

ABSCHLUSSBERICHT

Nationales Genomforschungsnetz 2, Genomnetz Neuro – Adipositas: „Genomweite Kopplungsanalysen mit Hilfe hochdichter SNP-Arrays“

Förderkennzeichen: 01GS0484

Teilprojekt-ID: N2NV-S02T02

1. Aufgabenstellung

Genetische Faktoren erklären über 50% der Varianz des Körpergewichtes. Es sollten Gene identifiziert werden die für die Entwicklung einer Adipositas im Kindes- und Jugendalter relevant sind. Dafür sollte an 295 deutschen Familien mit mindestens zwei adipösen Kindern (BMI über der 90. Perzentile) eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt werden unter Verwendung von 10K Affymetrix-SNP-Arrays. Da ein Teil der Familien zuvor bereits mit Mikrosatellitenmarkern typisiert worden war, sollte die Studie auch dem Methodenvergleich von STR-Markern versus SNP-Marker dienen. Peakregionen waren feinzukartieren und geeignete Kandidatengene zu ermitteln für die Nachverfolgung in den anderen Teilprojekten. Zusätzlich sollten Mikrosatellitenanalysen für mit dem Phänotyp „Adipositas“ in Verbindung stehende Erkrankungen durchgeführt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Eine entscheidende Voraussetzung für die Durchführung des Vorhabens war die Verfügbarkeit einer ausreichenden Zahl an Familien mit mindestens einem adipösen Kind. Diese war durch die langfristigen Vorarbeiten der Gruppe von Prof. Hebebrand erfüllt. Auf der anderen Seite musste die Expertise und Kapazität für die Durchführung einer Hochdurchsatzgenotypisierung mit den SNP-Arrays von Affymetrix sichergestellt sein. Dies wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Nürnberg garantiert, genauso wie die Expertise in der Mikrosatelliten-typisierung. Auswertekompetenz war durch die Bioinformatik-Gruppe am MDC sichergestellt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Ende des Teilprojektes S02T02

Meilensteine	2004	2005	2006	2007	
SNP Kopplungsanalysen	1300 Proben werden mit dem 10K Kartierungsansatz von Affymetrix bearbeitet				T02
Datenanalysen	Berechnung der LOD Werte				T02
Typisierung der STR Marker (Adipositas)	Zusätzliche Mikrosatellitenmarker aus dem 10cM bzw 5cM Panel werden in den Kopplungsregionen mit dort noch nicht untersuchten Proben typisiert				T02
Endgültiger Vergleich der Markertypen	Diskussion und Veröffentlichung der Ergebnisse, 1 Publikation im Jahr 2005				T02
Typisierung der STR Marker (KEV)	Feinkartierung mit Mikrosatellitenmarkern in Kopplungsregionen auf Chromosom 12 und 15 bei ca. 1000 Proben von Familien mit konstitutioneller Entwicklungsverzögerung				T02
Regionale SNP Assoziationstudien	In ausgesuchten Kopplungsregionen (bis zu 10) bei den Adipositas- und KEV-Familien wird eine LD-Feinkartierung mit dichten SNP-Markersatzes vorgenommen				
Kandidatengen-SNP Assoziationstudien	Potentiell funktionell relevante SNPs der Kandidatengene aus den Kopplungsregionen werden in den vorhandenen Patienten/Kontroll-Kollektiven auf Assoziation geprüft				
Funktionelle Studien 1	Testung funktioneller Genvarianten mittels molekulargenetischer und biochemischer Tests (mRNA-Stabilität, Splice-Varianten, in vitro-Mutagenese, Aktivitätsmessungen)				
Funktionelle Studien 2	Testung funktioneller Genvarianten im Zell- und Tiermodell (Kooperationen im Netz)				
Verwertung der gefundenen Genvarianten	Diskussion und Veröffentlichung der Ergebnisse zur Genvariantenidentifizierung, etwa 2-6 Publikationen in den Jahren 2005-7; 1-2 Patentierungen soweit gerechtfertigt				

