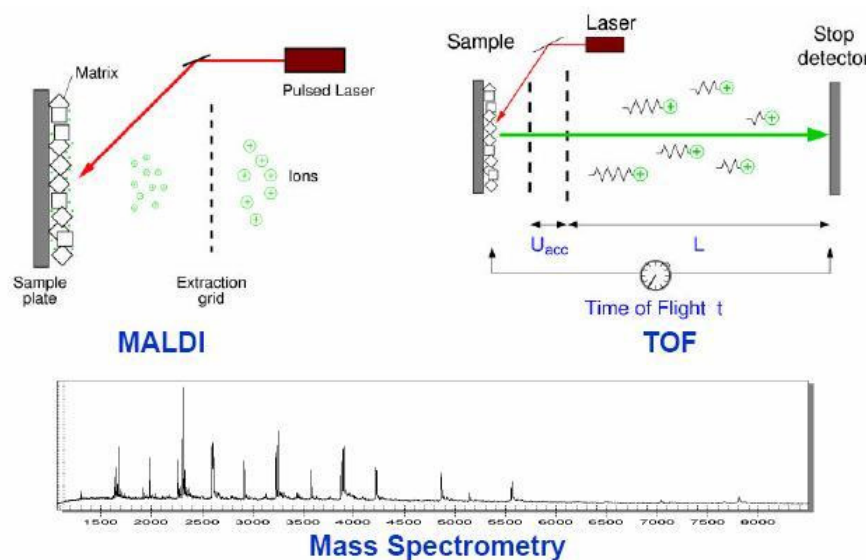


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der MALDI-TOF Technik. Die auf der Matrix auskristallisierten DNA-Proben werden durch einen Laser ionisiert. Unter elektrische Spannung gesetzt, fliegen sie proportional zu ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis zum Detektor. Anhand der gemessenen Flugzeit (TOF) wird die Masse der Proben analysiert. Die untere Grafik stellt das Spektrogramm der analysierten Proben dar.

Protokoll

Mit einem Nanodispenser werden jeweils 20 nl der einzelnen Proben auf einen 384 - Element SpectroCHIP Bioarray gespottet. Der fertige Chip wird dann in dem MALDI-TOF Gerät und mit der entsprechenden Software analysiert.

2.2.11 Statistische Methoden

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) ist ein Modell der Populationsgenetik, das in einer idealen Population vorzufinden ist, in der sich die Allelhäufigkeiten und die Genotypenhäufigkeiten aufgrund einer großen Population und somit eines ausreichend großen Genpools nicht verändern [9]. Das Gleichgewicht beschreibt eine konstante Allelverteilung

und somit konstante Verteilungen von homozygoten und heterozygoten Varianten. Dieses Gleichgewicht kann in populationsgenetischen Studien als Referenzwert angenommen werden, um zu überprüfen, ob die erhobenen Daten den biologisch zu erwartenden entsprechen [9]. Das HWE sollte nur in der Kontrollpopulation angewandt werden, da in der Merkmalpopulation eine Assoziation erwartet wird und somit kein Gleichgewicht mehr vorliegen sollte [9]. Abweichungen vom HWE innerhalb der Kontrollpopulation können auf fehlerhafte Datenerhebung oder Probleme bei der Genotypisierung hinweisen.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht eines Gens mit zwei Allelen A und B definiert sich folgendermaßen: $1 = p^2 + 2pq + q^2$, wobei p die Allelhäufigkeit des Allels A darstellt und q die Allelhäufigkeit des Allels B.

Der χ^2 -Test

Der χ^2 -Test ist ein statistischer Test, der es ermöglicht, Häufigkeitsunterschiede zwischen erhobenen und erwarteten Daten zu ermitteln. Die angewandte Formel lautet:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtete Häufigkeit} - \text{erwartete Häufigkeit})^2}{\text{erwartete Häufigkeit}} = \sum \frac{(E - B)^2}{E}$$

Die beobachteten Daten ergeben sich aus den Genotyphäufigkeiten der übergewichtigen Kinder und die erwarteten Daten ergeben sich aus den Genotyphäufigkeiten der normalgewichtigen Kinder. Der χ^2 -Test wird für jeden SNP einzeln angewandt und mit zwei Freiheitsgraden berechnet. In diese Arbeit wird ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ für jeden statistischen Test verwendet, d.h. es erfolgt keine zusätzliche Kontrolle für das Testen multipler Hypothesen. P-Werte die $\leq 5\%$ sind werden somit als signifikant bezeichnet. Um Abweichungen der Kontrolldaten mit den erwarteten Daten des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes zu berechnen, wird ebenfalls der χ^2 -Test angewandt.

Multiple lineare Regression

Die multiple lineare Regression ermöglicht es, den simultanen Einfluss verschiedener unabhängiger Variablen auf einen stetigen Parameter zu bestimmen. Als Ergebnis wird eine

lineare Regressionsfunktion ermittelt, die am genauesten den linearen Zusammenhang zwischen der stetigen, abhängigen Variable und den einbezogenen unabhängigen Variablen ermöglicht. Als ein Maß für jede untersuchte unabhängige Variable werden Regressionskoeffizienten bestimmt, die anzeigen, wie sich die stetige, abhängige Variable verändert, wenn sich die entsprechende unabhängige Variable verändert.

2.2.12 Datenbanken

ncbi	www.ncbi.com
hapmap	www.hapmap.org . Map to genome Build: 36,2
pubmed	www.pubmed.com

2.2.13 Computer Software

Acquire 3.3.1	Sequenom, Hamburg
Assay Design 3.0.0	Sequenom, Hamburg
Assay Editor 3.1.4	Sequenom, Hamburg
Caller 3.3.0	Sequenom, Hamburg
GeneMapper 4.0	Applied Biosystems, Darmstadt
Plate Editor 3.1.4	Sequenom, Hamburg
TYPHER Analyser 3.0	Sequenom, Hamburg
Services 2.0.8	Sequenom, Hamburg
SPSS 15.0	SPSS, München

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Parameter der Studienpopulation

3.1.1 Anthropometrische Parameter

In dieser Studie wurden die anthropometrischen Parameter für Größe und Gewicht von 2280 Kindern aus dem Raum Berlin erhoben. In Hinblick auf das Durchschnittsalter und die Durchschnittsgröße findet sich innerhalb der beiden Gruppen eine leichte Verschiebung: Die adipösen Kinder sind im Schnitt mit 10,96 Jahren 15 Monate jünger als die normalgewichtigen und auch etwas kleiner (149,9 cm vs. 153,5 cm). Jedoch entsprechen die Durchschnittswerte der Körpergröße sowohl der adipösen als auch der nicht adipösen Kinder etwa der 50. Perzentile für das entsprechende Durchschnittsalter der Gruppe, sodass die beiden Geschlechtsgruppen, obwohl sie in Bezug auf das Durchschnittsalter divergieren, mit einander verglichen werden können, da sie in Bezug auf die Körpergröße einer Normalverteilung entsprechen und die Unterschiede der BMI-SDS-Werte ausschließlich auf die Gewichtsunterschiede zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse der anthropometrischen Messungen der 2280 Kinder dieser Studie sind in der Tabelle 3.1 dargestellt.

Aufgeführt sind der Mittelwert, der Median, der minimale und der maximale Wert für die Parameter Alter (Jahre), Größe (cm), Standardabweichung des Body-Maß-Index (BMI-SDS (kg/m^2)) - berechnet nach den Daten von Kromeyer-Hauschild und Mitarbeitern [48] und für den Homeostase Assessment Model für Insulinresistenz Wert (HOMA-IR-Wert

Tabelle 3.1: Probenübersicht: anthropometrische Parameter n.e.*: nicht erhoben

Phänotyp	Parameter	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
normalgewichtig (n= 1696)	Alter	12,3	12,9	2,7	17,4
	Größe	153,5	156,8	80,1	191,7
	BMI-SDS	0,04	0,11	-4,10	1,98
	HOMA-IR	n.e.*	n.e.*	n.e.*	n.e.*
adipös (n=584)	Alter	10,96	11,41	2,78	18,23
	Größe	149,9	153,9	85,1	201,5
	BMI-SDS	2,80	2,72	2,00	4,72
	HOMA-IR	3,3	2,59	0,01	19,2

(mg/mmol)). Diese Daten sind jeweils in der Tabelle für die normalgewichtigen und für die adipösen Kinder dargestellt.

Tabelle 3.2: Probenübersicht:Geschlecht

Phänotyp	Geschlecht	Häufigkeit	Prozent
normalgewichtig (n= 1696)	männlich	65	3,8
	weiblich	1631	96,2
adipös (n=584)	männlich	236	40,4
	weiblich	348	59,6

Die aufgrund der Unterteilung nach der BMI-Standardabweichung entstandenen zwei Phänotypgruppen unterscheiden sich jedoch in Hinblick auf die Geschlechtsverteilung erheblich. Innerhalb der Gruppe der adipösen Kinder sind 40,4% männlich, wohingegen die Gruppe der normalgewichtigen Kinder überwiegend aus Mädchen besteht (96,2%). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Kinder der adipösen Gruppe überwiegend aus dem Patientenkollektiv der Adipositas Sprechstunde des Otto Heubner Centrums der Charité rekrutiert worden sind, wobei die Kinder der normalgewichtigen Gruppe sich vornehmlich aus Mädchen der *PIONEER* Studie zusammensetzen. Ob ein Zusammenhang zwischen der Genotypverteilung und dem Geschlecht besteht, wird in dem Abschnitt 3.2.2 geprüft.

3.1.2 Der HOMA-IR-Wert

Für 61,1% der 584 adipösen Kinder liegt ein Homeostase Assessment Model für Insulinresistenz Wert vor, der ebenfalls auf eine Assoziation mit den drei SNPs untersucht wird. Der Cut-off Wert für einen erhöhten HOMA-IR-Wert liegt bei 3,0 mmol/l [4] (zur HOMA-IR Definition siehe Abschnitt 3.3). Der Durchschnittswert der erhobenen Werte liegt bei 3,3 mmol/l (Siehe Tabelle 3.1). Anhand der Daten von Allard und Mitarbeitern wurden Perzentilenwerte für den HOMA-IR-Wert für Kinder berechnet [4]. In der Tabelle 3.3 ist aufgeführt, wie viele Kinder einen HOMA-IR-Wert oberhalb und wieviele einen Wert unterhalb der 95. Perzentile haben. Daraus ergeben sich zwei etwa gleich große Gruppen, die für die spätere Untersuchung der Assoziation zwischen HOMA-IR-Werten über der 95. Perzentile und den drei untersuchten Genotypen die Grundlage bilden.

Tabelle 3.3: HOMA-IR-Wert-Status der adipösen Kinder

HOMA-IR-Wert-Status	Häufigkeit	Prozent
HOMA-IR-Wert unter der 95. Perzentile	189	52,9
HOMA-IR-Wert über der 95. Perzentile	168	47,1

3.1.3 Auftrennung der Kinder in ethnische Gruppen

Eine Einteilung der Kinder in verschiedene ethnische Gruppen wird vorgenommen, da sich verschiedene Bevölkerungsgruppen in ihren Genotypverteilungen unterscheiden können und diese möglichen Unterschiede in dieser Studie untersucht werden sollen. Insbesondere die Berliner Bevölkerung zeichnet sich durch ihre hochgradig multikulturelle Zusammensetzung aus. Um dem gerecht zu werden, werden die Kinder in sieben verschiedene Gruppen unterteilt. Grundlage der Unterteilung bilden die Vorgaben des Spezialberichtes *Basisdaten zur gesundheitlichen und sozialen Lage von Kindern in Berlin* des Senats aus dem Jahre 2007 [68]. Dabei orientieren sich die Gruppen einerseits an den zahlenmäßigen Häufigkeiten der Kinder aus den jeweiligen Herkunftsländern und andererseits an den vermuteten genetischen Ähnlichkeiten der Genotypverteilungen innerhalb dieser Gruppen.

Nach der Einführung der neuen Gesetze zur Staatsangehörigkeit im Jahre 2000 (§25 StAG)

[90] spiegelt die Staatsangehörigkeit eines Kindes nicht mehr zwangsläufig sein Herkunftsland wider. Aufgrund dessen wird für die Einteilung der Kinder in die verschiedenen Gruppen auf die Herkunftsländer der Eltern zurückgegriffen. Dabei ist die Herkunft der Eltern gruppendifinierend.

Kinder einer binationalen Ehe, wobei ein Elternteil deutsch ist, werden der Herkunftsgruppe des nicht deutschen Elternteils zugeordnet. Ist für mindestens ein Elternteil keine Herkunft bekannt, wird das Kind der Gruppe „nicht bekannt“ zugeordnet. Kinder, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, bilden die Gruppe „sonstige“.

- „deutsch“: Beide Elternteile kommen aus Deutschland.
- „türkisch“: Beide Elternteile haben eine türkische Herkunft oder ein Elternteil ist türkisch und das andere deutsch.
- „arabisch“: Beide Elternteile weisen eine arabische Herkunft auf (die Gruppe umfasst alle 22 Länder der Arabischen Liga) oder deutsch-arabische Eltern.
- „europäisch-westlich geprägte Industriestaaten“: Beide Eltern kommen aus westeuropäischen Staaten (außer Deutschland), USA, Kanada, Australien oder Neuseeland.
- „ehemaliger Ostblock“: Beide Eltern kommen aus osteuropäischen Staaten, Staaten der ehemaligen Sowjetunion, des ehemaligen Jugoslawiens oder aus Albanien.
- „sonstige“: Beide Elternteile kommen aus unterschiedlichen, nicht deutschen Herkunftsländern.
- „nicht bekannt“: Für mindestens ein Elternteil war das Herkunftsland nicht bekannt.

Die Tabelle 3.4 führt die jeweiligen Gruppenstärken auf.

In den beiden Phänotypgruppen unterscheiden sich die ethnischen Gruppen *türkisch*, *arabisch* und *ehemaliger Ostblock* um jeweils den Faktor 1,7, 2,5 und 2,6. Somit sind für diese Gruppen jeweils prozentual mehr Kinder Übergewichtig als normalgewichtig. Umgekehrt

Tabelle 3.4: Statistische Daten zur Verteilung der Studienpopulation auf die verschiedenen ethnischen Gruppen.