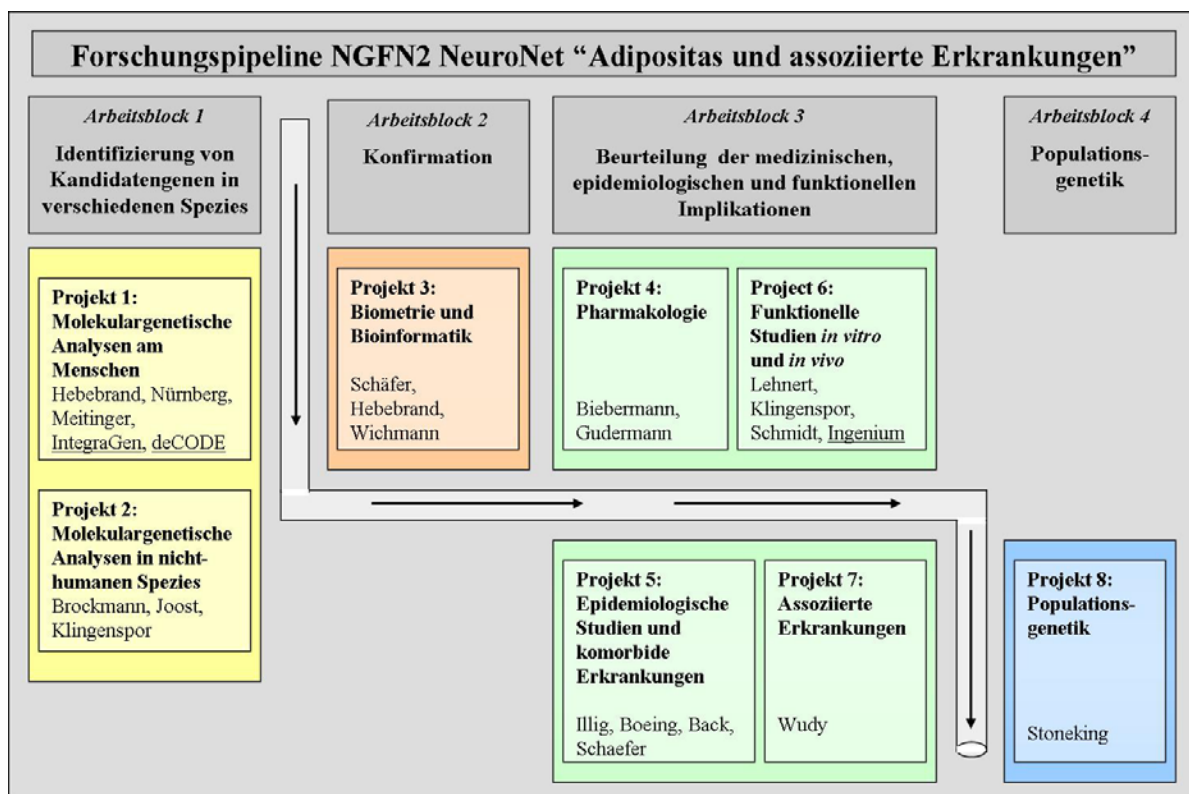
Die Chip-Typisierung wurde termingerecht durchgeführt. Die Datenanalyse erstreckte sich über einen längeren Zeitraum als geplant, da eine große Anzahl von verschiedenen Modellen gerechnet wurde, um möglichst viel Information aus dem Genomscan zu ziehen.

4. wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Genomscans für Adipositas sind bereits zuvor viele durchgeführt worden, nicht jedoch speziell zur Fettleibigkeit bei Kindern und Jugendlichen. Hier hat die Arbeitsgruppe um Johannes Hebebrand eine einzigartige Familiensammlung aufgebaut, die erwarten ließ, neue Gene für diese spezielle Form der Adipositas zu finden.

Die Einführung des 10K Arrays in die Kopplungsanalyse war maßgeblich durch die enge Zusammenarbeit zwischen der Arbeitsgruppe um Peter Nürnberg und Affymetrix ermöglicht worden. Insofern bestanden ideale Ausgangsbedingungen für die Durchführung des Projektes.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen



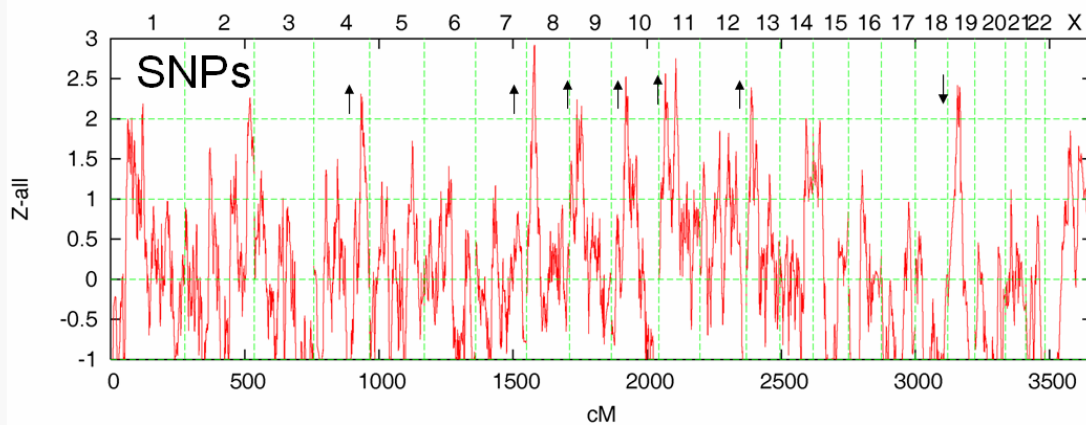
Das Teilprojekt 2 zielte von vornherein auf die starke Zusammenarbeit mit den anderen Teilprojekten ab. Hierbei ging es sowohl um den Austausch von Materialien als vor allem auch Informationen zu Kandidatengen, die einer genetisch epidemiologischen als auch funktionellen Validierung durch andere Gruppen im Konsortium unterworfen wurden.

6. Erzielte Ergebnisse

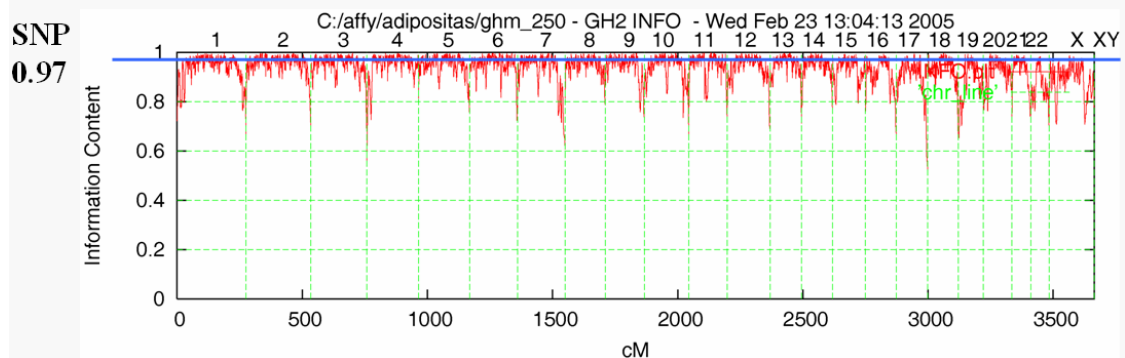
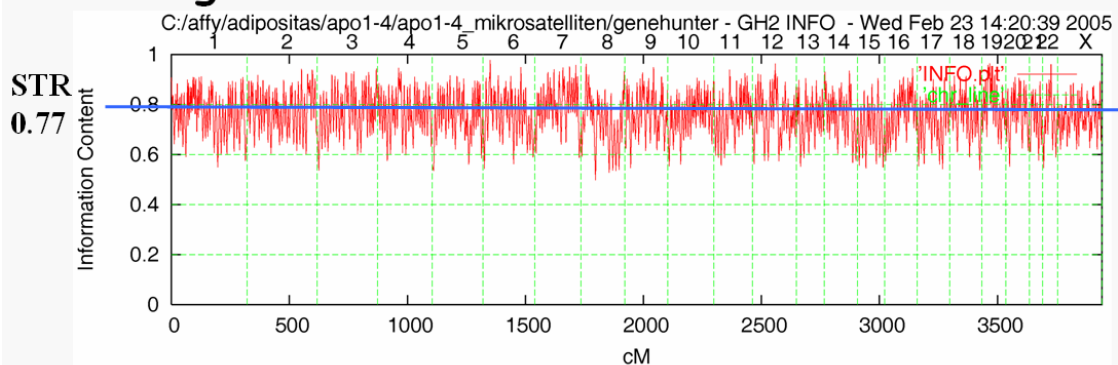
Vergleich von STR mit SNP Scan: Für eine Teilgruppe von 89 Familien lagen bereits vor dem SNP scan Daten aus einem Genomscan vor, der mit ungefähr 372 Mikrosatelliten (STR-Marker) durchgeführt worden war. Daraus ergab sich die Möglichkeit für einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Markersätze (372 STR vs. 10.000 SNPs). Aus den nachfolgenden Abbildungen ist ersichtlich, dass der Informationsgehalt des SNP-Markersatzes mit Ausnahme der telomernahen Bereiche der Chromosomen dicht an 100% (= volle Informativität) her-