Phänotyp	ethnische Einteilung	Häufigkeit	Prozente
normalgewichtig (n= 1698)	deutsch	926	54,5
	türkisch	193	11,4
	arabisch	92	5,4
	ehemaliger Ostblock	140	8,2
	Industriestaaten westlicher Prägung	47	2,8
	sonstige	78	4,6
	nicht bekannt	222	13,2
	Gesamt	1698	100
adipös (n= 582)	deutsch	299	51,4
	türkisch	113	19,4
	arabisch	13	2,2
	ehemaliger Ostblock	18	3,1
	Industriestaaten westlicher Prägung	3	0,5
	sonstige	18	3,1
	nicht bekannt	118	20,2
	Gesamt	582	100

verhält es sich hingegen bei den Kindern deutscher Herkunft und denen aus Industriestaaten westlicher Prägung. Dort sind jeweils 1,06- und 5,6-mal mehr Kinder prozentual normal- als übergewichtig. Diese Daten spiegeln epidemiologische Studien, wonach Kinder mit östlichem Migrationshintergrund höhere Adipositasprävalenzen aufweisen als Kinder anderer ethnischer Zugehörigkeiten, wider [64, 70].

3.2 Auswertung der Frequenzen der drei SNPs

Eine Assoziation liegt vor, wenn die in der Einleitung vorgestellte Nullhypothese widerlegt wird und die Arbeitshypothese angenommen werden kann. Dazu wurden die Frequenzen der Genotypen für die drei SNPs erhoben und jeweils ihre Unterschiede zwischen den Kindern der adipösen Gruppe mit denen der normalgewichtigen Gruppe verglichen. Die Signifikanz dieser Unterschiede wird mittels Chi²-Test mit dem Programm SPSS berechnet. Die Nullhypothese wird bei einem p-Wert unter 0,05 verworfen.

Die Auswertung wird in den folgenden Schritten durchgeführt: Zunächst werden die Allelverteilungen der drei SNPs innerhalb der Einteilung normalgewichtig und adipös untersucht. Daraufhin wird vertieft auf die Unterschiede zwischen den Allelverteilungen von adipösen Jungen und Mädchen und denen normalgewichtiger Jungen und Mädchen eingegangen. Anschließend wird nach ethnischen Unterschieden innerhalb der Allelverteilungen geschaut. Um den Einfluss der Variablen Geschlecht, Alter und ethnischer Hintergrund im Zusammenspiel auf den Phänotypen zu ermitteln, wird abschließend eine lineare Regression durchgeführt. Die drei SNPs werden dabei jeweils einzeln betrachtet. Da nicht für jeden Patienten die Genotypen für alle drei SNPs vorliegen, werden bei der Auswertung der SNPs die jeweiligen einfließenden Fallzahlen separat angegeben. Die Calling-Rate, Prozentsatz der erfolgreich genotypisierten Daten der Gesamtdaten, entsprechen für die drei SNPs rs8111428 98,80%, für den SNP rs2302382 98,3% und für den SNP rs1800437 97,4%.

3.2.1 Assoziationsuntersuchung zwischen den SNPs und der BMI-SDS

Der SNP rs8111428

Untersucht werden die Genotypen von 2254 Kindern (1673 normalgewichtige und 581 adipöse Kinder). Die Abbildung 3.1 listet die Allelverteilung für den SNP rs8111428 für normalgewichtige und adipöse Kinder auf. Da kein Ungleichgewicht des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes für die Allelfrequenzen der Kinder der normalgewichtigen Gruppe für den SNP rs8111428 vorliegt, kann eine fehlerhafte Datenerhebung ausgeschlossen werden. Der p-Wert des Chi²-Tests der beobachteten und der erwarteten Frequenzen liegt über 0,05.

Somit unterscheiden sich die Allelfrequenzen für den SNP rs8111428 nicht signifikant zwischen den beiden Phänotypen. Die Frequenz der adipösen Kinder, die heterozygot AG sind, ist mit 33,0% um knapp 3% höher als die Frequenz der normalgewichtigen Kinder, die ebenfalls heterozygot AG sind. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant, sondern kann lediglich auf einen Trend hinweisen. Der berechnete Chi²-Wert für die aufgeführten Daten der Tabelle 3.1 beträgt 1,292, was einem p-Wert von 0,524 bei zwei Freiheitsgraden ent-

Tabelle 3.1: rs8111428: Gegenüberstellung der Genotypverteilungen des SNPs rs8111428 innerhalb der beiden Phänotypen normalgewichtig und adipös.

			Phänotyp		Gesamt
			normalgewichtig	adipös	
rs8111428	AA	Anzahl	1088	367	1455
		% innerhalb von Phänotyp	65,0%	63,2%	64,6%
		% der Gesamtzahl	48,3%	16,3%	64,6%
	AG	Anzahl	513	192	705
		% innerhalb von Phänotyp	30,7%	33,0%	31,3%
		% der Gesamtzahl	22,8%	8,5%	31,3%
	GG	Anzahl	72	22	94
		% innerhalb von Phänotyp	4,3%	3,8%	4,2%
		% der Gesamtzahl	3,2%	1,0%	4,2%
Gesamt	Anzahl	1673	581	2254	
	% innerhalb von Phänotyp	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	74,2%	25,8%	100,0%	

spricht und somit nicht signifikant ist.

Die minimale Allelfrequenz liegt für Guanin bei 19,6% bei den normalgewichtigen Kindern und bei 20,3% bei den adipösen Kindern.

Der SNP rs2302382

In die Untersuchung der Allelfrequenzen für diesen SNP sind 2242 Genotypen eingegangen, wobei 1662 normalgewichtige und 580 adipöse Kinder untersucht wurden.

In der Tabelle 3.2 sind die Allelverteilungen für den SNP rs2302382 dargestellt. Die erhobenen und die erwarteten Daten für die Kinder der Kontrollgruppe liegen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, der p-Wert des Chi²-Testes liegt über 0,05.

Auch diese erhobenen Daten weisen keinerlei signifikante Unterschiede der Allelverteilungen zwischen den beiden Phänotypen auf. Der Chi²-Wert liegt bei 0,717, was einem p-Wert von 0,699 bei zwei Freiheitsgraden entspricht und somit nicht signifikant ist.

Der Genotyp homozygot CC ist in beiden Phänotypgruppen mit 62% bei den normalge-

Tabelle 3.2: rs2302382: Gegenüberstellung der Genotypverteilungen des SNPs rs2302382 innerhalb der beiden Phänotypen normalgewichtig und adipös.

			Phänotyp		Gesamt
			normalgewichtig	adipös	
rs2302382	CC	Anzahl	1031	349	1380
		% innerhalb von Phänotyp	62,0%	60,2%	61,6%
		% der Gesamtzahl	46,0%	15,6%	61,6%
	CA	Anzahl	547	202	749
		% innerhalb von Phänotyp	32,9%	34,8%	33,4%
		% der Gesamtzahl	24,4%	9,0%	33,4%
	AA	Anzahl	84	29	113
		% innerhalb von Phänotyp	5,1%	5,0%	5,0%
		% der Gesamtzahl	3,7%	1,3%	5,0%
Gesamt	Anzahl	1662	580	2242	
	% innerhalb von Phänotyp	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	74,1%	25,9%	100,0%	

wichtigen Kindern und mit 60,2% bei den adipösen Kindern der am stärksten vertretene Genotyp. Die minimale Allelfrequenz liegt für Adenin bei 21,5% bei den normalgewichtigen Kindern und bei 22,4% bei den adipösen Kindern.

Der SNP rs1800437

Die Genotypen von 2220 Kindern sind in die Berechnungen für den SNP rs1800437 eingegangen, davon sind 1662 Kinder normalgewichtig und 558 adipös. Die Allelverteilungen für diesen SNP sind in der Tabelle 3.2.1 aufgeführt. Auch die Daten des SNPs rs1800437 wahren das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p\text{-Wert} \geq 0,05$).

Der Unterschied der Allelfrequenzen dieses SNPs zwischen normalgewichtigen und adipösen Kindern ist ebenfalls nicht signifikant; der χ^2 -Test ergibt einen Wert von 1,039 und entspricht einem p -Wert von 0,595 bei zwei Freiheitsgraden. Die minimale Allelfrequenz für den SNP rs1800437 liegt für die Base Cytosin bei 22,2% bei den adipösen Kindern und bei 23,6% bei den normalgewichtigen Kindern.

Somit kann für keinen der drei SNPs eine Assoziation mit Adipositas im Kindesalter nachgewiesen werden.

Tabelle 3.3: rs1800437: Gegenüberstellung der Genotypverteilungen des SNPs rs1800437 innerhalb der beiden Phänotypen normalgewichtig und adipös.

			Phänotyp		Gesamt
			normalgewichtig	adipös	
rs1800437	GG	Anzahl	984	344	1328
		% innerhalb von Phänotyp	59,2%	61,6%	59,8%
		% der Gesamtzahl	44,3%	15,5%	59,8%
	GC	Anzahl	571	180	751
		% innerhalb von Phänotyp	34,4%	32,3%	33,8%
		% der Gesamtzahl	25,7%	8,1%	33,8%
	CC	Anzahl	107	34	141
		% innerhalb von Phänotyp	6,4%	6,1%	6,4%
		% der Gesamtzahl	4,8%	1,5%	6,4%
Gesamt	Anzahl	1662	558	2220	
	% innerhalb von Phänotyp	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	74,9%	25,1%	100,0%	

Da bedingt durch die Zusammensetzung der Studienpopulation das Geschlechterverhältnis stark zugunsten der Mädchen verschoben ist und dies besonders innerhalb der Gruppe der normalgewichtigen Kinder vorkommt, kann eine Verschiebung der Allelverteilung durch einen möglichen Geschlechts-Bias bedingt sein. Aufgrund dessen wird eine Assoziation der drei SNPs innerhalb der beiden Geschlechtsgruppen gesondert geprüft.

3.2.2 Assoziationsuntersuchung zwischen den SNPs und dem Geschlecht

Untersucht wird, ob innerhalb einer Geschlechtsgruppe ein bestimmtes Allel mit Adipositas assoziiert ist. Es wird zweiseitig zwischen Jungen und Mädchen und innerhalb dieser Gruppen zwischen den beiden Phänotypen normalgewichtig und adipös geprüft. Einerseits wird der generelle Unterschied der Genotypverteilungen in Hinblick auf das Geschlecht untersucht und andererseits, ob ein Geschlecht durch ein bestimmtes Allel zur Adipositasentwicklung neigt.

Der SNP rs8111428

In dem folgenden Balkendiagramm 3.4 sind die Genotypverteilungen in Hinblick auf Phänotyp und Geschlecht prozentual dargestellt. Die Allelverteilung ist bei Mädchen und Jungen phänotypunabhängig ähnlich. Sowohl bei den Mädchen als auch bei den Jungen haben etwa $\frac{2}{3}$ der Kinder den Genotyp homozygot AA, $\frac{1}{4}$ der Kinder den Genotyp heterozygot AG und etwa $\frac{1}{12}$ der Kinder sind homozygot GG.

Vergleicht man die übergewichtigen ($n=64$) mit den normalgewichtigen Jungen ($n=234$), kommt der heterozygote Genotyp bei den übergewichtigen Jungen 1,38 mal häufiger vor als bei den normalgewichtigen Jungen: 34,6% vs. 25,0%. Dieser Unterschied ist bei den Mädchen nicht zu verzeichnen (30,9% vs. 32,0%). Allerdings ist dieses Ungleichgewicht bei den Jungen nicht wegweisend für ein Adipositas prädisponierendes Allel, da bei beiden homozygoten Formen jeweils die normalgewichtigen Jungen stärker vertreten sind (siehe Diagramm 3.4). Der χ^2 -Wert für die Gegenüberstellung der Genotypen von normalgewichtigen und adipösen Jungen beträgt 3,36 und entspricht einem p-Wert von 0,186 bei zwei Freiheitsgraden und ist somit nicht signifikant. Bei den Mädchen unterscheiden sich die Allelfrequenzen für beide Phänotypen höchstens um 1.1% bei den drei Genotypen, wobei zu vermerken ist, dass die beiden Phänotypgruppen sehr in ihrer Fallzahl divergieren: Es wurden die Allelfrequenzen von 347 adipösen mit denen von 1609 normalgewichtigen Mädchen verglichen. Der χ^2 -Wert der Gegenüberstellung der Allelfrequenzen der Mädchen in Abhängigkeit ihres BMI-SDS-Wertes ist mit einem Wert von 0,253, entsprechend einem p-Wert von 0,881 bei zwei Freiheitsgraden, ebenfalls nicht signifikant.

Der SNP rs2302382

Die Untersuchung der Geschlechtsabhängigkeit der Ausprägung des adipösen Phänotypen bei gegebenem Genotypen des SNPs rs2302382 umfasst in der Gruppe der Jungen 64 normalgewichtige und 234 adipöse Jungen. In der Gruppe der Mädchen wurden 1598 normalgewichtige mit 346 adipösen Mädchen verglichen.