anreichte. Für den Mikrosatelliten scan betrug die durchschnittliche Informativität hingegen nur 77%. Bei der LOD score-Berechnung ergab sich daraus an vielen Stellen eine Erhöhung der Peaks. Daraus lässt sich schließen, dass das Risiko, aufgrund mangelhafter Informativität ein Kopplungssignal zu übersehen, bei dem 10K SNP-Scan deutlich geringer ist und nur für die Chromosomenenden eine reale Gefahr darstellen kann.

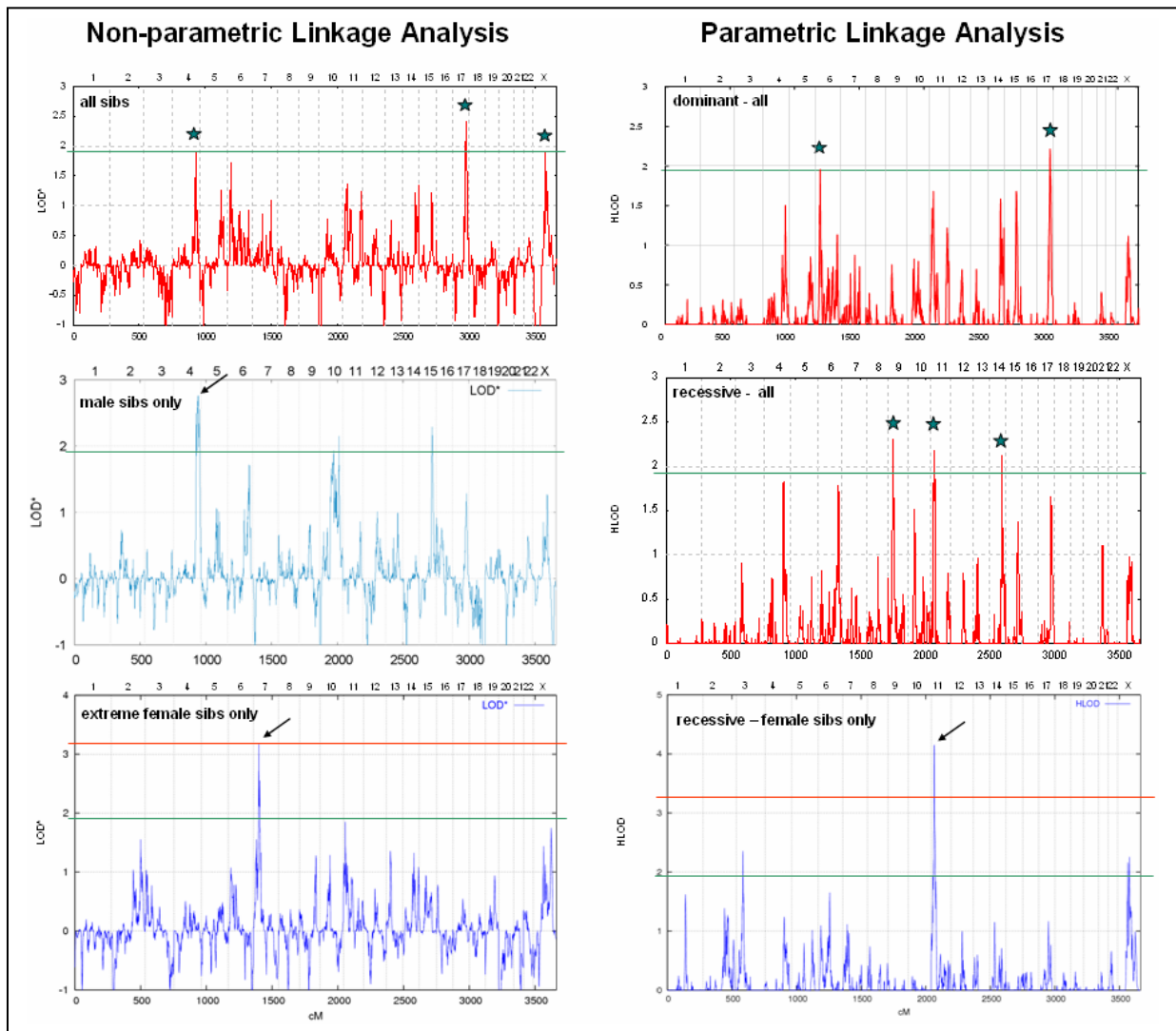
Genehunter non-parametric, 89 Familien



Average Genehunter Information Content



Ergebnisse des Genomscans: Insgesamt wurden 1236 Personen mit dem 10k Affymetrix Chip genotypisiert. Dies ist der derzeit größte Scan für frühmanifeste Adipositas hinsichtlich Stichprobenumfangs und Markerdichte. Multipoint Kopplungsanalysen ergaben sieben genomische Regionen mit Hinweis auf Kopplung mit nicht-parametrischen (4q34.2, 17q25.1, Xq21.33) und/oder parametrischen Methoden (6p23, 9p21.3, 11p15.1, 14q32.13, 17q25.1). Die Kopplungssignale wiesen zum Teil eine Geschlechtsspezifität auf (Peaks mit Pfeil markiert). In der Subgruppe der extrem adipösen Mädchen tauchte ein neuer Peak auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 auf (siehe nachfolgende Abbildung unten links).



Ein Ranking aller in diesen Regionen annotierten Gene im Hinblick auf ihre potentielle Relevanz für die Gewichtsregulation erbrachte eine Konsensliste von 20 Genen, in denen repräsentative SNPs an 368 unabhängigen Adipositas trios (betroffener Indexpatient und beide Eltern) genotypisiert wurden. 13 SNPs zeigten global korrigierte p-Werte $<0,05$, zwei von diesen wurden in den initialen Familien bestätigt und werden derzeit in weiterführenden Studien untersucht. Der Bestätigungsversuch der genetischen Varianten in unabhängigen Kollektiven erfolgte durch Hochdurchsatztypisierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Meitinger (München). Die Informationen über positive Varianten wurden über die 'Forschungspipeline' an alle beteiligten Gruppen weitergeleitet.