Die Genotypverteilungen von Mädchen und Jungen unterscheiden sich in Bezug auf die

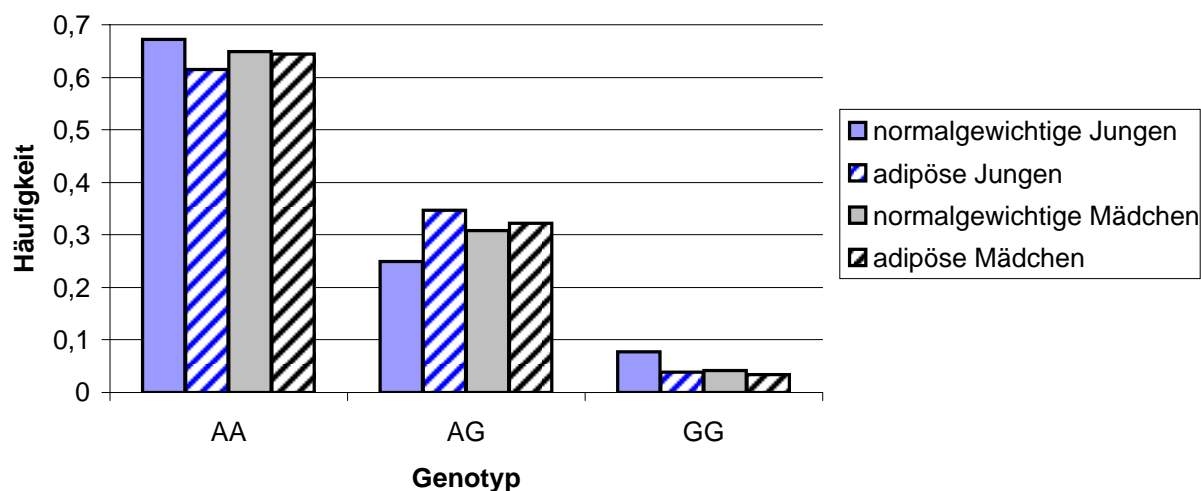


Abbildung 3.4: Genotypverteilungen des SNPs rs8111428 in Abhängigkeit des Geschlechts und des Phänotypen.

minimale Allelfrequenz von Adenin: Diese liegt phänotypunabhängig bei den Jungen bei 25,2% und bei den Mädchen bei 21,2%. Der Anteil AA-homozygoter Jungen ist insgesamt 1,67-mal so hoch wie der Anteil AA-homozygoter Mädchen (7,7% vs. 4,6%). Der p-Wert, der die Allelfrequenzverteilungen für den SNP phänotypunabhängig zwischen den beiden Geschlechtern beziffert, beträgt 0,048 und ist somit signifikant. Der Genotyp homozygot AA kommt darüber hinaus sowohl bei den normalgewichtigen Jungen als auch bei den normalgewichtigen Mädchen im Vergleich zu ihren Vergleichsgruppen häufiger vor (1,38- und 1,2-mal). Allerdings hält dieser Unterschied einer Signifikanzprüfung nicht stand: Die p-Werte für die beiden Geschlechtsgruppen betragen 0,55 und 0,60 respektiv für Jungen und Mädchen. Es kann somit ausschließlich von einem Trend gesprochen werden, dass der Genotyp homozygot AA eher präventiv für den adipösen Phänotypen ist.

Der SNP rs1800437

Für den SNP rs1800437 wurden die Genotypen von 64 normalgewichtigen mit denen von 226 adipösen Jungen verglichen und die Genotypen von 1598 normalgewichtigen Mädchen mit denen von 332 adipösen Mädchen. Auch bei diesem Vergleich der Allelfrequenzen konnte kein Hinweis auf Gruppenunterschiede gefunden werden, wie durch den p-Wert von 0,92

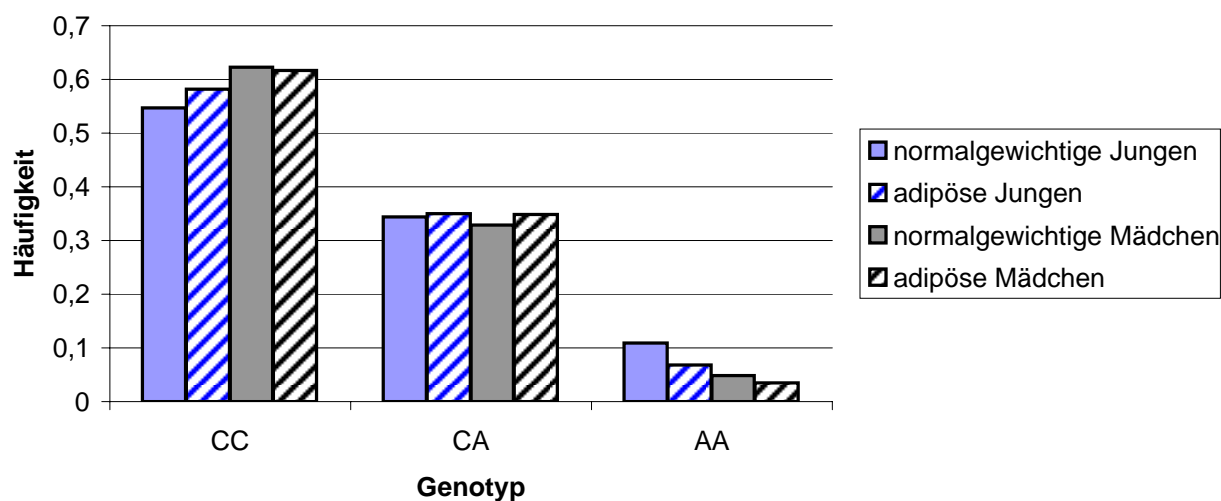


Abbildung 3.5: Genotypverteilungen des SNPs rs2302382 in Abhängigkeit des Geschlechts und des Phänotypen.

für die Jungen und durch den p-Wert von 0,66 für die Mädchen deutlich wird. In beiden Geschlechtsgruppen unterscheiden sich die Allelfrequenzen sowohl der normalgewichtigen als auch der übergewichtigen Kinder um nicht mehr als 2,6%. Allerdings fällt für diesen SNP auf, dass der Anteil heterozygoter Mädchen sowohl im adipösen als auch im normalgewichtigen Fall etwas höher ist als der Anteil heterozygoter Jungen: 34,7% vs. 26,6% im normalgewichtigen Fall und 34,3% vs. 29,2% im adipösen Fall. Die minimale Allelfrequenz zwischen den beiden Geschlechtern unterscheidet sich hingegen kaum: Die MAF für Cytosin beträgt für die Jungen 21,9% und die MAF für Cytosin der Mädchen beträgt 23,5%. Da innerhalb eines Geschlechts die beiden Phänotypen bei gegebenem Genotypen allerdings etwa gleich oft vorkommen, spielt dieser Unterschied keine Rolle bei der Gewichtsentwicklung. Die Grafik 3.6 stellt die Genotypverteilungen bildlich dar.

Es kann somit lediglich für den Marker rs2302382 ein Hinweis auf eine mögliche geschlechtsspezifische Allelverteilung zwischen den Allelfrequenzen gefunden werden. Der Genotyp homozygot AA kommt bei Jungen signifikant häufiger vor als bei Mädchen. Für die beiden anderen SNPs können weder signifikante Unterschiede der Genotypverteilungen zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden noch innerhalb der Geschlechter Unterschiede der Genotypverteilungen in Hinblick auf die Phänotypausbildung. Dies gilt auch für den SNP rs2302382.

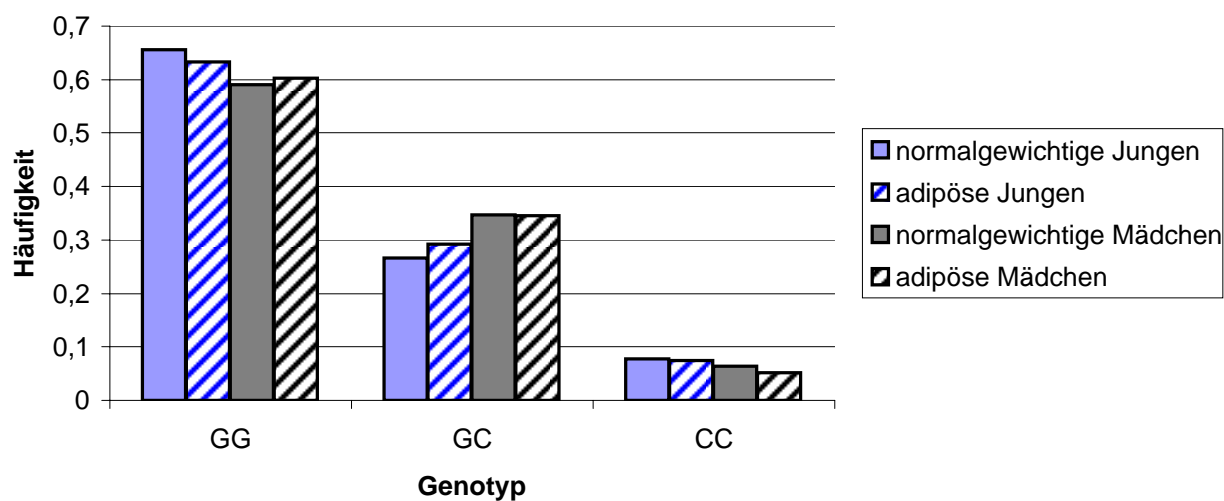


Abbildung 3.6: Genotypverteilungen des SNPs rs1800437 in Abhängigkeit des Geschlechts und des Phänotypen

In der Einleitung wurde bereits auf den Einfluss der ethnischen Herkunft und somit des genetischen Pools auf die Genotypverteilungen hingewiesen. Unterschiedliche ethnische Gruppen können mit spezifischen Allelverteilungen einhergehen. Da in dieser Studienpopulation rund 45% der Kinder einen Migrationshintergrund aufweisen, soll im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Migrationshintergrund und Genotypverteilung besteht, der mögliche Genotypunterschiede zwischen Gewichtsgruppen überlagern könnte.

3.2.3 Assoziationsuntersuchung zwischen den SNPs und der ethnischen Herkunft

Für die drei SNPs werden jeweils zwei Diagramme, die einerseits die normalgewichtigen und andererseits die adipösen Kinder repräsentieren, gegenübergestellt. Jeder Balken eines Diagramms stellt eine der gebildeten ethnischen Gruppen dar. Die Definition der verschiedenen ethnischen Gruppen ist im Abschnitt 3.1.3 beschrieben, die Gruppenstärken unterteilt nach dem Phänotypen sind in der Tabelle 3.4 aufgeführt.

Der SNP rs8111428

In den sechs verschiedenen ethnischen Gruppen sind die Genotypen der normalgewichtigen Kinder auf alle drei Genotypmöglichkeiten des SNPs rs8111428 in ähnlichen Frequenzen verteilt. Die Gruppe „nicht bekannt“ wurde nicht in die weiteren Auswertungen aufgenommen, da über diese Kinder keine hinreichenden Aussagen getroffen werden können. Die Gruppe „sonstige“ wurde in die Berechnungen aufgenommen. Wie aus dem Balkendiagramm 3.7 ersichtlich wird, sind im Durchschnitt 65,6% der Kinder homozygot AA, 30,2% der Kinder heterozygot AG und die übrigen 4,2% homozygot GG. Im Falle der adipösen Kinder fallen jedoch innerhalb der ethnischen Gruppen Unterschiede der Genotypverteilungen auf. Insbesondere bei den Kindern arabischen Ursprungs und denjenigen aus Ländern des ehemaligen Ostblocks weisen die übergewichtigen Kinder überdurchschnittlich hohe AG-Frequenzen im Vergleich zu ihren normalgewichtigen Vergleichsgruppen auf. Solche Unterschiede können allerdings auch aufgrund unpräziser Schätzungen basierend auf geringeren Fallzahlen erklärbar sein: Kinder arabischer Herkunft n=103 (normalgewichtig n=90; adipös n=13); Kinder aus Ländern des ehemaligen Ostblocks n=156 (normalgewichtig n=138; adipös n=18).

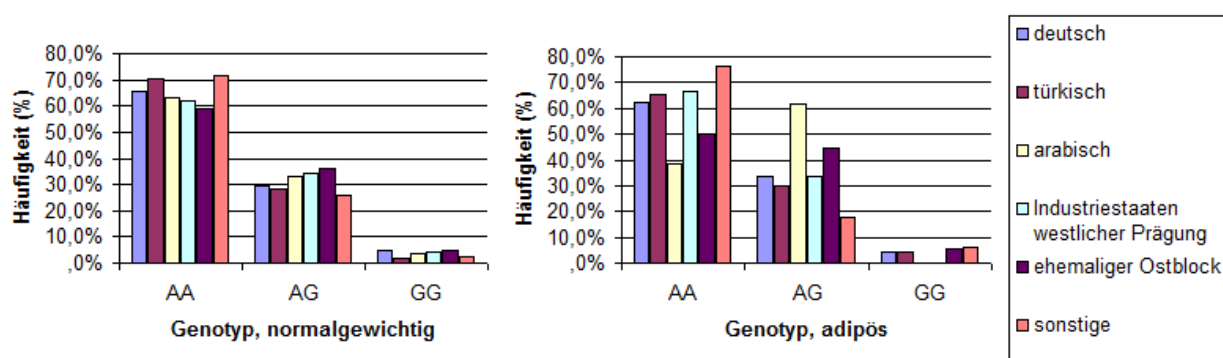


Abbildung 3.7: Genotyphäufigkeiten in Abhängigkeit der verschiedenen ethnischen Gruppen für den SNP rs8111428. Das linke Balkendiagramm stellt die normalgewichtigen Kinder dar, das rechte Balkendiagramm repräsentiert die adipösen Kinder.

Bei den Berechnungen des Chi²-Wertes nach Pearson, sowohl unterteilt zwischen den beiden Phänotypen als auch unterteilt nach den einzelnen ethnischen Gruppen, liegt keiner der entsprechenden p-Werte unter 0,05. Somit sind die zuvor genannten Unterschiede nicht signifikant.

Der SNP rs2302382

Auch für den SNP rs2302382 können keine signifikanten Unterschiede der Genotypverteilungen in Abhängigkeit des ethnischen Ursprungs nachgewiesen werden (alle p-Werte bei zwei Freiheitsgraden liegen über 0,05). Bei den Kindern arabischer Herkunft bildet der heterozygote Genotyp in der Gruppe der adipösen Kinder mit 53,8% den mit Abstand häufigsten Genotypen und ist damit fast doppelt so häufig vertreten wie in der normalgewichtigen Vergleichsgruppe. Allerdings kann auch in diesem Fall der sichtbare Unterschied bei den Kindern arabischen Ursprungs durch die geringere Stichprobenzahl bedingt sein. Der p-Wert aus dem Vergleich der normalgewichtigen mit den adipösen arabischen Kindern beträgt 0,13.