Assoziierte Erkrankungen: Der Phänotyp idiopathischer Kleinwuchs (engl.: idiopathic short stature; ISS) stellt in verschiedener Hinsicht (BMI, Knochenreifung, präpubertäre Körpergröße) das gegenüberliegende Ende der jeweiligen quantitativen Verteilungen der Phänotypen dar, die bei adipösen Kindern- und Jugendlichen zu beobachten sind. Mit einem konventionellen Mikrosatelliten-Genomscan gelang es in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Prof. Dr. Johannes Hebebrand, mit ISS gekoppelte chromosomale Regionen zu identifizieren: auf Chromosom 12 zeigte sich ein Bereich, der signifikant mit ISS sowie der Körperhöhe gekoppelt war. Die gleiche Region wurde bereits in anderen Genomscans als Kopplungsregion für die Statur bei Erwachsenen beschrieben und enthält das Gen für den *Vitamin D-Rezeptor (VDR)*. Ein familienbasierter Assoziationstest für 7 SNPs im *VDR* Gen deutet darauf hin, dass genetische Variabilität an diesem Locus zumindest teilweise den Kopplungspeak erklärt. Prof. Dr. Johannes Hebebrand analysiert derzeit gemeinsam mit Prof. Dr. Stefan A. Wudy (Gießen) Kandidatengene für Untergewicht bei Kindern mit ISS.

Populationsgenetik: Populationsgenetische Untersuchungen bezüglich der identifizierten Kandidatengene erfolgten in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Mark Stoneking (Leipzig). Dabei wurde u.a. die Hypothese untersucht, ob sich mit Adipositas assoziierte Varianten aufgrund eines Selektionsvorteils während der jüngeren Evolution in speziellen Populationen bevorzugt durchgesetzt haben gegenüber Varianten, die nicht zu Übergewicht prädisponieren. Die hier abzurechnenden genomweiten SNP-Untersuchungen, in diesem Fall an verschiedenen Ethnien durchgeführt, haben dazu beigetragen, ein Suszeptibilitäts-Allel des *PPARGC1A*-Gens als Ursache für die erhöhte Prävalenz des Typ2-Diabetes und der Fettleibigkeit bei den Polynesiern zu beschreiben, die heute einer eher westlichen Lebens- und Ernährungsweise ausgesetzt sind.