Des Weiteren fällt auf, dass die Kinder aus den Staaten des ehemaligen Ostblocks in der Gruppe der normalgewichtigen Kinder überdurchschnittlich häufig heterozygot sind im Vergleich zu Kindern mit demselben Phänotypen anderer ethnischer Herkünfte. Die minimale Allelfrequenz beträgt für die normalgewichtigen Kinder aus den Staaten des ehemaligen Ostblocks 24,3% und für die Vergleichsgruppe 23,5%. Dieser Unterschied ist allerdings ebenfalls nicht signifikant.

Im Vergleich der beiden ethnischen Gruppen *deutsch* und *türkisch* fällt auf, dass in beiden Phänotypgruppen die MAF für Adenin bei den Kindern deutscher Herkunft höher ist: 21,2% zu 18,4% in der Gruppe der normalgewichtigen und 24,4% zu 21,2% in der Gruppe der übergewichtigen Kinder. Diese Unterschiede sind zwar nicht signifikant, allerdings ist ein leichter Trend zu beobachten. Diese Auffälligkeit kann durch einen anderen Genpool der östlichen Mittelmeerregion bedingt sein, der somit zu einer Verschiebung der Allelverteilungen führt.

Das Diagramm 3.8 stellt die Verteilung der Kinder innerhalb der ethnischen Gruppen graphisch dar.

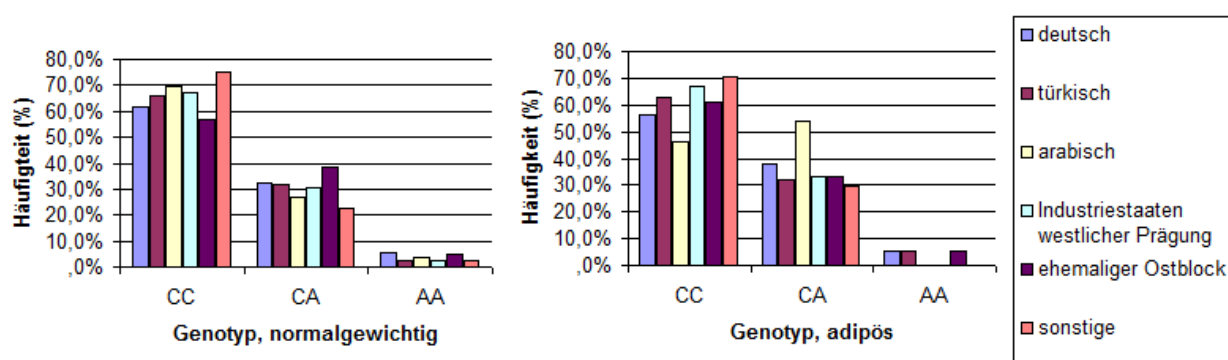


Abbildung 3.8: Genotyphäufigkeiten in Abhängigkeit der verschiedenen ethnischen Gruppen für den SNP rs2302382, das linke Balkendiagramm stellt die normalgewichtigen Kinder dar. Das rechte Balkendiagramm repräsentiert die adipösen Kinder.

Der SNP rs1800437

Wie auch für die beiden SNPs rs8111428 und rs2032382 findet man eine recht homogene Frequenzverteilung der drei möglichen Genotypen in der Gruppe der normalgewichtigen Kinder und ein heterogeneres Bild bei den adipösen Kindern. Auch in diesem Fall kann die Heterogenität durch geringe Fallzahlen zu erklären sein. Im Vergleich zwischen den beiden Phänotypgruppen der arabischen Kinder fällt auf, dass die adipösen Kinder 0,3-mal häufiger den Genotyp homozygot GG haben als die der Vergleichsgruppe. Allerdings können auch hierbei geringe Fallzahlen und die damit verbundene Ungenauigkeit der Schätzung eine Erklärung sein: Es wurden 91 normalgewichtige mit 12 adipösen Kindern verglichen.

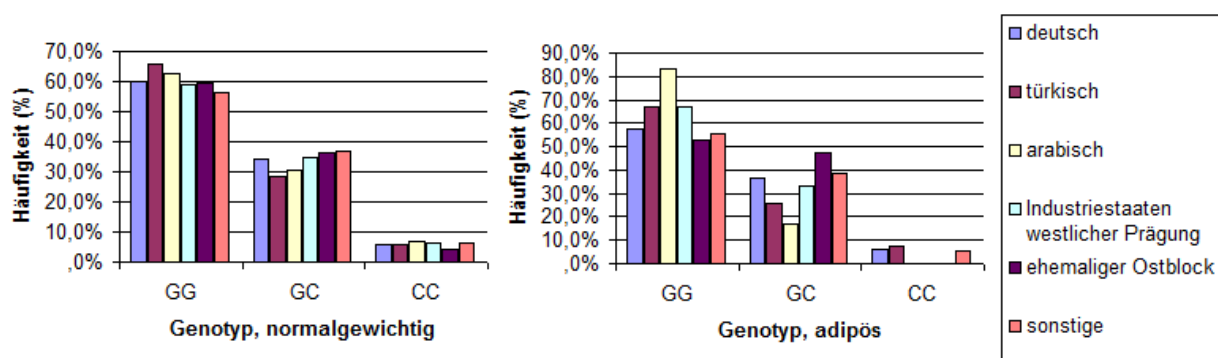


Abbildung 3.9: Genotyphäufigkeiten in Abhängigkeit der verschiedenen ethnischen Gruppen für den SNP rs1800437. Das linke Balkendiagramm stellt die normalgewichtigen Kinder dar, das rechte Balkendiagramm repräsentiert die adipösen Kinder.

3.2.4 Multiple lineare Regression

Die Berechnungen der multiplen linearen Regression, die den Einfluss der drei untersuchten SNPs, des Geschlechtes und der verschiedenen ethnischen Gruppen auf die abhängige Variable BMI-SDS untersuchen, zeigt ausschließlich signifikante Assoziationen zwischen der Zugehörigkeit einer bestimmten ethnischen Gruppe und der BMI-Standardabweichung. Danach haben Kinder mit türkischer und arabischer Herkunft und Kinder aus den ehemaligen Ostblockstaaten signifikant höhere BMI-SDS-Werte als deutsche Kinder (p-Wert $\leq 0,00$; 0,039 und 0,011 respektiv). Dies spiegelt erneut die Ergebnisse epidemiologischer Studien wider, wonach Kinder mit Migrationshintergrund adipöser sind als deutsche Kinder [61]. Festzuhalten bleibt, dass dieser Effekt im Rahmen der linearen Regression unabhängig von den möglichen Effekten der drei untersuchten SNPs ist (p-Werte jeweils über 0,05).

3.3 Auswertungen des HOMA-IR-Werts

Da das Glukose-abhängige insulinotropische Peptid und sein Rezeptor eine modulierende Wirkung auf den Insulinstoffwechsel haben, ist es interessant zu untersuchen, ob es eine Assoziation zwischen den drei untersuchten Single Nukleotid Polymorphismen und dem Homeostase Assessment Model für Insulinresistenz - Wert bei Kindern gibt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, drückt der HOMA-IR-Wert eine gestörte Insulinresistenz aus, welche ein Vorbote einer Typ II Diabetes mellitus Erkrankung ist.

3.3.1 Assoziationsuntersuchung zwischen dem HOMA-IR-Wert und der BMI-SDS

Es liegen lediglich für die adipösen Kinder HOMA-IR-Werte vor, sodass keine Untersuchung der Assoziation zwischen dem HOMA-IR-Wert und den Phänotypgruppen vorgenommen werden kann. Die Abbildung 3.10 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen den HOMA-IR-Werten und der BMI-SDS der adipösen Kinder.

Es kann eine leichte Abhängigkeit zwischen der BMI-SDS und dem HOMA-IR-Wert festgestellt werden. Die Regressionsgerade hat allerdings nur einen sehr geringen Koeffizienten (0,019).

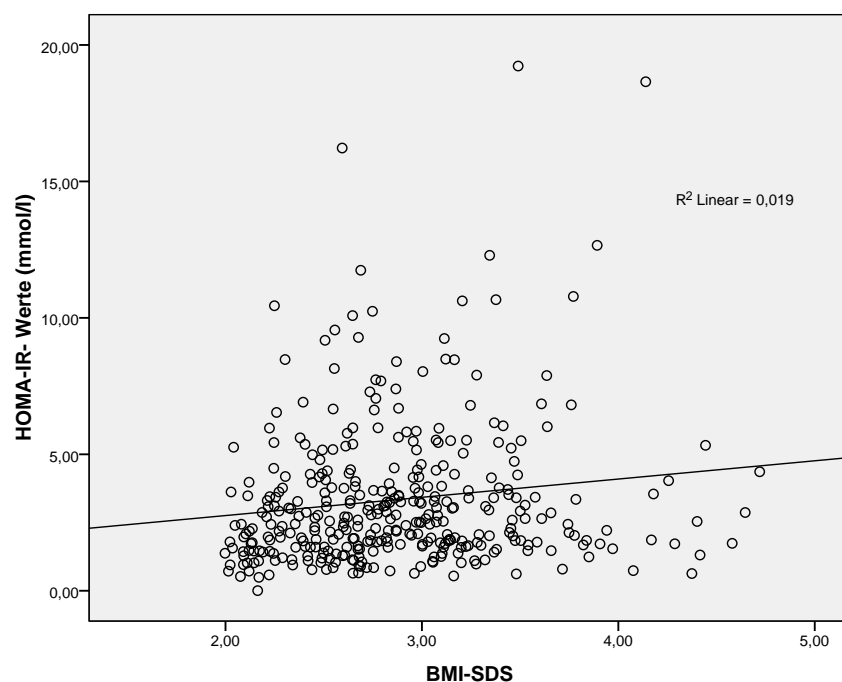


Abbildung 3.10: Streudiagramm: Verteilung der erfassten HOMA-IR-Werte in Abhängigkeit der BMI-SDS.

3.3.2 Assoziationsuntersuchung zwischen dem HOMA-IR-Wert und den Polymorphismen

Unter den Kindern, die eine erhöhte BMI-SDS haben und für die ein HOMA-IR-Wert berechnet worden ist, wird unterschieden zwischen den Kindern, deren HOMA-IR-Werte oberhalb der 95. Perzentile liegt, und denjenigen, deren HOMA-IR-Werte unterhalb der 95. Perzentile liegt. Berechnet werden die Perzentilenwerte nach den Beschreibungen von Allard und Mitarbeitern aus dem Jahre 2003 [4].

Es können keine Assoziationen zwischen dem HOMA-IR-Wert und den beiden SNPs rs8111428 und rs2302382 gefunden werden (p-Werte von 0,89 und 0,39). Allerdings liegt eine signifikante Assoziation mit einem p-Wert von 0,002 zwischen dem SNP rs1800437 und einem HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile vor.

Kinder, die den Genotypen homozygot CC für den SNP rs1800437 aufweisen, haben häufiger einen HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile als Kinder mit einem anderen Genotypen. Der Einfluss des Allels Cytosin scheint jedoch nur dann relevant zu sein, wenn es

in der homozygoten Form vorliegt, da die Kinder mit dem heterozygoten Genotypen 1,3-mal häufiger den Phänotypen mit dem geringeren HOMA-IR-Wert aufweisen. Die Tabellen 3.11, 3.12 und 3.13 führen die Ergebnisse der Analyse auf.

Tabelle 3.11: Gegenüberstellung rs8111428 und HOMA-IR-Wert: Aufgeführt sind die Fallzahlen und die prozentualen Häufigkeiten des HOMA-IR Status' bei gegebenem Genotyp.

			HOMA-IR Status		Gesamt
			unter der 95. Perzentile	über der 95. Perzentile	
rs8111428	AA	Anzahl	116	106	222
		% innerhalb von HOMA-IR Status	61,4%	63,9%	62,5%
		% der Gesamtzahl	32,7%	29,9%	62,5%
	AG	Anzahl	66	54	120
		% innerhalb von HOMA-IR Status	34,9%	32,5%	33,8%
		% der Gesamtzahl	18,6%	15,2%	33,8%
	GG	Anzahl	7	6	13
		% innerhalb von HOMA-IR Status	3,7%	3,6%	3,7%
		% der Gesamtzahl	2,0%	1,7%	3,7%
Gesamt	Anzahl	189	166	355	
	% innerhalb von HOMA-IR Status	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	53,2%	46,8%	100,0%	

Tabelle 3.12: Gegenüberstellung rs2302382 und HOMA-IR-Wert: Aufgeführt sind die Fallzahlen und die prozentualen Häufigkeiten des HOMA-IR Status' bei gegebenem Genotyp.

			HOMA-IR Status		Gesamt
			unter der 95. Perzentile	über der 95. Perzentile	
rs2302382	CC	Anzahl	111	105	216
		% innerhalb von HOMA-IR Status	58,7%	63,3%	60,8%
		% der Gesamtzahl	31,3%	29,6%	60,8%
	CA	Anzahl	71	52	123
		% innerhalb von HOMA-IR Status	37,6%	31,3%	34,6%
		% der Gesamtzahl	20,0%	14,6%	34,6%
	AA	Anzahl	7	9	16
		% innerhalb von HOMA-IR Status	3,7%	5,4%	4,5%
		% der Gesamtzahl	2,0%	2,5%	4,5%
Gesamt	Anzahl	189	166	355	
	% innerhalb von HOMA-IR Status	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	53,2%	46,8%	100,0%	

Tabelle 3.13: Gegenüberstellung rs1800437 und HOMA-IR-Wert: Aufgeführt sind die Fallzahlen und die prozentualen Häufigkeiten des HOMA-IR Status' bei gegebenem Genotyp.

			HOMA-IR Status		Gesamt
			unter der 95. Perzentile	über der 95. Perzentile	
rs1800437	GG	Anzahl	106	92	198
		% innerhalb von HOMA-IR Status	58,2%	59,4%	58,8%
		% der Gesamtzahl	31,5%	27,3%	58,8%
	GC	Anzahl	72	46	118
		% innerhalb von HOMA-IR Status	39,6%	29,7%	35,0%
		% der Gesamtzahl	21,4%	13,6%	35,0%
	CC	Anzahl	4	17	21
		% innerhalb von HOMA-IR Status	2,2%	11,0%	6,2%
		% der Gesamtzahl	1,2%	5,0%	6,2%
Gesamt	Anzahl	182	155	337	
	% innerhalb von HOMA-IR Status	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	54,0%	46,0%	100,0%	

3.4 Auswertung der Haplotypen

In diesem Abschnitt wird untersucht, ob eine Assoziation zwischen den verschiedenen Haplotypen und den Parametern BMI-SDS, Geschlecht, ethnische Herkunft und HOMA-IR-Wert vorliegt.

Die Abbildung 3.14 stellt die Entstehungsmöglichkeiten der Multilokus-Genotypen durch die in Frage kommenden Haplotypen dar. Die oberste Zeile stellt den SNP rs8111428 mit seinen beiden möglichen Basen G und A dar. Die zweite Zeile stellt den SNP rs2302382 mit den beiden Allelen C und A dar und die dritte Zeile repräsentiert den SNP rs1800437 (Allele G und C). In der Tabelle ist der Übergang von Haplotypen zu Multilokus-Genotypen dargestellt. Die Ziffer 1 kodiert den Fall homozygot Wildtypallel, 2 entspricht dem Fall heterozygot und die 3 repräsentiert den Multilokus-Genotypen homozygot selteneres Allel (z.B.: Der Code 123 entspricht dem Multilokus-Genotyp ACC (Chromosom 1) und AAC (Chromosom 2)).

		Haplotyp 2		A				G			
				C		A		C		A	
				G	C	G	C	G	C	G	C
Haplotyp 1				ACG	ACC	AAG	AAC	GCG	GCC	GAG	GAC
		A	C	G	ACG	111	112	121	122	211	212
C	ACC			112	113	122	123	212	213	222	223
A	G		AAG	121	122	131	132	221	222	231	232
	C		AAC	122	123	132	133	222	223	232	233
G	C	G	GCG	211	212	221	222	311	312	321	322
		C	GCC	212	213	222	223	312	313	322	323
	A	G	GAG	221	222	231	232	321	322	331	332
		C	GAC	222	223	232	233	322	323	332	333

Abbildung 3.14: Multilokus-Genotypentstehung: Durch die beiden Chromosomen können die in der Tabelle aufgeführten Multilokus-Genotypen entstehen. Fettgedruckt sind die Multilokus-Genotypen, die zusammen mehr als 95% aller in dieser Studie vorkommende Multilokus-Genotypen ausmachen.

Anhand von drei SNPs mit je zwei Allelmöglichkeiten können theoretisch 36 mögliche Haplotypenpaare durch die beiden Chromosomen entstehen ($\binom{n=8}{i=1} \sum \frac{n*(n+1)}{2}$), wobei 2^3 der Anzahl an Haplotypen entspricht, die es mit drei SNPs auf einem Chromosom geben kann. Anhand der 36 möglichen Haplotypenpaare könnten 3^3 (27) mögliche Genotypen entstehen. Es entstehen weniger Multilokus-Genotypen als mögliche Haplotypenpaare, da einige Paare zu demselben Genotypen führen.

In dieser Studie werden insgesamt 24 verschiedene Genotypen gefunden. Sie sind in der Tabelle 3.16(a) aufgeführt. Die Genotypen 233, 312 und 313 kommen in dieser Studie nicht vor. Fünf der gefundenen Genotypen weisen jeweils eine Frequenz von über 5% auf. Zehn Genotypen machen unter sich über 95% der vorkommenden Varianten aus, sie sind in der Abbildung 3.14 fettgedruckt. Die Tatsache, dass in dieser Studie nicht alle theoretisch möglichen Genotypen gefunden wurden, liegt unter anderem an der minimalen Allelfrequenz der selteneren Allele. Eine geringe MAF bedeutet, dass diese SNP-Form selten in einer Bevölkerung vorkommt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kind zum Beispiel für die drei untersuchten SNPs jeweils homozygot für das seltenere Allel ist, ist unter Annahme der Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes ($P = MAF_{Allel1} * MAF_{Allel2} * MAF_{Allel3}$) sehr gering.

Anhand der Informationen der Genotypen kann für alle Formen, die für höchstens ein SNP heterozygot sind, auf die Haplotypkonstellation der beiden Chromosomen rückgeschlossen werden. Bei Multilocus-Genotypen, die für mehr als einen SNP heterozygot sind, können die zugrundeliegenden Haplotypen nicht eindeutig ermittelt werden. Liegen auch Informationen zu den Genotypen der Eltern vor, ist es möglich, für mehrere kindliche Haplotypen eindeutige Lösungen zu ermitteln. Jedoch wurden in dieser Studie die Genotypen der Eltern nicht erhoben, sodass die eindeutige Zuordnung nur bei Kindern erfolgen kann, für deren Genotypen nur ein Haplotyp in Frage kommt. Von den 27 möglichen Multilokus-Genotypen kommen in dieser Studie 18 Genotypen vor, die klar definiert werden können, sieben Genotypen können aufgrund der Heterozygotie der Haplotypen nicht definiert werden (122, 212, 221, 222, 223, 232 und 322). Die Tabelle 3.16(b) führt alle gefundenen Haplotypen mit ihren jeweiligen Frequenzen auf.

Von 99 Kindern können keine Haplotypenkonstellation erstellt werden, da für mindestens einer der drei SNPs der Genotyp nicht bekannt ist.

Es können weder Assoziationen zwischen Haplotypen und BMI-SDS noch Assoziationen zwischen einem bestimmten Haplotypen und einer bestimmten ethnischen Herkunft festgestellt werden.

Allerdings gibt es signifikante Assoziationen zwischen dem HOMA-IR-Wert über der 95. Perzentile und der Haplotypverteilung und zwischen dem Geschlecht und der Haplotypverteilung (p-Werte 0,007 und 0,028).

Tabelle 3.15: Erhobene Genotyp- und Haplotyphäufigkeiten dieser Studie. „unklar“ subsummiert all die Haplotypkonstellationen, die für mehr als einen SNP heterozygot sind.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	111	680	29,8	31,1	31,1
	112	461	20,2	21,1	52,3
	113	108	4,7	4,9	57,2
	121	82	3,6	3,8	61,0
	122	51	2,2	2,3	63,3
	123	7	,3	,3	63,6
	131	7	,3	,3	63,9
	132	4	,2	,2	64,1
	133	2	,1	,1	64,2
	211	46	2,0	2,1	66,3
	212	32	1,4	1,5	67,8
	213	4	,2	,2	68,0
	221	386	16,9	17,7	85,7
	222	185	8,1	8,5	94,1
	223	9	,4	,4	94,5
	231	26	1,1	1,2	95,7
	232	5	,2	,2	96,0
	311	2	,1	,1	96,1
	321	16	,7	,7	96,8
	322	2	,1	,1	96,9
	323	3	,1	,1	97,0
	331	57	2,5	2,6	99,6
	332	4	,2	,2	99,8
	333	4	,2	,2	100,0
Gesamt		2183	95,7	100,0	
Fehlend	System	97	4,3		
Gesamt		2280	100,0		

(a) Genotypen Häufigkeiten

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	ACC + ACC	680	29,8	31,2	31,2
	ACG + ACC	461	20,2	21,1	52,3
	ACC + ACC	108	4,7	5,0	57,3
	ACG + AAG	82	3,6	3,8	61,0
	unklar	670	29,4	30,7	91,7
	ACC + AAC	7	,3	,3	92,1
	AAG + AAG	7	,3	,3	92,4
	AAG + AAC	4	,2	,2	92,6
	AAC + AAC	2	,1	,1	92,7
	ACG + GCG	46	2,0	2,1	94,8
	ACC + GCC	4	,2	,2	95,0
	AAG + GAG	26	1,1	1,2	96,1
	GCG + GCG	2	,1	,1	96,2
	GAG + GCG	13	,6	,6	96,8
	GAG + GGG	1	,0	,0	96,9
	GAC + GCC	3	,1	,1	97,0
	GAG + GAG	57	2,5	2,6	99,6
	GAC + GAG	4	,2	,2	99,8
	GAC + GAC	4	,2	,2	100,0
Gesamt		2181	95,7	100,0	
Fehlend	System	99	4,3		
Gesamt		2280	100,0		

(b) Haplotypen Häufigkeiten

3.4.1 Assoziationsuntersuchung zwischen HOMA-IR-Wert und der Haplotypverteilung

Für die Assoziationsuntersuchung zwischen HOMA-IR-Wert und Haplotypen werden die Genotypen von 182 Kindern mit einem HOMA-IR-Wert unter den 95. Perzentile mit 153 Kindern mit einem HOMA-IR-Wert ab der 95. Perzentile verglichen. Die Tabelle 3.16 summiert die Verteilung des HOMA-IR-Status auf die Genotypen auf.

Von den 24 zuvor ermittelten Haplotypmöglichkeiten finden sich nur acht verschiedene und 5 „unklare“ Ausprägungen bei den Kindern, für die ein HOMA-IR-Wert bestimmt worden ist, wieder.

Es zeigt sich, dass Kinder mit einem HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile 10,5 mal häufiger die beiden Haplotypen ACC + ACC aufweisen ($p = 0,007$). Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob dieser Effekt ausschließlich durch den Genotypen

des SNPs rs1800437 entsteht oder ob es sich um einen additiven Effekt durch die Haplotypkonstellation handelt. Da ausschließlich die Haplotypkonstellationen ACC + ACC und GAC + GAC unter den erhobenen Haplotypen mit der Variante homozygot CC für den SNP rs1800437 vorkommen und die Konstellation GAC + GAC nur bei einem einzigen Kind besteht, reicht diese Erhebung nicht aus, um tragfähige Schlüsse zu ziehen. Es ist somit nur festzuhalten, dass sowohl das Allel Cytosin des SNPs rs1800437 in homozygoter Form als auch der Haplotyp, der die drei SNPs umfasst, bei dem ebenfalls der SNP rs1800437 in der Form homozygot CC vorliegt, mit einem HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile assoziiert sind.

Tabelle 3.16: Verteilung des HOMA-IR-Werts nach Haplotypkonstellation

			HOMA-IR Status		Gesamt
			unter der 95. Perzentile	über der 95. Perzentile	
haplo_typ	TGG + TGG	Anzahl	55	39	94
		% innerhalb von HOMA-IR Status	30,2%	25,5%	28,1%
		% der Gesamtzahl	16,4%	11,6%	28,1%
	TGG + TGC	Anzahl	44	30	74
		% innerhalb von HOMA-IR Status	24,2%	19,6%	22,1%
		% der Gesamtzahl	13,1%	9,0%	22,1%
	TGC + TGC	Anzahl	2	16	18
		% innerhalb von HOMA-IR Status	1,1%	10,5%	5,4%
		% der Gesamtzahl	,6%	4,8%	5,4%
	TGG + TTG	Anzahl	5	6	11
		% innerhalb von HOMA-IR Status	2,7%	3,9%	3,3%
		% der Gesamtzahl	1,5%	1,8%	3,3%
unklar		Anzahl	67	50	117
		% innerhalb von HOMA-IR Status	36,8%	32,7%	34,9%
		% der Gesamtzahl	20,0%	14,9%	34,9%
	TGG + CGG	Anzahl	2	4	6
		% innerhalb von HOMA-IR Status	1,1%	2,6%	1,8%
		% der Gesamtzahl	,6%	1,2%	1,8%
	TTG + CTG	Anzahl	0	3	3
		% innerhalb von HOMA-IR Status	,0%	2,0%	,9%
		% der Gesamtzahl	,0%	,9%	,9%
	CTG + CTG	Anzahl	6	5	11
		% innerhalb von HOMA-IR Status	3,3%	3,3%	3,3%
		% der Gesamtzahl	1,8%	1,5%	3,3%
	CTC + CTC	Anzahl	1	0	1
		% innerhalb von HOMA-IR Status	,5%	,0%	,3%
		% der Gesamtzahl	,3%	,0%	,3%
Gesamt		Anzahl	182	153	335
		% innerhalb von HOMA-IR Status	100,0%	100,0%	100,0%
		% der Gesamtzahl	54,3%	45,7%	100,0%

3.4.2 Assoziationsuntersuchung zwischen dem Geschlecht und der Haplotypverteilung

Für diese Untersuchung wurden die Genotypen von 287 Jungen mit denen von 1891 Mädchen verglichen. Es wurden 18 verschiedene Haplotypkonstellationen gefunden und die bereits erwähnten sieben Paare, die für mehr als einen SNP heterozygot sind und die somit nicht weiter aufgeschlüsselt werden können. Die Berechnung des Chi^2 - Wertes nach Pearson zeigt eine signifikante Assoziation zwischen den Haplotypen und dem Geschlecht (p -Wert = 0,028). Es können sinnvollerweise nur die Haplotypen ausgewertet werden, die in ihrer Gesamtfrequenz mehr als fünf Prozent ausmachen, da sonst die Fallzahlen der Kinder, die Träger dieser Haplotypen sind, zu gering sind (siehe Abbildung 3.14). Mädchen weisen 1,2-mal häufiger die Haplotypkonstellation $\text{ACG} + \text{ACC}$ und 1,3-mal häufiger die Konstellation $\text{ACC} + \text{ACC}$ auf als Jungen ($n=680$ und $n=108$ respektiv). Diese hingegen sind 2,4 mal so häufig $\text{AAG} + \text{GAG}$ - Träger ($n=26$). Die übrigen Haplotypkonstellationen kommen bei beiden Geschlechtern etwa gleich häufig vor. Es scheint, als ob Haplotyppaare, die mit dem Genotyp homozygot CC für den SNP rs1800437 einhergehen, bei den Mädchen häufiger vorkommen als bei den Jungen. Dies kann allerdings nicht anhand der weiteren Haplotypkonstellationen, die ebenfalls mit dem Genotyp CC für den dritten SNP einhergehen, bestätigt werden, da dort die verglichenen Fallzahlen zu gering sind ($\text{GAC} + \text{GAC}$: $n=4$; $\text{GAC} + \text{GCC}$: $n=3$; $\text{ACC} + \text{GCC}$: $n=4$; $\text{AAC} + \text{AAC}$: $n=2$). Die geringen Fallzahlen entstehen vor allem dadurch, dass die MAF für Cytosin des SNPs rs1800437 in dieser Studie nur 17,5% beträgt und somit die Anzahl der Kinder, die homozygot CC für dieses Allel sind, insgesamt gering ist.