7. voraussichtlicher Nutzen

Die aus dem Genomscan hervorgegangenen Informationen über Kandidatenregionen und Kandidatengene sind in vielfältiger Weise in die andern Projekte des Konsortiums eingeflossen und haben mit dazu beigetragen, das Verständnis der genetischen Faktoren, die die Fettleibigkeit beeinflussen zu erkennen. Ein unmittelbarer wirtschaftlicher oder gesundheitspolitischer Nutzen konnte bislang nicht abgeleitet werden.

8. während des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt an anderen Stellen

Während der Projektphase ist ein Paradigmenwechsel bei der Identifizierung genetischer Faktoren für komplexe Erkrankungen eingetreten. Statt Kopplungsanalysen mit nachfolgendem regionalem LD-Mapping wird nunmehr der direkte genomweite Assoziationsscan mit 500K und 1000K SNP Arrays propagiert. Diese Entwicklung hat die Bedeutung des 10K-Scans relativiert und die Intensität bei der Nachverfolgung der Befunde abgeschwächt.

9. erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Publikationen

Saar K, Geller F, Rüschemdorf F, Reis A, Friedel S, Schäuble N, Nürnberg P, Siegfried W, Goldschmidt HP, Schäfer H, Ziegler A, Remschmidt H, Hinney A, Hebebrand J. Genome scan for childhood and adolescent obesity in German families. *Pediatrics*. 2003 Feb;111(2):321-7.

- Rüschendorf F, Nürnberg P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics*. 2005 May;21(9):2123-2125
- Hebebrand J, Dempfle A, Saar K, Thiele H, Herpertz-Dahlmann B, Linder M, Kiefl H, Remschmidt H, Hemminger U, Warnke A, Knolker U, Heiser P, Friedel S, Hinney A, Schafer H, Nürnberg P, Konrad K. A genome-wide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in 155 German sib-pairs. *Mol Psychiatry*. 2006 Feb;11(2):196-205.
- Heiser P, Dempfle A, Friedel S, Konrad K, Hinney A, Kiefl H, Walitza S, Bettecken T, Saar K, Linder M, Warnke A, Herpertz-Dahlmann B, Schäfer H, Remschmidt H, Hebebrand J. Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample. *J Neural Transm*. 2007 Apr;114(4):513-21
- Dempfle A, Wudy SA, Saar K, Hagemann S, Friedel S, Scherag A, Berthold LD, Alzen G, Gortner L, Blum WF, Hinney A, Nürnberg P, Schafer H, Hebebrand J. Evidence for involvement of the vitamin D receptor gene in idiopathic short stature via a genome-wide linkage study and subsequent association studies. *Hum Mol Genet*. 2006 Sep 15;15(18):2772-83.
- Myles S, Hradetzky E, Engelken J, Lao O, Nürnberg P, Trent RJ, Wang X, Kayser M, Stoneking M. Identification of a candidate genetic variant for the high prevalence of type II diabetes in Polynesians. *Eur J Hum Genet*. 2007 May;15(5):584-9
- Friedel S, Saar K, Sauer S, Dempfle A, Walitza S, Renner T, Romanos M, Freitag C, Seitz C, Palmason H, Scherag A, Windemuth-Kieselbach C, Schimmelmann BG, Wewetzer C, Meyer J, Warnke A, Lesch KP, Reinhardt R, Herpertz-Dahlmann B, Linder M, Hinney A, Remschmidt H, Schäfer H, Konrad K, Hübner N, Hebebrand J. Association and linkage of allelic variants of the dopamine transporter gene in ADHD. *Mol Psychiatry*. 2007 Oct;12(10):923-33.
- Rüschendorf F, Saar K, Becker C, Reichwald K, Hinney A, Brönnner G, Friedel S, Scherag A, Nürnberg P, Hebebrand J. Sex-specific linkage signals in a genome-wide 10K SNP scan of 295 German families with childhood and adolescent obesity. In preparation