Kapitel 4

Diskussion

Die 2007 in Essen durchgeführte Assoziationsstudie an 17 050 deutschen Erwachsenen und Kindern konnte eine Assoziation zwischen dem Single Nukleotid Polymorphismus rs2302382 des Gens für den Rezeptor des Glukose-abhängigen insulinotropischen Peptids (GIPR) nachweisen. Die Rolle des GIPR bei der Entstehung von Adipositas wurde bereits vielfach aufgezeigt [77, 26, 42, 33]. Eine Veränderung des GIPR, die zu einer Unterbrechung des GIP-GIPR-Signalweges führt, verhindert im Mausmodell die Entwicklung einer diätinduzierten Adipositas [62].

Das Ziel der vorgelegten Arbeit ist die Überprüfung der Assoziation zwischen Adipositas im Kindesalter, gemessen an der BMI-Standardabweichung oberhalb von 2,0 und den drei SNPs rs8111428, rs2302382 und rs1800437 des GIPR-Gens, die in der Essener Studie von Vogel und Mitarbeitern auf eine Assoziation mit Adipositas hin untersucht wurden. Des Weiteren wird die Assoziation zwischen diesen drei SNPs und den Parametern Geschlecht, ethnische Herkunft und Homeostase Assessment Model für Insulinresistenz -Wert oberhalb der 95. Perzentile überprüft. Abschließend wird untersucht, inwiefern eine Assoziation zwischen den genannten Parametern und den in dieser Studie erhobenen Haplotypen besteht.

4.1 Studienpopulation

4.1.1 Alters-Bias

In dieser Studie wurden 2280 Kinder untersucht. Einer der Hauptbeweggründe die Studie an Kindern durchzuführen ist, dass mit geringerem Alter die Umwelteinflüsse auf die Kinder noch geringer sind als bei Erwachsenen und daher angenommen wird, dass somit bei den Kindern das Ausmaß des genetischen Einfluss im Vergleich zu dem der Umwelt entscheidender ist. Allerdings geht dies mit der Unsicherheit einher, ob die Kinder, die zum Zeitpunkt der Studie normalgewichtig sind, es auch in Zukunft bleiben.

Rolland-Cachera und ihre Mitarbeiter konnten 1984 zeigen, dass die Adipositasentwicklung eines Kindes signifikant anhand des Umschlags der BMI-Verlaufskurve vorhergesagt werden kann [76]. Kinder, die um das 6. Lebensjahr nicht adipös sind, ungeachtet dessen, wie ihre BMI-Werte im Kleinkindalter waren, bleiben auch im Verlauf der weiteren Entwicklung schlank. Da das Durchschnittsalter der normalgewichtigen Kinder der Kontrollgruppe 12,3 Jahre beträgt, kann, unter Zugrundelegung der Arbeit von Rolland-Cachera, davon ausgegangen werden, dass diese Kinder schlank bleiben. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Kinder der adipösen Gruppe, die zum Zeitpunkt der Studie jünger als 6 Jahre waren, nicht wieder an Gewicht verlieren. Allerdings liegen auch hier sowohl das Durchschnittsalter als auch der Median für das Alter dieser Gruppe bei 10,96 und 11,4 Jahren, sodass diese Unsicherheit zwar besteht, aber nicht für die Mehrheit der Kinder dieser Studie zutrifft.

Unabhängig von der Studie von Rolland-Cachera haben jedoch viele neuere epidemiologische Studien gezeigt, dass die Zahlen der übergewichtigen und adipösen Kinder mit Eintritt in die Pubertät ansteigen [51]. Dies kann unter anderem daran liegen, dass im Laufe der letzten 20 Jahre Veränderungen des Lebensstils der Kinder dazu beitragen, dass diese im Pubertätsalter weitere Gewichtsveränderungen durchleben. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass im Verlauf der Entwicklung sowohl der Kinder der normalgewichtigen als auch der Kinder der adipösen Gruppe noch erhebliche Gewichtsveränderungen stattfinden werden.

4.1.2 Phänotypgruppendifinitions-Bias

Die Adipositasgrenzwerte von Kromeyer-Hauschild von 2001, die die Grundlage der Unterteilung in die beiden Phänotypgruppen normalgewichtig und adipös bildet, wurde vornehmlich an den anthropometrischen Daten deutscher Kinder berechnet. In dieser Studie wurde diese Definition allerdings auch für die Kinder nicht deutscher Herkunft angewandt. Es ist umstritten, ob ein und derselbe Cut-off Wert für die Adipositasdefinition Kinder unterschiedlicher Herkunft angenommen werden kann [76]. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die genetischen Marker, die den BMI und somit die BMI-SDS determinieren, innerhalb unterschiedlicher ethnischer Gruppen divergieren und somit von vornherein unterschiedliche BMI- Werte und BMI-SDS unter den Kindern verschiedener ethnischer Gruppen vorliegen, kann eine Anwendung der Adipositasdefinition für nicht deutsche Kinder zu Verfälschungen der Daten führen [71]. Diese mögliche Ungenauigkeit kann für diese Studie allerdings vernachlässigt werden, da auch die Berechnungen mit niedrigeren und höheren Cut-off Werten (BMI-SDS 1,5 und BMI-SDS 2,5) zu keinen signifikanten Assoziationen führen.

4.1.3 Geschlechts-Bias

Eine weitere Auffälligkeit stellt die Geschlechtsverteilung innerhalb der beiden Phänotypgruppen dar. Besteht eine Assoziation zwischen den beiden Geschlechtern und den drei untersuchten SNPs, muss diese zu einer Verfälschung der Untersuchung führen, wenn, wie in dem Fall dieser Studie, 96,3% der Kinder der normalgewichtigen Gruppe weiblich sind und hingegen nur 59,6% der adipösen Kinder weiblich sind. Für die beiden SNPs rs8111428 und rs1800437 konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen im phänotypunabhängigen Vergleich der beiden Geschlechter gefunden werden. Somit kann für diese beiden SNPs ein Geschlechts-Bias der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Im Fall des SNPs rs2302382 konnte mit einem p-Wert von 0,045 zwar eine signifikante Assoziation zwischen dem Geschlecht und den Allelverteilungen gefunden werden - Jungen haben häufiger als Mädchen den Genotyp homozygot AA -, allerdings wurden in der zweizeitigen Analyse,

die sowohl unter den Geschlechtern als auch unter den beiden Phänotypen unterscheidet, keine Ungleichheiten der Allelverteilungen mehr nachgewiesen. Auch ist der Unterschied der minimalen Allelfrequenz für den SNP rs2302382 für die beiden Geschlechter so gering (25,2% zu 21,2%), dass er bei der Assoziationsuntersuchung zwischen den Allelfrequenzen und dem Phänotypen, ohne geschlechtsspezifische Trennung, zu keinen signifikanten Ergebnissen führt, sondern lediglich eine leicht höhere MAF für Adenin bei den übergewichtigen Kindern (die prozentual mehr Jungen umfassen) verursacht.

4.1.4 Stratifikations-Bias

In dieser Studie wurden, um der Heterogenität der Studienpopulation gerecht zu werden und um eine genauere Auswertung der erhobenen Daten zu ermöglichen, sechs verschiedene ethnische Gruppen gebildet, in welche die Kinder je nach Herkunftsland der Eltern eingeteilt wurden. Diese Einteilung geht jedoch zwangsläufig zu Lasten der Fallzahl innerhalb der entstandenen Gruppen. Durch die dazu kommende Unterteilung der Studienpopulation in die beiden Phänotypgruppen, sind für einige Untergruppen die Fallzahlen so weit gesunken, dass eine sinnvolle, aussagekräftige Analyse kaum möglich ist. Zweierlei Gründe rechtfertigen allerdings diese Unterteilung: Einerseits ist die ethnische Differenzierung notwendig, um Stratifizierungseffekte der Studie auszuschließen [71] und andererseits, um Unterschiede der Allelfrequenzen innerhalb der ethnischen Gruppen aufzuzeigen.

Wie in den Ergebnissen beschrieben, weist diese Studie unterschiedliche ethnische Zusammensetzungen der beiden Phänotypgruppen auf.

Da bekannt ist, dass Genmarker eines bestimmten Lokus' innerhalb verschiedener ethnischen Gruppen in ihrer Allelfrequenz divergieren [71], muss ausgeschlossen werden, dass die untersuchten SNPs nicht allein aufgrund divergierender Frequenzen innerhalb der ethnischen Gruppen - und somit der beiden Phänotypgruppen - zu falschen Frequenzerfassungen führen. So kann zum Beispiel die Tatsache, dass die Kinder türkischer Herkunft häufiger Träger des Allels Adenin für den Marker rs2302382 sind, dadurch bedingt sein, dass in der Bevölkerung rund um das Mittelmeer die MAF für Adenin höher ist als in Deutschland. Es gibt zurzeit keine veröffentlichten Daten über die MAF des SNPs rs2302382 in der Mittelmeerregion.

Im Fall dieser Studie konnten zwar bereits in der Gegenüberstellung der Genotypen und der drei SNP, unabhängig von ethnischen Unterschieden, keine signifikanten Allelfrequenzunterschiede erhoben werden, ein Stratifikationsbias kann aber zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. So ermöglicht die Trennung in Subgruppen den intraethnischen, phänotypunabhängigen Vergleich der Allelfrequenzen, mit dessen Wissen dann der Stratifikationseffekt erfasst werden kann.

Bei der Untersuchung der Allelfrequenzen in Abhängigkeit der ethnischen Herkunft können allerdings auch Verstöße gegen das Hardy-Weinberg Gesetz innerhalb der ethnischen Untergruppen ermittelt werden. Insbesondere bei Kindern türkischer Herkunft kann dies aufgrund der in diesem Kulturkreis häufiger auftretenden konsanguiner Ehen vorkommen [2, 83]. Da in dieser Studie die Verwandtschaftsgrade der Kindseltern nicht erhoben wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kinder konsanguiner Ehen in dieser Studie erfasst sind.

Es herrscht noch Unklarheit in der Wissenschaft darüber, inwieweit eine Studienpopulation nach Stratifizierungsschichten unterteilt werden sollte [71]. Die in dieser Studie gewählte Klassifizierung orientiert sich einerseits an den Herkunftshäufigkeiten der Berliner Bevölkerung und andererseits an möglich verwandten Genpools. Es ist unstrittig, dass im Zuge der Klassifizierung willkürliche Zuordnungen erfolgt sind, die mit Ungenauigkeiten in der Auswertung einhergehen. Genauere Unterteilungen sind aber aufgrund der limitierenden Fallzahl nicht sinnvoll. Eine größere Fallzahl der Studienpopulation würde eine genauere Aussage auf diesem Gebiet ermöglichen.

4.2 Einflüsse der untersuchten SNPs auf die Adipositasentstehung

4.2.1 Assoziationsuntersuchung zwischen den drei SNPs und Adipositas

Die in dieser Studie erhobenen minimalen Allelfrequenzen unterscheiden sich teilweise von denen, die in der HapMap veröffentlicht sind [40]. Die MAF des SNPs rs8111428 beträgt in

dieser Studie rund 20%. In der HapMap ist eine MAF dieses SNPs bei Kaukasiern mit 44% beziffert. Für den SNP rs2302382 ist in der HapMap keine MAF für Kaukasier beschrieben. Die MAF des SNPs rs1800437 beträgt in dieser Studie etwa 23%, die Daten der HapMap weisen eine MAF dieses SNPs bei Kaukasiern von 17,5% auf [40]. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass diese minimalen Allelfrequenzen in der Hapmap anhand von Genotypen von nur 92 beziehungsweise nur 60 Kaukasiern für die SNPs rs8111428 und rs1800437 erhoben wurden [40]. Nitz und Mitarbeiter haben 2007 in ihrer Studie die Genotypen von 190 Typ II Diabetes Patienten und 380 Kontrollen für den SNP rs1800437 bestimmt und jeweils MAF dieses SNPs von 23,3% und 21,4% gefunden [67]. Diese entsprechen den MAF des SNPs rs1800437 dieser Studie. Auch die MAF-Daten der Studie von Vogel und Mitarbeiter, in der 34 100 Genotypen untersucht wurden, stimmen mit denen in dieser Studie gefunden MAF der drei SNPs für die normalgewichtigen Kinder überein [85].

Es können keine Assoziationen zwischen den drei untersuchten SNPs und Adipositas im Kindesalter festgestellt werden.

Somit widersprechen die Ergebnisse dieser Arbeit den Daten der Essener Studie von 2009, wonach der SNP rs2302382 mit Adipositas signifikant assoziiert ist. Allerdings kam diese Studie bereits zu widersprüchlichen Ergebnissen, wonach einerseits Träger des A-Allels des SNPs rs2302382 eine BMI-Erhöhung um 0,12 BMI-Einheiten aufweisen (KORA-Studienpopulation) oder aber einen BMI haben, der im Durchschnitt 0,27 BMI-Einheiten tiefer liegt als der der Träger des C-Allels (SHIP-Studienpopulation) [85]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Assoziation zwischen Adipositas und diesem SNP gefunden werden, allenfalls ist zu vermerken, dass in dieser Studie analog zur Studie von Vogel und Mitarbeitern das A-Allel etwas häufiger bei adipösen Kindern vorkommt. Ein weiterer Hinweis, der für die erste Assoziationsrichtung von Vogel und Mitarbeiter spricht, liegt somit vor.

Wie auch in der Studie von Vogel und Mitarbeitern kann in der vorliegenden Studie lediglich von einem Trend gesprochen werden, dass das häufigere Allel G des SNPs rs1800437 bei den adipösen Kindern häufiger vorkommt als das seltenere Allel C [85].

Der SNP rs8111428 weist ebenfalls keine Assoziation mit Adipositas im Kindesalter auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde darauf verzichtet, dominante und additive Modelle für die drei SNPs zu berechnen, da bereits durch die einzelnen Frequenzuntersuchungen unter den beiden Phänotypgruppen keine signifikanten Unterschiede erhoben werden konnten und auch die multiple lineare Regression für keinen der drei SNPs Assoziationen aufzeigen konnte.

4.2.2 Replikationsschwierigkeiten von Assoziationsstudien

Replikationsschwierigkeiten stellen keine Seltenheit in der Assoziationsstudienforschung dar. Ioannidis und Mitarbeiter haben in ihren Arbeiten die Probleme bei der Bestätigung von Ergebnissen von Assoziationsstudien aufgeführt [41]: So spielen neben der Power einer Studie auch die Unterschiede bezüglich der untersuchten Populationen und ihrer jeweiligen Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle für den Erfolg einer Reproduzierbarkeit einer Assoziationsstudie.

In der Tat können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch zu niedrige Fallzahlen der Assoziationsstudie zustande kommen: Sollten die drei untersuchten SNPs einen Einfluss auf die Adipositasentwicklung im Kindesalter haben, so ist dieser Einfluss so gering, dass er durch die vorliegende Fallzahl der Studienpopulation nicht erfasst werden kann. In diesem Fall ist die Power der Studie zu gering gewesen. Allerdings wird eine genaue Power-Analyse im Falle von Assoziationsstudien dadurch erschwert, dass der mutmaßliche Einfluss der SNPs auf die Gewichtsregulation nicht beziffert werden kann. Darüber hinaus kann das nicht signifikante Ergebnis auch lediglich Ausdruck dessen sein, dass die drei SNPs nicht mit Adipositas im Kindesalter assoziiert sind.

Im Vergleich mit der Studie von Vogel und Mitarbeitern divergieren die hier vorgelegte Studie und die Essener Studie in Bezug auf das Durchschnittsalter der Studienpopulationen: Die Population der Essener Studie setzt sich aus einerseits aus der KORA- und der SHIP-Kohorte und andererseits aus einer Fall-Kontroll-Kohorte zusammen. Die KORA- und SHIP - Populationen weisen mit einem Durchschnittsalter um die 50 Jahre wesentlich

ältere Probanden auf als in der vorliegenden Arbeit. Die Kinder der Fall-Kontroll Studie sind jedoch sowohl für die Gruppe der normalgewichtigen als auch für die Gruppe der adipösen Kinder etwa gleich alt und somit mit denen der vorliegenden Arbeit in Bezug auf das Alter vergleichbar [85].

Die Studienpopulationen der beiden Arbeiten stammen zwar aus unterschiedlichen Regionen, allerdings leben sie beide in Deutschland, sodass verschiedene Umwelteinflüsse eher eine untergeordnete Rolle spielen. Die möglichen unterschiedlichen ethnischen Hintergründe der Probanden beider Studien können ebenfalls eine Rolle bei der mangelnden Replikation der Ergebnisse in Bezug auf den SNP rs2302382 sein. In dieser Studie weisen rund 45% der Kinder einen Migrationshintergrund auf, die genaue ethnische Herkunft der Probanden von Vogel und Mitarbeiter ist nicht genauer definiert.

Ähnliche Replikationsschwierigkeiten gab es auch für den SNP rs7566605 des INSIG2 Gens. Lyon und Mitarbeiter zeigten in ihrer Studie vom April 2007, dass verschiedene Studien, die die Assoziation zwischen Adipositas und dem SNP rs7566605 untersuchten, zu teils signifikanten und teils nicht signifikanten Ergebnissen kamen [58].

4.2.3 Assoziationsuntersuchung zwischen den drei SPNs und dem HOMA-IR

Die vorliegende Arbeit weist erstmals eine signifikante Assoziation mit einem p-Wert von 0,002 zwischen dem C-Allel des SNPs rs1800437 und einem HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile auf. Damit widerspricht diese Studie den Daten von Nitz und Mitarbeitern, die keine signifikanten Unterschiede zwischen der Allelverteilung dieses SNPs unter Kontrollgruppen und an Diabetes Typ II erkrankten Patienten finden konnten [67]. Allerdings wurden in dieser Studie nur insgesamt 570 Genotypen untersucht und darüber hinaus betrug das Durchschnittsalter dieser Studienpopulation 55,5 Jahre und weicht somit weit von dem der hier vorgelegten Arbeit ab.

Dass in dieser Studie Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Allelverteilung des

SNPs rs1800437 und einem erhöhtem HOMA-IR-Wert gibt, kann allerdings mit den Ergebnissen anderer Studien, die den Zusammenhang zwischen einer Inaktivierung des GIPR-Gens und einer Insulinresistenz aufzeigen, in Einklang gebracht werden [91, 33, 62]. Der SNP rs1800437 liegt im Exon 12 des GIPR (siehe Abbildung 1.5) und führt zu einem Austausch der Aminosäure von Glutamat zu Glutamin. Möglicherweise führt dieser SNP zu einer verbesserten Aktivität des GIP-Rezeptors. Dies kann postuliert werden, da im Mausmodell eine Inaktivierung des Rezeptors zu einer Resistenz gegenüber einer diätinduzierten Insulinresistenz führt [26, 62]. Weitere Studien müssen abgewartet werden, die die funktionelle Relevanz dieses SNPs genauer untersuchen.

4.2.4 Haplotypen-Bestimmung

Die Haplotypbestimmung dieser Studie ist nur eingeschränkt möglich, da die Genotypen der Eltern nicht bekannt sind. Somit kann für 66,3% der Kinder keine ausreichende Haplotypbestimmung erfolgen, sodass ein Teil der Information fehlt.

Vogel und Mitarbeiter deuten darauf hin, dass der SNP rs8111428 und der SNP rs2302382 vermutlich innerhalb eines Haplotypen liegen, da das G-Allel des SNPs rs8111428 und das A-Allel des SNPs rs2302382 überdurchschnittlich häufig an übergewichtige Nachfahren gemeinsam vererbt werden [85]. Diese Assoziation kann für Adipositas in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Allerdings findet sich die gleichzeitige Vererbung des A-Allels des SNPs rs8111428 und des C-Allels des SNPs rs2302382 bei den Kindern, die einen HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile aufweisen.

In dieser Arbeit konnte mit einem p-Wert von 0,007 eine signifikante Assoziation zwischen der Haplotypkonstellation ACC + ACC und einem HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile gefunden werden. Dies spiegelt die zuvor berichteten Ergebnisse, dass Kinder, die homozygot CC für den SNP rs1800437 sind, signifikant höhere HOMA-IR-Werte haben als Kinder, die heterozygot CG oder homozygot GG sind, wider. Somit liegt ein weiterer Hinweis darauf vor, dass der Einbau der Aminosäure Glutamin durch das C-Allel möglicherweise zu einer gesteigerten Aktivität des GIPR führen, da eine Blockierung dieses Rezeptors zu einer verbesserten Insulinresistenz führt.

Die Assoziation, die zwischen den Haplotypkonstellationen der drei SNPs und dem Geschlecht gefunden wurde ($p=0,028$), unterstreicht die signifikante Assoziation zwischen dem SNP rs2302382 und dem Geschlecht. Jungen sind etwas häufiger Träger des A-Allels für diesen SNP. Es können dadurch allerdings keinerlei Rückschlüsse auf den Einfluss dieses SNPs gezogen werden.

4.3 Der GIPR und seine Rolle als Adipositas-Kandidatengen

Auch wenn in der vorliegenden Studie keine Assoziation zwischen den drei untersuchten SNPs des GIPR-Gens und Adipositas im Kindesalter gefunden werden konnte, kann daraus lediglich geschlussfolgert werden, dass, sollte die Power der Studie ausreichend gewesen sein, diese drei SNPs in dieser Studie nicht mit Adipositas assoziiert sind. Ebenso kann in Bezug auf die Adipositasentwicklung lediglich geschlussfolgert werden, dass die drei SNPs nicht in einem Haplotypen liegen, der eine Mutation beinhaltet, die mit Adipositas assoziiert ist.

Aufgrund der vielen Mausmodelle mit einem fehlenden oder inaktivierten GIPR gibt es jedoch keinen Zweifel daran, dass das GIP Hormon und sein Rezeptor eine wichtige Rolle sowohl in der Adipositasentwicklung als auch in der Entwicklung einer Insulinresistenz spielen [62, 77, 33, 60]. Da Adipositas jedoch eine polygenetisch regulierte Erkrankung ist [74], kann gemutmaßt werden, dass viele Einzelgene und entsprechend viele einzelne SNPs zusammen einen synergistischen Effekt auf die Ausprägung einer Adipositas haben. So können erst Studien mit einer größeren Studienpopulation oder aber Studien, die gleichzeitig mehrere adipositasassoziierte SNPs erfassen, den mitunter minimalen Einfluss eines einzelnen SNPs auf die Adipositas herausarbeiten.

Diese Studie zeigt erstmals eine signifikante Assoziation zwischen dem exonischen SNP

rs1800437 des GIPR-Gens und einem erhöhten HOMA-IR-Wert oberhalb der 95. Perzentile auf. Die entscheidende Rolle des GIPR als Diabetes-Kandidatengen wird sowohl durch die Physiologie der GIP-GIPR-Signalweges als auch durch die Ergebnisse dieser Studie begründet. Die Frage, ob Veränderungen im GIPR-Gen direkt zur Adipositasentwicklung beitragen oder doch ausschließlich indirekt mit Adipositas über die bei dieser Erkrankung häufig vorkommende Insulinresistenz verbunden sind, bleibt jedoch offen.

4.4 Weitere Ursachen der Adipositas

Der oft zitierte Satz "Genetic loads the gun, but environment pulls the trigger." von Professor George Bray unterstreicht den synergistischen Einfluss des Lebensstils und der Genetik. Nicht die Genetik alleine entscheidet über die Gewichtsentwicklung einer Person, sie bildet die Grundlagen der individuellen Disposition übergewichtig oder fettleibig zu werden. Das individuelle Ernährungs- und Bewegungsverhalten akzentuieren jedoch diese Veranlagung und können einer Gewichtszunahme gegensteuern [55]. Es ist daher von mindestens genauso großer Bedeutung wie die Genforschung zu fördern präventive Maßnahmen zu betreiben, die die Entstehung von Übergewicht und Adipositas einschränken.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Inzidenz von Übergewicht und Adipositas nimmt in den letzten 20 Jahren stetig zu. Dies ist nicht nur bei Erwachsenen, sondern vor allem auch bei Kindern zu vermerken. Neben den mannigfaltigen Umwelteinflüssen, die die Entstehung von Adipositas begünstigen [55], spielt vor allem auch die genetische Disposition einer Person, Adipositas zu entwickeln, eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung dieser Krankheit. In einer Assoziationsstudie wurden 2009 drei Single Nukleotid Polymorphismen des Glukose-abhängigen insulinotropischen Rezeptors (GIPR) auf eine Assoziation mit Adipositas untersucht [85]. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das GIPR-Gen ein geeignetes Adipositas- und Insulinresistenz-Kandidatengen ist.

Die vorgelegte Arbeit überprüft die Assoziation zwischen Adipositas im Alter von 2,5 bis 18 Jahren und den drei SNPs rs8111428, rs2302382 und rs1800437 des GIPR. Die Genotypisierung von 2280 Kindern erfolgte über zwei verschiedene Verfahren: einerseits über das SNaPshot Verfahren mit anschließender Elektrophorese der Firma ABI PRISM[®] [1] und andererseits über das i-plex Verfahren mit anschließender Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight Spektrometrie (MALDI-TOF) der Firma Sequenom[®] [6]. Es konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen Adipositas im Kindesalter und den drei SNPs rs8111428, rs2302382 und rs1800437 des GIPR-Gens gefunden werden. Allenfalls ist von einem Trend zu sprechen, dass das A-Allel des SNPs rs2302382 etwas häufiger bei den adipösen Kindern vorkommt. Allerdings zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen dem A-Allel des SNPs rs2302382 und dem männlichen Geschlecht ($p=0,045$). Die-

se Assoziation spiegelt sich in der gefundenen Assoziation zwischen dem Geschlecht und Haplotypen, die mit dem A-Allel dieses SNPs einhergehen, wider ($p=0,028$). Des Weiteren wurde erstmals eine Assoziation zwischen dem C-Allel des SNPs rs1800437 und einem HOMA-IR Wert oberhalb der 95. Perzentile festgestellt ($P= 0,002$). Ebenfalls wurde eine Assoziation zwischen dem HOMA-IR Wert und Haplotypen, die mit dem C-Allel des SNPs rs1800437 einhergehen, gefunden ($p= 0,007$). Es konnten weder Assoziationen zwischen den drei Polymorphismen und der ethnischen Herkunft noch zwischen den Haplotypen und der ethnischen Herkunft oder Adipositas gefunden werden.

Diese Studie widerspricht den Ergebnissen von Vogel und Mitarbeitern, wonach eine Assoziation zwischen dem SNP rs2302382 und Adipositas besteht [85] und verdeutlicht somit die Schwierigkeit einer erfolgreichen Replikation anderer Assoziationsstudien [41]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Polymorphismus des GIPR identifiziert, der signifikant mit einem erhöhten HOMA-IR Wert assoziiert ist und dadurch die Rolle des GIPR als Diabetes-Gen unterstreicht. Damit widerlegt diese Studie die Ergebnisse von Nitz und Mitarbeitern, die keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Typ II Diabetes und dem SNP rs1800437 gefunden haben [67]. Weitere Studien müssen abgewartet werden, um die funktionelle Relevanz des exonischen SNPs rs1800437 zu ermessen.

Literaturverzeichnis

- [1] ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit Protocol, applied biosystems (abgerufen am 16.05.08 unter http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041203.pdf)

- [2] Abdulrazzaq YM, Bener A, al-Gazali LI, al-Khayat AI, Micallef R, Gaber T. A study of possible deleterious effects of consanguinity. *Clin Genet.* 1997;51(3):167–73.

- [3] Adair LS. Child and adolescent obesity: epidemiological and developmental perspectives. *Physiol Behav.* 2008;94(1):8-16.

- [4] Allard P, Delvin EE, Paradis G, et al. Distribution of fasting plasma insulin, free fatty acids, and glucose concentrations and of homeostasis model assessment of insulin resistance in a representative sample of Quebec children and adolescents. *Clin Chem.* 2003;49(4):644-9.

- [5] Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;91(3):171-7.

- [6] Application Notes Multiplexing the Homogeneous MassExtend Assay, Sequenom, 2004

-
- [7] Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter. Evidenzbasierte Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) und der beteiligten medizinischen-wissenschaftlichen Fachgesellschaften, Berufsverbände und weiterer Organisationen, Therapie der Adipositas im Kindes- und Jugendalter 2009. (abgerufen am 16.02.09 unter <http://www.a-g-a.de/Leitlinien3.pdf>).
- [8] Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of Linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2002;3(4):299-309.
- [9] Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7(10):781-91.
- [10] Barat P, Duclos M, Moisan MP, Mormède P. Involvement of hypothalamopituitary adrenal axis in abdominal obesity. *Arch Pediatr.* 2008;15(2):170-8.
- [11] Barsh GS, Farooqi IS, O’Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature.* 2000;404(6778):644-51.
- [12] Bau AM, Ernert A, Schenk L, et al. Is there a further acceleration in the age at onset of menarche? A cross-sectional study in 1840 school children focusing on age and bodyweight at the onset of menarche. *EJE* 2009;160:107–13.
- [13] Böhm A. Adipositas bei Einschülern: Ausmaß, Entwicklungen und Zusammenhänge zum Sozialstatus. *psychomed* 13 2001;(4):235-41.
- [14] Boylan MO, Jepeal LI, Wolfe MM. Sp1/Sp3 binding is associated with cell-specific expression of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(6):E1287-95.
- [15] Calcaterra V, Klersy C, Muratori T et al. Prevalence of metabolic syndrome (MS) in children and adolescents with varying degrees of obesity, *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(6):868-72.

-
- [16] Clément K, Vaisse C, Lahlou N et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392(6674):398-401.
- [17] Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320(7244):1240-3.
- [18] Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 2005;8(5):571-8.
- [19] De Ferranti SD, Osganian SK. Epidemiology of paediatric metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2007;4(4):285-96.
- [20] Del-Rio-Navarro BE, Velasquez-Monroy O, Lara-Esqueda A, et al. Obesity and metabolic Risks in Children. *Arch Med Res.* 2008;39(2):215-21.
- [21] Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet.* 2007;39(6):724-6.
- [22] Dubuis JM. L'obésité infantile : préoccupation quotidienne du pédiatre?. (abgerufen am 23.01.2008 bei <http://www.swiss-paediatrics.org/paediatrica/vol12/n6/obesite-fr.htm>.)
- [23] Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14 Suppl 5:254S-258S.
- [24] Farooqi IS, O'Rahilly S. Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(10):569-77.
- [25] Fox CS, Heard-Costa N, Cupples LA, Dupuis J, Vasan RS, Atwood LD. Genome-wide association to body mass index and waist circumference: the Framingham Heart Study 100K project. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1:S18.

-
- [26] Fulurija A, Lutz TA, Sladko K, et al. Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS ONE* 2008;3(9):e3163.
- [27] Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(7):1124-31.
- [28] Gibbs R. Deeper into the genome. *Nature* 2005;437(7063):1233-4.
- [29] Goldstein DB, Cavalleri GL. Genomics: understanding human diversity. *Nature*. 2005;437(7063):1241-2.
- [30] Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, et al. APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. *J Lipid Res*.2007;48(12):2614-21.
- [31] Hall DH, Rahman T, Avery PJ, Keavney B. INSIG-2 promoter polymorphism and obesity related phenotypes: association study in 1428 members of 248 families. *BMC Med Genet*. 2006;7:83.
- [32] Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2002;25(7):1177-84.
- [33] Hansotia T, Maida A, Flock G, et al. Extrapancreatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J Clin Invest*. 2007;117(1):143-52.
- [34] Herbach N, Göke B, Wolf E, Wanke R. Diets influence the diabetic phenotype of transgenic mice expressing a dominant negative glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPRdn). *Regul Pept*. 2008;146(1-3):260-70.
- [35] Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 2005;307(5712):1072-9.

- [36] Hölling H, Schlack R. Essstörungen im Kindes- und Jugendalter. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz 2007;50:794-99.
- [37] Illig T, Vollmert C, Gohlke H, et al. Hochdurchsatz SNP Genotypisierung mit MALDI TOF MS. BIOSpektrum 2004;10:1-3.
- [38] International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. Nature 2005;437(7063):1299-320.
- [39] International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature. 2007;449(7164):851-61.
- [40] International HapMap Project (www.hapmap.org; 2008)
- [41] Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. Nat Genet. 2001;29(3):306-9.
- [42] Irwin N, McClean PL, Cassidy RS, et al. Comparison of the anti-diabetic effects of GIP- and GLP-1-receptor activation in obese diabetic (ob/ob) mice: studies with DPP IV resistant N-AcGIP and exendin(1-39)amide. Diabetes Metab Res Rev. 2007;23(7):572-9.
- [43] Jackson MB, Ahima RS. Neuroendocrine and metabolic effects of adipocyte-derived hormones. Clin Sci (Lond) 2006;110(2):143-52.
- [44] Jia X, Brown JC, Ma P, Pederson RA, McIntosh CH. Effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-I-(7-36) on insulin secretion. Am J Physiol. 1995;268(4 Pt 1):E645-51.
- [45] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 2000;106(4):473-481.

- [46] Koletzko B, Giradet JP, Klish W, Tabacco O. Obesity in children and adolescents worldwide: current views and future directions—Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35 Suppl 2:S205-12.
- [47] Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M. Aktuelle Sicht der Prävalenz und Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ), 2008 (<http://www.a-g-a.de/trends.doc>, abgerufen am 25.09.08).
- [48] Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, et al. Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;149:807-18.
- [49] Krude H, Biebermann H, Grüters A. Mutations in the human Proopiomelanocortin Gene. *Ann NY Acad Sci.* 2003;994:233-239.
- [50] Kumanyika SK. Environmental influences on childhood obesity: Ethnic and cultural influences in context. *Physiol Behav.* 2008;94(1):61-70.
- [51] Kurth BM, Schaffrath Rosario A. Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz* 2007;50:736-43.
- [52] Lasky-Su J, Lyon NH, Emilsson V, et al. On the replication of genetic associations: timing can be everything!. *Am J Hum Genet.* 2008;82(4):849-58.
- [53] Lee YS. The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann Acad Med Singapore.* 2009;38(1):34-11.
- [54] Leushner J. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001;1(1):11-8.

-
- [55] Lob-Corzilius T. Übergewicht und Adipositas - eine Herausforderung für die öffentliche Gesundheit. *umwelt medizin gesellschaft* 2007;180-5.
- [56] Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM. et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(5):1811-8.
- [57] Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, et al. A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in β -cells. *FASEB J.* 2003;17(1):91-3.
- [58] Lyon NH, Emilsson V, Hinney A, et al. The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS Genet.* 2007;3(4):e61.
- [59] Malde AK, Srivastava SS, Coutinho EC. Understanding interactions of gastric inhibitory polypeptide (GIP) with its G-protein coupled receptor through NMR and molecular modeling. *J Pept Sci.* 2007;13(5):287-300.
- [60] McClean PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR. GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(6):E1746-55.
- [61] Mensink GBM, Kleiser C, Richter A. Lebensmittelverzehr bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl- Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz* 2007;50(5-6):609-23.
- [62] Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med.* 2002;8(7):738-42.
- [63] Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP et al. Congenital leptin deficiency and the risk of adult obesity in humans. *Nature* 1997;387(6636):903-8.

- [64] Moß A, Wabitsch M, Kromeyer-Hauschild K, Reinehr T, Kurth BM. Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei deutschen Einschulkindern. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz 2007;50:1424-31.
- [65] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51Pt1:263-73.
- [66] Mutch DM, Clément K. Unraveling the genetics of human obesity. PLoS Genet. 2006;2(12):e188.
- [67] Nitz I, Fischer E, Weikert C, et al. Association analyses of GIP and GIPR polymorphisms with traits of the metabolic syndrome. Mol Nutr Food Res. 2007;51(8):1046-52.
- [68] Oberwöhrmann S, Bettge S. Spezialbericht 2007-1: Basisdaten zur gesundheitlichen und sozialen Lage von Kindern in Berlin, 2008 (abgerufen am 22.01.2008 unter www.berlin.de/sen/statistik/gessoz/gesundheit/spezial.html abgerufen am 22.01.2008)
- [69] Oeth P, Beaulieu M, Park C, et al. iPLEXTM Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. SEQUENOM Application Note, April 2005
- [70] Özer BK. Growth reference centiles and secular changes in Turkish children and adolescents. Econ Hum Biol. 2007 Jul;5(2):280-301.
- [71] Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. Am J Hum Genet. 1999;65:220-228.
- [72] Promega. Maxwell[®] 16 DNA Purification Kits, Technical manual, 2007 (abgerufen am unter 10.10.2007 <http://www.promega.com/tbs/tm284/tm284.pdf>)
- [73] QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook, Quiagen, February 2003

- [74] Reinehr T, Hinney A, Toschke AM, Hebebrand J. Aggravating effect of INSIG2 and FTO on overweight reduction in a one-year lifestyle intervention. *Arch Dis Child*. 2009 Feb. [Epub ahead of print]
- [75] Reinher T, de Sousa G, Roth CL. Obestatin and ghrelin levels in obese children and adolescents before and after reduction of overweight. *Clinical Endocrinology* 2008;68(2):304-10.
- [76] Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Bellisle F, Sempé M, Guilloud-Bataille M, Patois E. Adiposity rebound in children: a simple indicator for predicting obesity. *Am J Clin Nutr*. 1984;39(1):129-35.
- [77] Rudovich N, Kaiser S, Engeli S, et al. GIP receptor mRNA expression in different fat tissue depots in postmenopausal non diabetic women. *Regul Pept*. 2007;142(3):138-45.
- [78] Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*. 2007;3(7):e115.
- [79] Song DH, Getty-Kaushik L, Tseng E, Simon J, Corkey BE, Wolfe MM. Glukose-dependent insulinotropic polypeptide enhances adipocyte development and glukose uptake in part through Akt activation. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1796-805.
- [80] Stolzenberg H, Kahl H, Bergmann KE. Körpermaße bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch- Gesundheitschutz* 2007;50:659-69.
- [81] Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1483-7.

- [82] Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF. et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 2009;41(1):18-24.
- [83] Tuncbilek E. Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr.* 2001;43(4):277-9.
- [84] Van Haeften TW. Glukose tolerance, insulin sensitivity, and the homeostasis model assessment method. *Diabetes Care.* 1998;21(4):673-4.
- [85] Vogel CI, Scherag A, Brönner G, et al. Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups. *BMC Med Genet.* 2009;10:19.
- [86] Von Lengerke T, John J. Gesundheitsökonomische Aspekte der Adipositas – Bisherige Ergebnisse der Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA), Presstext DGK 03/2005 (abgerufen am 14.09.08 unter http://www.dgk.org/kongresse/ft/ft2005/presstexte/39_Lengerke.pdf,)
- [87] Wabitsch M, Kromeyer-Hausschild K. Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland, 2007
- [88] Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends Genet.* 2002;18(1):19-24.
- [89] World Health Organization WHO (abgerufen am 24.03.2009 unter <http://www.who.int/topics/obesity/en/>)
- [90] Bundesministerium der Justiz (abgerufen am 22.01.2008 unter www.gesetze-im-internet.de/rustag/_25.html)
- [91] Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, et al. Genetic inactivation of GIP signaling reverses aging-associated insulin resistance through body composition changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364(1):175-80.

- [92] Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 1998;20(2):111-2.
- [93] Yip RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sci.* 2000;66(2):91-103.
- [94] Zündorf I. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Von Cornel Mühlhardt. *Pharm Unserer Zeit.* 2009 Jan;38(1):96-97.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich an allererster Stelle herzlich bei Frau PD Dr. Heike Biebermann für die exzellente Betreuung meiner Arbeit und die stets motivierende Unterstützung bedanken!

Ich danke Frau Prof. Dr. Grüters-Kieslich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und besonders Herrn Prof. Dr. Köhrle für die Betreuung und die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduierten Kollegs 1208 der DFG.

Des Weiteren gilt sehr großer Dank den Mitarbeitern des Instituts für Pädiatrische Endokrinologie der Charité für das heitere und angenehme Arbeitsklima und für die vielen konstruktiven Ratschläge. Dabei geht besonderer Dank an Jessica Grothe, Sabine Jyrch, Harald Brumm und Susanna Wiegand.

Ich danke Harald Grallert für die Ermöglichung der Genotypisierung an der GSF München.

Ein ebenso großer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für die unablässliche Unterstützung bei der Ausfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Paper

1. Sauber J, Grothe J, Behm M, et al. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. *Eur J Endocrinol.* 2010 Aug;163(2):259-64.

Abstracts

1. Sauber J, Jyrch S, Brönner G, et al. Association study on three single nucleotide polymorphisms upstream and in the GIPR in obese and lean children from Berlin. 10. European Congress of Endocrinology, Berlin 2008.
2. Behm M, Ambrugger P, Sauber J, et al. Screening for mutations in the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene (GIPR) in obese patients with disturbed glucose tolerance. 10. European Congress of Endocrinology, Berlin 2008.
3. Grothe J, Brumm H, Sauber J, et al. Melanocortin-4-Receptor Gene Variant Y35X/-D37V: Hotspot or Identical by Descent? 52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Gießen 2009.
4. Grothe J, Brumm H, Sauber J, et al. Melanocortin-4-Receptor Gene Variants: Hotspot or Identical by Descent? 11. European Congress of Endocrinology, Istanbul 2009.

5. Grothe J, Brumm H, Sauber J, et al. 3 Obesity Relevant Melanocortin-4-Receptor Gene Variants and Identity by Descent. 24. Jahrestagung der Deutschen Adipositasgesellschaft, Freiburg 2009.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Jeannine Sauber, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Untersuchung der Allelfrequenz dreier SNPs im Glukoseabhängigen insulinotropischen Peptid Rezeptor (GIPR) an übergewichtigen und normalgewichtigen Kindern aus dem Raum Berlin** von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

11. Oktober 2010 Jeannine Sauber